



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE BEGOMOVIRUS
ASOCIADOS A INFECCIONES MIXTAS EN HORTALIZAS Y
ANÁLISIS COMPARATIVO DEL TRANSCRIPTOMA EN UNA
PLANTA MODELO PROTEGIDA POR CONSTRUCCIONES QUE
ACTIVAN EL RNAi ANTE RETO BEGOMOVIRAL.

T E S I S

Que para obtener el grado de

Doctora en Ciencias

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

P r e s e n t a

Mayela Vargas Salinas

La Paz, Baja California Sur, mayo de 2023.

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del día 11 del Mes de abril del 2023, 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:

"Caracterización molecular de begomovirus asociados a infecciones mixtas en hortalizas y análisis comparativo del transcriptoma en una planta modelo protegida por construcciones que activan el RNAi ante reto begomoviral "

Presentada por la alumna:

Mayela Vargas Salinas

Aspirante al Grado de DOCTOR 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.

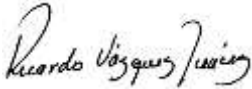
LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Ramón Jaime Holguín Peña
Director de Tesis



Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Co-Tutora de Tesis



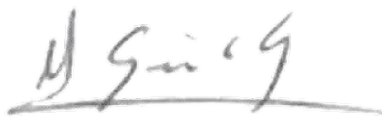
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Co-Tutor de Tesis



Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Co-Tutora de Tesis



Dr. Yair Cárdenas Conejo
Co-Tutor de Tesis



Dra. Alejandra Nieto Garibay
Encargada del Despacho de la Dirección de Estudios de
Posgrado y Formación de Recursos Humanos

La Paz, Baja California Sur, a 15 de febrero de 2023.

Los miembros del comité de tesis del (la) estudiante Mayela Vargas Salinas del Programa de Doctorado en Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales, revisamos el contenido de la tesis y otorgamos el Vo.Bo. dado que la tesis no representa un plagio de otro documento como lo muestra el reporte de similitud realizado:

- Herramienta antiplagio:
-iThenticate
- Filtros utilizados:
 - Citas excluidas
 - Bibliografía excluida
- Porcentajes de similitud:
1 %



Match	Source	Words	Similarity
1	Crossref	131 words	<1%
2	Crossref Posted Content	10 words	<1%
3	Crossref Posted Content	59 words	<1%
4	Crossref Posted Content	40 words	<1%
5	Internet	47 words	<1%
6	Crossref	44 words	<1%
7	Internet	42 words	<1%
8	Crossref Posted Content	35 words	<1%
9	ProQuest	32 words	<1%
10	Crossref	29 words	<1%
11	Publications	19 words	<1%

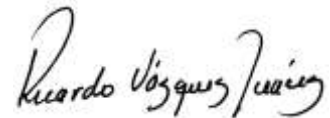
Firmas del comité



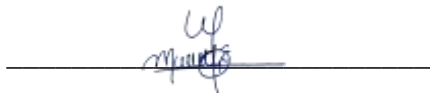
Dr. Ramón Jaime Holguín Peña



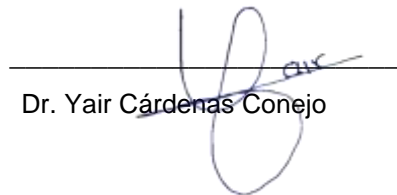
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega



Dr. Ricardo Vázquez Juárez



Dra. Elizabeth Monreal Escalante



Dr. Yair Cárdenas Conejo

Conformación de Comités

Comité Tutorial

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

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

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

Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C.
Co-Tutora de Tesis

Dr. Yair Cárdenas Conejo
Agrobiotecnología, Universidad de Colima
Co-Tutor de Tesis

Comité Revisor de Tesis

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Dr. Yair Cárdenas Conejo

Jurado de Examen

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Dr. Ricardo Vázquez Juárez
Dra. Elizabeth Monreal Escalante
Dr. Yair Cárdenas Conejo

Suplentes

Dra. Arevik Poghosyan Melkonyan
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Resumen

Los geminivirus constituyen una familia de virus infecciosos que afectan a las plantas, tanto de especies silvestres como de cultivo que se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales y afectan seriamente la producción. Por lo tanto, este estudio realizó la inspección de diferentes cultivos de hortalizas en Baja California Sur, de los que se obtuvo material genético de los begomovirus tomato chino La Paz virus (ToChLPV), tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), cucurbit leaf crumple virus (CuLCrV) y squash leaf curl virus (SLCuV) y de un curtovirus. Se confirmó la identidad de los virus mediante el uso de técnicas de biología molecular, secuenciación Sanger y masiva en las plataformas Illumina. La infección mixta de ToChLPV con TYLCV, de TYLCV con SLCuV, y TYLCV en infección sencilla se confirmó en plantas de tomate. En muestras de plantas de melón y calabaza se confirmó la infección mixta de CuLCrV con SLCuV, mientras que, en muestras de sandía y pepino se confirmó la presencia de SLCuV en infección sencilla. Las muestras analizadas de plantas de chile resultaron negativas a begomovirus. Sin embargo, se confirmó la infección sencilla causada por la especie *Beet curly top virus* del género *Curtovirus*, otro miembro de la familia *Geminiviridae* que se reporta por primera vez en la Península de Baja California. Se obtuvieron 41 secuencias de genomas completos de begomovirus y una de curtovirus. Las enfermedades asociadas a begomovirus están bien establecidas en la región ya que se reportaron por primera vez en 2004. Por esta razón, se realizó la evaluación de plantas de *Nicotiana benthamiana* protegidas con construcciones que activan el mecanismo de silenciamiento génico. Se compararon los cambios transcripcionales en plantas protegidas con secuencias homólogas CIRP (construcción derivada de la región intergénica del PepGMV) y con secuencias heterólogas CIRT (de ToChLPV) ante el desafío con PepGMV. Los análisis por microarreglos revelaron la regulación de genes asociados al RNAi; la metilación fue inducida por ambas construcciones, observando la participación de DCL2, DCL4, AGO3, AGO7, AGO10, NRPD2B (Pol IV), DRB3, CMT3, RDR6, entre otros. Algunos de estos genes se utilizaron para validar por análisis de RT-qPCR, donde DCL3, DCL4, AGO1-1, AGO2, RDR6 y PPR1 tuvieron mayor expresión en la protección con construcción heteróloga que con la construcción homóloga. De esta manera se confirma la activación del mecanismo de silenciamiento génico a nivel transcripcional, lo que establece la posibilidad de usar este sistema de protección en una infección begomoviral mixta. Finalmente, los fragmentos de secuencias de cinco begomovirus que afectan las hortalizas en BCS se utilizaron para realizar la predicción de siRNAs que activan el mecanismo de RNAi en análisis in silico. De los 1285 siRNAs que se obtuvieron, el 98.6 % hibridaron con los genomas de los begomovirus. También se observó que en todos los casos los siRNAs se unen a secuencias homólogas y heterólogas con una identidad por pares de entre 94.7 y 100 % y son capaces de activar el mecanismo de silenciamiento génico tanto en la infección sencilla como en la mixta.

Palabras clave: Coinfección, Geminiviridae, PepGMV, ToChLPV, TYLCV, CuLCrV, SLCuV, BCTV.

ORCID 0000-0002-6033-2280

Vo.Bo. Director de Tesis



Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

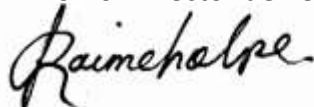
Summary

The geminivirus constitutes a family of infectious viruses that affect plants, both in wild species and in cultivation areas distributed in tropical and subtropical regions impacting production. Therefore, different vegetable crops were inspected in Baja California Sur, obtaining genetic material of the begomoviruses tomato chino La Paz virus (ToChLPV), tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), cucurbit leaf crumple virus (CuLCrV) and squash leaf curl virus (SLCuV), and a curtovirus. The identity of the viruses was confirmed using molecular biology techniques, Sanger and massive sequencing on Illumina platforms. Mixed infection of ToChLPV with TYLCV, TYLCV with SLCuV, and TYLCV in a single infection was confirmed in tomato plants. In melon and squash plant samples, mixed infection of CuLCrV with SLCuV was confirmed, while watermelon and cucumber samples confirmed the presence of SLCuV in a single infection. The samples from chili plants were negative to begomovirus. However, the single infection caused by the *Beet curly top virus* specie of the genus *Curtovirus*, another member of the *Geminiviridae* family, was confirmed and this is the first report in the Baja California Peninsula. Forty-one complete genome sequences of begomoviruses and one of curtovirus have been obtained. The diseases associated with begomoviruses are well established in the region since they were reported for the first time in 2004. Therefore, *Nicotiana benthamiana* plants protected with constructs that activate the gene silencing mechanism were evaluated. Transcriptional changes were compared in plants protected with homologous CIRP sequences (construct derived from the intergenic region of PepGMV) and with heterologous sequences CIRT (from ToChLPV) upon challenge with PepGMV. The microarray analysis revealed gene regulation associated with RNAi and methylation was induced by both constructs with the participation of DCL2, DCL4, AGO3, AGO7, AGO10, NRPD2B (Pol IV), DRB3, CMT3, RDR6, among others. Some of these genes were used for validation by RT-qPCR analysis, where DCL3, DCL4, AGO1-1, AGO2, RDR6, and PPR1 had higher expression in protection with the heterologous construct than with the homologous construct. Thus, the gene silencing mechanism activation at transcriptional level was confirmed, which establishes the possibility of using this protection system in a mixed begomoviral infection. Finally, the sequence fragments of the five begomoviruses that affect vegetables in BCS were used to perform the prediction of siRNAs activating the RNAi mechanism in silico analysis. From the 1285 siRNAs obtained, 98.6 % hybridized with the begomovirus genomes. In all the cases, siRNAs were observed binding to homologous and heterologous sequences with a pairwise identity from 94.7 to 100 % and are able to activate the gene silencing mechanism in both single and mixed infections.

Key words: Coinfection, Geminiviridae, PepGMV, ToChLPV, TYLCV, CuLCrV, SLCuV, BCTV.

ORCID 0000-0002-6033-2280

Vo.Bo. Director de Tesis



Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

Dedicatoria

¡Gracias Dios! ($\infty * \infty^\infty$)

A mi madre hermosa Julia Salinas D. y a mi padre Rogelio Vargas M. por su amor, cariño y bendiciones.

A mi querido y amado esposo Eduardo Borbolla M. por el privilegio de recorrer juntos el sendero de la vida.

A mi querido hijo Eduardo Borbolla V. por ser el motor de mi vida y fuente de inspiración.

A mis queridos hermanos y sus retoños, Roberto Vargas S., María Dolores Terrazas S., Fernando y Victoria por el cariño que nos une.

A mi familia de la vida Mariana, Martha Lucía, Karen Sinai, Ximena, Sol, Valeria, David y Jorge.

A mis amigas y amigos de toda la vida.

Agradecimientos

Al consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT), por su apoyo en mi crecimiento profesional a través de la beca No. 712459

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C. (CIBNOR) por las instalaciones brindadas para el desarrollo de este estudio.

Al Dr. Ramón Jaime Holguín Peña por su apoyo, paciencia y guía en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega por su disponibilidad, apoyo y amables consejos.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez, por su apoyo y opiniones para pulir este trabajo.

A la Dra. Elizabeth Monreal Escalante, por su disponibilidad y apoyo en este estudio.

Al Dr. Yair Cárdenas Conejo por su apoyo, guía y opiniones para mejorar este trabajo.

A la Dra. Diana Medina Hernández por su apoyo en el inicio de este trabajo.

A la Dra. Adriana Ceniceros Ojeda y al Dr. Juan José Morales Aguilar por su invaluable apoyo para enriquecer este trabajo.

A mi compañera Diana Rojas Sánchez por su amistad y apoyo en el desarrollo de este trabajo.

Al personal del Laboratorio de Fitopatología: a la Hidrob. María Sofía Ramos Galván por su apoyo en gestionar insumos y lo que se necesitara para avanzar en el desarrollo de este trabajo.

Al Mtr. Martín Aguilar por su apoyo en el trabajo de campo.

Al Dr. Dariel Tovar Ramírez y a Patricia Hinojosa Baltazar del laboratorio de Fisiología comparada por su apoyo en el desarrollo de este trabajo.

A la Maestra Diana Dorantes Salas por su amistad, apoyo y colaboración en estos años.

A todo el personal de Posgrado: Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro, Lic. Osvelia Ibarra Morales, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Tania Verónica Nuñez Valdez, CP. Raquel Emilia Herrera Vega, Adriana Teresa Franzoni García, Ana Yadira Marrón Martínez y Lic. Horacio Sandoval Gómez, por todo el apoyo en estos años.

A todas las personas que directa o indirectamente contribuyeron en el logro de este proyecto ¡gracias!.

Contenido	
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	iv
Contenido	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	x
Abreviaturas	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Cultivo de hortalizas en Baja California Sur	1
1.2 Infecciones mixtas	2
1.3 Familia <i>Geminiviridae</i>	3
1.3.1 Género <i>Begomovirus</i>	5
1.3.1.1 Pepper golden mosaic virus	8
1.3.1.2 Tomato chino La Paz virus	9
1.3.1.3 Tomato yellow leaf curl virus.....	9
1.3.1.4 Squah leaf curl virus.....	10
1.3.1.5 Cucurbit leaf crumple virus.....	11
1.3.2 Género <i>Curtovirus</i>	12
1.4 La ingeniería genética como estrategia para el control de enfermedades ocasionadas por begomovirus.....	13
1.5 Técnicas de secuenciación y análisis bioinformático	14
1.6 Silenciamiento de genes.....	17
2. ANTECEDENTES	19
2.1 Begomovirus y secuenciación de alto rendimiento	19
2.2 RNA de interferencia (RNAi) y begomovirus.....	19
2.3 Eficacia del RNA de interferencia	21
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo general	24
5.2 Objetivos particulares	24
6. MATERIAL Y MÉTODOS	25
6.1 Objetivo 1. Caracterización molecular de los agentes causales asociados a la infección begomoviral sencilla y mixta en hortalizas (solanáceas y cucurbitáceas) en BCS.	25
6.1.1 Material biológico.....	25
6.1.2 Detección de begomovirus en infección sencilla y mixta.....	25
6.1.3 Amplificación por círculo rodante (ACR)	27
6.1.4 Análisis de begomovirus mediante la secuenciación de alto rendimiento.....	27
6.1.4.1 Preparación de bibliotecas	27
6.1.4.2 Análisis Bioinformático	28
6.1.5 Identificación y caracterización de begomovirus y curtovirus.....	30
6.1.6 Preparación de microcarriers y formación de cartuchos de ADN.....	30
6.1.7 Diseño de bioensayo e inoculación de plantas con los begomovirus SLCuV y CuLCrV	32

6.1.8 Determinación de la presencia de SLCuV y CuLCrV en plantas inoculadas	33
6.2 Objetivo 2. Realizar el análisis comparativo de la expresión de genes en plantas de <i>N. benthamiana</i> protegidas con secuencias homólogas y heterólogas en una infección sencilla ..	33
6.2.1 Bioensayo de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> y construcciones de protección	33
6.2.2 Microarreglos y análisis de datos	33
6.2.3 Análisis de la expresión diferencial de genes	35
6.2.4 RT-qPCR análisis de expresión diferencial de genes	35
6.3 Objetivo 3. Evaluar la eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección con diferentes modelos begomovirales ante infección sencilla y mixta in silico	37
6.3.1 Determinar la identidad de los fragmentos propuestos para las construcciones dsRNA de cinco begomovirus.....	37
6.3.2 Determinación de siRNAs con mayor eficacia de cinco begomovirus	37
6.3.3 Integración de la base de datos del género begomovirus	37
6.3.4 Determinación de la eficiencia de siRNAs en infección sencilla y mixta	38
7. RESULTADOS	39
7.1 Objetivo 1. Caracterización molecular de los agentes causales asociados a la infección begomoviral sencilla y mixta en hortalizas (solanáceas y cucurbitáceas) en BCS.	39
7.1.1 Begomovirus en cultivos de hortalizas	39
7.1.2 Detección begomovirus en infección sencilla y mixta en hortalizas de BCS.....	40
7.1.3 Caracterización de begomovirus en infección mixta aislados de plantas de tomate	44
7.1.4 Infección sencilla e infección mixta por begomovirus en cucurbitáceas	47
7.1.5 Postulados de Koch con los begomovirus SLCuV y CuLCrV	52
7.1.6 Caracterización de curtovirus aislado de plantas de Chile	56
7.2 Objetivo 2. Realizar el análisis comparativo de la expresión de genes en plantas de <i>N. benthamiana</i> protegidas con secuencias homólogas y heterólogas ante una infección sencilla.	58
7.2.1 Análisis de la expresión génica en microarreglos de plantas protegidas por CIRP y CIRT antes de la infección por PepGMV	58
7.2.2 Expresión diferencial de genes asociados con RNAi en plantas protegidas con CIRP y CIRT antes de la infección por PepGMV	63
7.2.3 Análisis de expresión diferencial por RT-qPCR.....	72
7.3 Objetivo 3. Evaluar la eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección con diferentes modelos begomovirales en infecciones sencilla y mixta.	75
7.3.1 Identidad de los fragmentos propuestos para la construcción de dsRNA de cinco begomovirus	75
7.3.2 siRNAs de mayor eficiencia de cinco begomovirus	76
7.3.3 Integración de la base de datos del género begomovirus	84
7.3.4 siRNAs derivados de ToChLPV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta	85
7.3.5 siRNAs derivados de PepGMV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta	89
7.3.6 siRNAs derivados de TYLCV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta.....	94
7.3.7 siRNAs derivados de CuLCrV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta	98
7.3.8 siRNAs derivados de SLCuV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta	104
8. DISCUSIÓN	111
8.1 Infección mixta causada por begomovirus en tomate.....	112

8.2 Infección sencilla y mixta causada por SLCuV y CuLCrV en cucurbitáceas	114
8.3 Determinación del papel etiológico de dos begomovirus	119
8.4 Infección causada por curtovirus en plantas de chile	120
8.5 Expresión de genes en plantas de <i>N. benthamiana</i> protegidas con secuencias homólogas y heterólogas ante una infección sencilla	121
8.6 Eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección con los diferentes modelos begomovirales en las infecciones sencilla y mixta <i>in silico</i>	125
9. CONCLUSIONES	132
9.1 Perspectivas.....	132
10. LITERATURA CITADA	134
11. ANEXOS	146
ANEXO A: Extracción de ADN (Método CTAB)	146
ANEXO B: Reacción de PCR (detección de begomovirus)	147
ANEXO C: Construcciones homólogas, heterólogas.....	147
ANEXO D: Números de acceso de las secuencias que conformaron la base de datos de 445 especies reconocidas del género <i>Begomovirus</i> por el ICTV en su actualización de octubre, del 2020 y secuencias reportadas en la Península de Baja California.	149
ANEXO E: Se presenta los siRNAs del 51 al 238, que continúan de la Tabla 8. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV. ...	171
ANEXO F: Se presentan los siRNAs del 51 al 209, que continúan de la Tabla 13. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV. ...	176
ANEXO G: Se presentan los siRNAs del 51 al 363, que continúan de la Tabla 14. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV.....	180
ANEXO H: Se presentan los siRNAs del 51 al 225 que continúan de la Tabla 11. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV.	187
ANEXO I: Se presentan los siRNAs del 51 al 250 que continúan de la Tabla 15. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV.....	192
Anexo J: Artículo publicado.-RNAi activation with homologous and heterologous sequences that induce resistance against the begomovirus Pepper golden mosaic virus (PepGMV).....	197
Anexo K: Artículo sometido.- Association of cucurbit leaf crumple virus with squash leaf curl virus in mixed cucurbit disease in Baja California Sur México.	216

Lista de figuras

Figura 1. Organización del genoma de los begomovirus monopartita y bipartita.	7
Figura 2. Procesos para realizar un experimento de secuenciación masiva.	15
Figura 3. Estación de preparación de cartuchos de micropartículas e implementos	30
Figura 4. Síntomas representativos observados en hortalizas en BCS, asociados a begomovirus.	42
Figura 5. Detección de begomovirus con cebadores degenerados y específicos	38
Figura 6. Detección de TYLCV, ToChLPV y SLCuV.	40
Figura 7. Postulados de Koch con los begomovirus SLCuV y CuLCrV.....	51
Figura 8. Organización del genoma del curtovirus, Beet curly top virus BCS.	53
Figura 9. Expresión génica en microarreglos de plantas protegidas por CIRP y CIRT.	58
Figura 10. Anotación de ontología génica obtenida a partir de la respuesta de plantas de <i>N. benthamiana</i> protegidas con construcciones homólogas (CIRP) y heterólogas (CIRT) y desafiadas con PepGMV.	60
Figura 11. Red STRING de proteínas que muestran interacciones relacionadas con el RNAi.	72
Figura 12. Análisis de expresión relativa por RT-qPCR.....	74
Figura 13. Alineamiento de secuencias de ToChLPV.	75
Figura 14. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV denominado CIRT flanqueando las secuencias asociadas al género <i>Begomovirus</i>	86
Figura 15. siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV denominado CIRT flanqueando secuencias de genomas de begomovirus.	87
Figura 16. Distribución paralela de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV.....	88
Figura 17. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV....	90
Figura 18. siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV denominado CIRP flanqueando secuencias de genomas de begomovirus.	91
Figura 19. Análisis evolutivo por el método de máxima verosimilitud de 73 secuencias del género <i>Begomovirus</i> flanqueadas por siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV denominado CIRP.	894
Figura 20. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV denominado CTYLCV flanqueando las secuencias asociadas al género <i>Begomovirus</i>	95
Figura 21. Distribución paralela de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV..	97
Figura 22. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV denominado CCuLCrV flanqueando las secuencias asociadas al género <i>Begomovirus</i>	99
Figura 23. siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV denominado CCuLCrV flanqueando secuencias de genomas de begomovirus.	101
Figura 24. Análisis evolutivo por el método de máxima verosimilitud de 121 secuencias del género <i>Begomovirus</i> flanqueadas por siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV denominado CCuLCrV.....	98
Figura 25. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV denominado CSLCuV flanqueando las secuencias asociadas al género <i>Begomovirus</i>	105

Figura 26. siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV denominado CSLCuV flanqueando secuencias de genomas de begomovirus.	107
Figura 27. Análisis evolutivo por el método de máxima verosimilitud de 84 secuencias del género <i>Begomovirus</i> flanqueadas por siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV denominado CSLCuV.....	109
Figura 28. Regiones de genomas de begomovirus donde hibridan los siRNAs.	130
Figura 29. Gráfico de nubes de las especies de begomovirus con las que hibridaron los siRNAs derivados de los fragmentos de ToChLPV, PepGMV, TYLCV, CuLCrV y SLCuV.	130

Lista de tablas

Tabla 1. Taxonomía de la familia <i>Geminiviridae</i> basada en la gama de hospederos, insecto vector y en la organización del genoma.	4
Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para el análisis RT-qPCR de expresión de genes en muestras de plantas protegidas con CIRT y CIRP.	36
Tabla 3. Infecciones sencillas y mixtas causadas por begomovirus en hortalizas cultivadas en el estado de Baja California Sur, incluyendo El Valle de Santo Domingo en Cd. Constitución, El Pescadero, Todos Santos, San Juan de los Planes y El Carrizal.	44
Tabla 4. Genomas de los begomovirus TYLCV, ToChLPV y SLCuV, aislados de infección sencilla y mixta en muestras de plantas de tomate.	46
Tabla 5. Genomas de los begomovirus SLCuV y CuLCrV, aislados de infección sencilla y mixta en muestras de plantas cucurbitáceas.	52
Tabla 6. Listas de genes regulados al alza en el transcriptoma de plantas de <i>N. benthamiana</i> protegidas con construcciones homólogas CIRP y heterólogas CIRT, asociados a respuesta de defensa, estrés y resistencia sistémica adquirida.	61
Tabla 7. Lista de transcripciones obtenidas de plantas de <i>N. benthamiana</i> protegidas con construcciones homólogas (CIRP) y heterólogas (CIRT), ante el desafío con PepGMV. Los valores sub y sobre regulados son cambios en la expresión de los transcritos asociados a la activación de componentes que participan en el RNAi.	64
Tabla 8. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV.	77
Tabla 9. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV.	79
Tabla 10. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV.	80
Tabla 11. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV.	82
Tabla 12. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV.	79

Abreviaturas

ADN/DNA	ácido desoxirribonucleico
ARN/RNA	ácido ribonucleico
BCTV	beet curly top virus
CIRP	construcción derivada de la región intergénica del PepGMV
CIRT	construcción de la región intergénica del ToChLPV
CTAB	bromuro de hexadeciltrimetilamonio
CuLCrV	cucurbit leaf crumple virus
dATP	5'-trifosfato de deoxiadenosina
dsRNA	RNA de doble cadena
ICTV	Comité internacional de taxonomía de virus (del inglés: International Committee on Taxonomy of Viruses)
kb	kilo bases
mL	mililitro
ng	nanogramo
NGS	next generation sequencing
nt	nucleótidos
ORF	marco de lectura abierto (del inglés: open reading frame)
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PepGMV	pepper golden mosaic virus
PVP	polivinil pirrolidona
RCA	Rolling circle amplification
RNAi	RNA de interferencia
ToChLPV	tomato chino La Paz virus
TYLCV	tomato yellow leaf curl virus
SLCuV	squash leaf curl virus
ssDNA	DNA monocatenario (del inglés, single stranded of DNA)
µg	microgramo
µL	microlitro
µm	micrómetro

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo de hortalizas en Baja California Sur

Las plantas denominadas hortalizas o verduras son importantes por su aporte en la dieta humana e incluyen algunas de las que se aprovecha su fruto, hojas, raíces, tallos y flores. La denominada hortaliza número uno es el tomate *Solanum lycopersicum* L. de la familia *Solanaceae* que sitúa a México como el noveno productor mundial con 3,370,827 toneladas (t); en el estado de Baja California Sur (BCS) se cultiva en una superficie de 2,885.95 hectáreas (ha). Por otro lado, su consumo está en constante aumento, en México se ha documentado el consumo anual per cápita en 12.4 kg (SIAP, 2021). El chile verde *Capsicum annuum* L. es otra de las hortalizas que ubica a México en segundo lugar en el ranking mundial, con una producción de 3,324,260 t, que aporta el 8.3 % de la producción mundial; en BCS se cultiva en una superficie de 1,550.85 ha. Algunos géneros de la familia *Cucurbitaceae* destacan como las principales hortalizas cultivadas y se encuentran entre los primeros diez de importancia económica, como *Cucurbita*, *Cucumis* y *Citrullus* (Schaffer y Paris, 2003; Salma, 2006; García-Brunton, 2018). La calabacita *Cucurbita pepo* L. tiene una producción de 589,802 t que coloca a México en el quinto lugar como productor mundial. En el estado de BCS se cultiva en una superficie de 199 ha. En cuanto al melón *Cucumis melo* L. le corresponde 612,940 t, que ubica a México en el décimo lugar internacional en BCS se cultiva en una superficie de 146.20 ha. El pepino *Cucumis sativus* L. tiene una producción de 1,159,934 t y coloca a México en el séptimo lugar como productor mundial; de esta producción se exportaron 822,000 t a los Estados Unidos de Norteamérica (USA). En BCS se cultiva en una superficie de 288.8 ha. La producción de sandía *Citrillus lanatus* (Thunb.) asciende a 1,362,393 t, lo que coloca a México como el décimo productor mundial, desplazando un volumen de 720,000 t anuales al comercio internacional. Los datos descritos del mercado internacional corresponden al 2021, en tanto que las superficies correspondientes a BCS son del 2021 (SIAP). Baja California Sur exporta entre el 98 y 99 % de la producción de los cultivos mencionados, principalmente a los Estados Unidos. Por otro lado, los cultivos que reportan superficie siniestrada fueron tomate, chile, calabacita y melón.

1.2 Infecciones mixtas

Las infecciones mixtas ocasionadas por dos o más fitopatógenos en un mismo hospedero y -en el caso específico ocasionada- por dos o más begomovirus son comunes en zonas tropicales y subtropicales donde estos patógenos abundan. Estas infecciones pueden ser potencializadas por la extrema plasticidad (habilidad para evolucionar rápidamente de estos virus) y desencadenar el surgimiento de nuevas enfermedades debido a los eventos de mutación, recombinación y pseudo-recombinación (Seal *et al.*, 2006). Durante estas infecciones interacciones como sinergismo, en el que los síntomas son más severos que los que causa una sola especie de virus, interferencia donde un virus afecta el ciclo infectivo de otro y también puede presentarse el antagonismo (Rentería-Canett *et al.*, 2011). Por ejemplo, se han documentado interacciones de sinergismo con begomovirus bipartitas como el squash leaf curl virus (SLCuV) y watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) en las plantas de melón, en las que observaron que las plantas inoculadas con SLCuV mostraron síntomas leves que después desaparecieron. En cambio, las inoculadas con WmCSV los síntomas de la enfermedad fueron más evidentes con el tiempo y redujeron su rendimiento en un promedio de 22% (Sufrin-Ringwald y Lapidot, 2011). Al contrario, las plantas con la infección mixta desarrollaron síntomas más pronunciados que en la infección individual con una reducción en el rendimiento entre 21-54%, afectando incluso la apariencia de la fruta. Por otro lado, el nivel del ADN en la inoculación de ambos virus no afectó el nivel de WmCSV, en tanto que el de SLCuV se incrementó varias veces ante la presencia de WmCSV (Sufrin-Ringwald y Lapidot, 2011). Por otra parte, se ha reportado que los begomovirus y curtovirus, infectan una gran variedad de cultivos hortícolas y se cree que son prevalentes en especies dicotiledóneas no cultivadas (Varsani *et al.*, 2014). Dado el amplio rango de los hospederos de estos virus, las coinfecciones o infecciones mixtas son frecuentes, lo que favorece la diversidad genética dentro y entre sus especies. Por otro lado, desde hace dos décadas los begomovirus cucurbit leaf crumple virus (CuLCrV) y SLCuV se han reportado en las infecciones simples y mixtas y siguen afectando los cultivos de cucurbitáceas en diferentes sitios del sur de los Estados Unidos y el norte de México (Brown *et al.*, 2002; Akad *et al.*, 2008; Hagen *et al.*, 2008). En México, una de las infecciones mixtas ocasionadas por begomovirus con amplia distribución en el país, es la ocasionada por el pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV) y el pepper golden mosaic virus PepGMV. Con estas

especies se observó que la expresión de los síntomas depende del hospedero, mientras que en algunas plantas se presenta un sinergismo y en otras puede presentarse antagonismo debido a que en la infección mixta su replicación aumenta, y para el movimiento sistémico el PHYVV apoya al PepGMV. Sin embargo, esto no ocurre a la inversa aún cuando si hay transactivación heteróloga de ambos promotores de la CP (Mendez-Lozano *et al.*, 2003). En la parte central norte de México, PHYVV y PepGMV, se han reportado incluso en infección mixta con el curtovirus, beet mild curly top virus en plantas de chile Marisol (Reveles Torres *et al.*, 2012). Desde hace algunos años los cultivos de hortalizas como tomate, chile y cucurbitáceas han sido afectados por enfermedades causadas por begomovirus en infección sencilla y mixta tanto con otros begomovirus como con otros patógenos como fitoplasmas que ocasionan pérdida económicas en el rendimiento en la Península de Baja California (Holgún-Peña *et al.*, 2006; Cardenas-Conejo *et al.*, 2010; Lebsky *et al.*, 2011; Medina-Hernández *et al.*, 2019; Vargas-Salinas *et al.*, 2020).

1.3 Familia *Geminiviridae*

Los geminivirus constituyen una familia de virus infecciosos de plantas. Se sabe que sus miembros afectan a las plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, tanto de áreas de cultivo como de especies silvestres, que se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales, afectando seriamente la producción. Esta familia de virus es grande, diversa y colectivamente responsable de pérdidas económicamente significativas; su genoma es relativamente pequeño y su capacidad para reprogramar los procesos celulares de sus hospederos en su beneficio es lo que los hace de gran interés para estudios de biología y virología molecular (Rojas *et al.*, 2005). Sus miembros (Tabla 1) causan graves enfermedades en los principales cultivos en todo el mundo en alimentos, forraje y cultivos de fibra que afectan la seguridad alimentaria y nutricional (Ramesh *et al.*, 2017). A nivel mundial los geminivirus han ocasionado pérdidas de millones de dólares y miles de hectáreas de cultivos (Legg *et al.*, 2006; Jones, 2020). En Asia el virus del enrollamiento de la hoja de algodón (cotton leaf crumple virus CLCrV) ha ocasionado graves pérdidas (Bridson y Markham, 2000). En África la producción de maíz ha sido afectada por el maize streak virus (MSV) (Shepherd *et al.*, 2010), y en la India la producción de legumbres reporta pérdidas millonarias por los begomovirus (Varma y Malathi, 2003). Los geminivirus son transmitidos por diferentes insectos de cuatro familias de homópteros, el genoma de estos virus

infecciosos es de uno o dos ADN circular monocatenario de 2.5 a 5.2 kb de longitud. Con base en la organización de su genoma, la gama de los hospederos y el tipo de insecto vector; esta familia se divide en catorce géneros que colectivamente reúnen a más de 520 especies (Zerbini *et al.*, 2017; Varsani *et al.*, 2021). Los geminivirus presentan una cápside con una proteína de una sola capa, que forman dos icosaedros iguales e incompletos unidos por uno de sus lados, con un tamaño de 22 x 38 nm, tomando así una forma geminada.

Tabla 1. Taxonomía de la familia *Geminiviridae* basada en la gama de hospederos, insecto vector y en la organización del genoma.

Género	No. de especies y una especie representativa	Hospedero	Vector / Familia	Genoma
<i>Becurtovirus</i>	3 especies <i>Beet curly top Iran virus</i>	Dicotiledóneas	Chicharritas/ <i>Cicadellidae</i>	Monopartit a
<i>Begomovirus</i>	445 especies <i>Bean golden mosaic virus</i>	Dicotiledóneas	Mosquita blanca/ <i>Aleyrodidae</i>	Monopartit a y Bipartita
<i>Capulavirus</i>	4 especies <i>Alfalfa leaf curl virus</i>	Dicotiledóneas	Áfidos/ <i>Aphididae</i>	Monopartit a
<i>Citlodavirus</i>	4 especies <i>Camellia chlorotic dwarf-associated virus</i>	Dicotiledóneas		Monopartit a
<i>Curtovirus</i>	3 especies <i>Beet curly top virus</i>	Dicotiledóneas	Chicharritas/ <i>Cicadellidae</i> / <i>Membracida</i> e	Monopartit a
<i>Eragrovirus</i>	1 especie <i>Eragrostis curvula streak virus</i>	Monocotiledónea	Chicharritas/ <i>Cicadellidae</i>	Monopartit a
<i>Grablovirus</i>	3 especies <i>Grapevine red blotch virus</i>	Dicotiledóneas	Periquitos/ <i>Membracida</i> e	Monopartit a
<i>Maldovirus</i>	3 especies <i>Apple geminivirus 1</i>	Dicotiledóneas		Monopartit a
<i>Mastrevirus</i>	Más de 45 especies <i>Axonopus compressus streak virus</i>	Monocotiledónea s y dicotiledóneas	Chicharritas/ <i>Cicadellidae</i>	Monopartit a
<i>Mulcrilevirus</i>	2 especies <i>Mulberry crinkle leaf virus</i>	Dicotiledóneas		Monopartit a
<i>Opunvirus</i>	1 especie <i>Opuntia virus 1</i>	<i>Cactaceae</i>	Cochinillas/ Cockerell	Monopartit a
<i>Topilevirus</i>	2 especies	Dicotiledóneas		Monopartit

	<i>Tomato apical leaf curl virus</i>			a
<i>Topocuvirus</i>	1 especie	Dicotiledóneas	Periquitos/ <i>Membracida</i>	Monopartit a
	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>		<i>e</i>	
<i>Turncurtovirus</i>	3 especies	Dicotiledóneas	Chicharritas/ <i>Cicadellidae</i>	Monopartit a

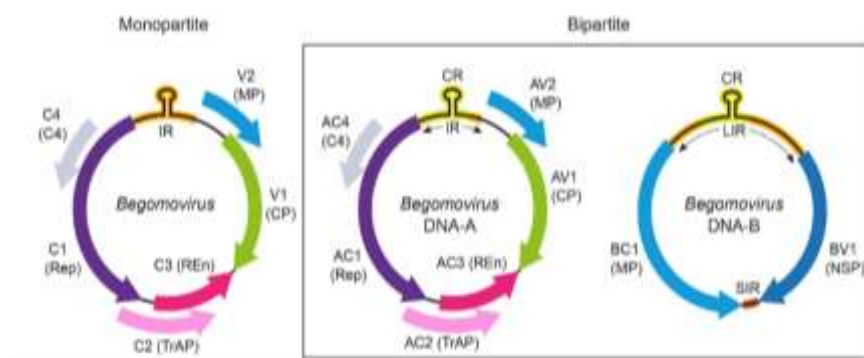
(Zerbini *et al.*, 2017)

Los virus forman un grupo grande de patógenos emergentes de los cuales los geminivirus son el principal grupo de virus emergentes de plantas. No obstante, por sus características como su amplia variación genética debido a la mutación, la recombinación, su eficiente propagación por vectores y su amplio rango de hospederos como familia, sus hospederos pueden ser especies silvestres o cultivadas (García-Arenal y Zerbini, 2019).

1.3.1 Género *Begomovirus*

Begomovirus es el género de la familia *Geminiviridae* más numeroso con 445 especies reconocidas (Zerbini *et al.*, 2017) que afectan a las plantas dicotiledóneas y son transmitidos por la mosquita blanca *Bemisia tabaci* Gennadius. (Brown *et al.*, 2015; De Barro *et al.*, 2011). El genoma de los begomovirus puede ser monopartita o de dos componentes genómicos de ADN monocatenario circular denominado ADN-A y ADN-B (Fig. 1), cada uno de 2.5-2.6 kb. Los begomovirus monopartita y el ADN-A de los bipartita codifican en sentido viral, la proteína de la cápside (CP) que encapsida y protege el genoma del virus y además se involucra en el movimiento del virus en y entre las plantas. La proteína AV2/V2 está involucrada en la superación de las defensas del hospedero desencadenadas por el RNAi, una respuesta de defensa natural de las plantas contra los virus invasores, por lo que en contradefensa los virus codifican supresores del silenciamiento génico que les permite invadir eficazmente las plantas (Amin *et al.*, 2011). Ambas pueden estar implicadas en el movimiento del virus. Sin embargo, esta última no está presente en los begomovirus del Nuevo Mundo. El ADN-A, en el sentido complementario, codifica la proteína asociada a la replicación (Rep), la proteína activadora de la transcripción (TrAP), la proteína potenciadora de la replicación (REn) y la C4 importante en la determinación de los síntomas que se involucran en el ciclo celular contrarrestando la respuesta del hospedero a la expresión de Rep (Zerbini *et al.*, 2017). Los begomovirus bipartitas no

comparten similitud entre las secuencias de nucleótidos de los dos componentes de ADN de un mismo begomovirus, con la excepción de una región de 200 pb denominada región común; que no codifica proteínas, pero contiene secuencias involucradas en la replicación del ADN viral y en la expresión de los genes. La región común de todos los geminivirus contiene una región conservada con la capacidad de formar una horquilla, cuya estructura es altamente necesaria para la replicación y expresión de los genes. La secuencia nanométrica TAATATT (↓) AC es conservada entre todos los begomovirus y se encuentra en el bucle de una estructura tallo asa en la que se ubica el punto de inicio (↓) de la síntesis de la cadena complementaria (Lazarowitz y Shepherd, 1992). En esta región también se ubican los iterones una serie de elementos de secuencia de 8 a 12 nt de longitud que se repiten de 3 a 6 veces dentro de la región del origen de la replicación, con posición relativa, orientación y espaciado, que dan especificidad a los sitios de unión con Rep y constituyen el origen funcional de la replicación (Argüello-Astorga *et al.*, 1994). El ADN-B codifica las proteínas del movimiento, las cuales son necesarias para el desplazamiento del virus dentro de la planta, el desarrollo de síntomas y el rango de hospederos. La proteína lanzadera nuclear (NSP) se encarga de importar el genoma del virus al núcleo para la replicación y exporta los genomas de los virus recién replicados al citoplasma. En tanto que (MP) la proteína del movimiento de célula a célula, atrapa el complejo genoma NSP en el citoplasma y lo dirige a la pared celular para su movimiento a través de lo que parece ser un plasmodesmo alterado para llegar hacia las células adyacentes no infectadas, donde NSP dirige el genoma del virus al núcleo e inicia un nuevo ciclo de infección (Lazarowitz y Beachy, 1999). Se ha identificado una pequeña cantidad de begomovirus monopartita que carecen del segundo componente. Todos los productos virales que son necesarios para la replicación, la expresión génica, la transmisión por la mosca blanca e infección sistémica están codificados en un solo componente que es homólogo del componente de ADN-A de los begomovirus bipartitos.



Tomada de (Fiallo-Olivé *et al.*, 2021).

Figura 1. Organización del genoma de los begomovirus monopartita y bipartita. Los begomovirus monopartita y el ADN-A de los bipartita, codifican en sentido viral las proteínas: de la cápside (CP en los ORFs AV1/V1) y la AV2/V2. El ADN-A en sentido complementario codifica las proteínas: asociada a la replicación (Rep, ORFs AC1/C1), activadora de la transcripción (TrAP, ORF AC2/C2), potenciadora de la replicación (REn, AC3/C3) y C4 (AC4/C4) importante en la determinación de los síntomas. El ADN-B codifica las proteínas: del movimiento, la lanzadera nuclear (NSP, BV1) y la del movimiento de célula a célula (MP, BC1).

Algunos begomovirus están asociados a satélites circulares de ADN como los alfa, beta y delta (Zhou, 2013; Lozano *et al.*, 2016). Los alfasatélites ADN α con \sim 1375 nt son capaces de auto replicarse, ya que codifican la proteína iniciadora de la replicación. Sin embargo, dependen del virus auxiliar para el movimiento, la encapsidación y la transmisión por el vector. Los betasatélites ADN β , con \sim 1.3-1.4 kb tienen la nanosecuencia TAATATTAC ubicada en la región intergénica, homóloga a estos virus y contribuyen modulando la virulencia, suprimiendo el gen del hospedero mediante silenciamiento, dependen de su virus auxiliar para funciones de replicación, encapsidación y para la transmisión por el vector (Ramesh *et al.*, 2017). Mientras que los deltasatélites necesitan del begomovirus asociado para la replicación, el movimiento en el hospedero y la transmisión por el vector.

La sintomatología causada por la infección de estos virus incluye mosaico, moteado clorótico, clorosis foliar marginal, enrollamiento, enchinamiento foliar, abultamientos o ampollamientos foliares, enanismo, caída de flor, reducción de tamaño o ausencia de frutos (Velásquez V. *et al.*, 2013). Sin embargo, también se ha reconocido que la expresión de los síntomas puede variar en función de la variedad de la planta, condiciones ambientales o variantes de begomovirus (Khan *et al.*, 2007). Reveles-Torres y colaboradores, reportan también síntomas entre los que destacan

follaje clorótico o amarillo en la planta completa, ausencia total o parcial de estructuras reproductivas (botones, flores o frutos), hojas alargadas y de consistencia gruesa, así como frutos deformes (Reveles Torres *et al.*, 2012). La presencia de clorosis amarillo brillante se observó y describió por primera vez en 2006 entre las nervaduras de las hojas en las plantas de diferentes variedades de melón (*C. melo*), calabaza (*C. pepo*) y sandía (*C. lanatus*) cultivadas en Arizona, USA y Sonora, México (Brown *et al.*, 2007). Otro begomovirus como el watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) infecta a diferentes cultivares de cucurbitáceas y ocasiona daños severos a estas especies, las que presentan sintomatología como venas amarillas, moteado, lento crecimiento o enanismo en las plantas jóvenes, así como bajo rendimiento (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014b). En este género los patógenos devastadores que destacan incluyen los miembros de las especies de *African cassava mosaic virus*, *Bean golden mosaic virus*, *Cotton leaf curl Kokhran virus* y *Tomato yellow leaf curl virus* (Zerbini *et al.*, 2017). En Baja California Sur, los begomovirus monopartita y bipartita se han reportado infectando cultivos de hortalizas.

1.3.1.1 Pepper golden mosaic virus

El pepper golden mosaic virus (PepGMV) fue reportado por primera vez en Texas en 1987 (Stenger *et al.*, 1990). En 2003, Méndez-Lozano y colaboradores reportaron que el pepper huasteco yellow vein virus PHYVV y el PepGMV se encuentran asociados a la infección mixta en muchos cultivos en México (Mendez-Lozano *et al.*, 2003), lo que ha influido en el desarrollo de los estudios de la expresión de la sintomatología y de los genes, la replicación y el movimiento del virus en el hospedero. La infección de las plantas con este virus bajo condiciones controladas ha permitido observar la remisión de los síntomas y que los hospederos se recuperan aproximadamente dos semanas después de la inoculación, aunque inicialmente desarrollaran los síntomas. Las hojas nuevas presentan la disminución y desaparición de estos síntomas, consistente con la baja acumulación de las partículas virales en las hojas asintomáticas, no así en el contenido en las hojas con los síntomas. El ADN viral no desaparece, lo que sugiere que estas moléculas se escapan de los mecanismos de defensa de la planta (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007).

1.3.1.2 Tomato chino La Paz virus

El primer reporte del tomato chino La Paz virus (ToChLPV), fue en Baja California Sur en 2006, el cual afectó plantas de tomate con síntomas como enrollamiento severo de la hoja hacia arriba, retraso del crecimiento, disminuyó seriamente el rendimiento y se asoció a grandes poblaciones de *B. tabaci* (Holguín-Peña *et al.*, 2006). ToChLPV es un begomovirus bipartita, no obstante, hasta ahora no se ha determinado su componente B. Por otro lado, un análisis filogenético del ADN-A de 45 especies, demostró que los begomovirus autóctonos del Nuevo Mundo se pueden dividir en tres clados principales y un grupo intermedio (clado AbMV, clado SLCV, clado Brasil y grupo BGYMV); aunque tienen algunas diferencias en la distribución geográfica y la especificidad del hospedero, también tienen como característica que los virus que infectan al frijol y tomate, se distribuyen en los diferentes clados, lo que sugiere su independencia evolutiva (Rojas *et al.*, 2005). El estudio incluyó al ToChLPV agrupado en el clado del SCLV, sin embargo, este no cumple con la disposición de los iterones característica del clado.

1.3.1.3 Tomato yellow leaf curl virus

Tras el brote de una nueva enfermedad en las plantas de tomate en 1959 se detectó e identificó por primera vez el tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) al norte de Israel (Cohen y Nitzany, 1966). Posteriormente este virus se distribuyó en la cuenca Mediterránea Oriental. Desde entonces se ha asociado a una enfermedad viral severa en cultivos de tomate que ocasiona síntomas de amarillamiento y rizado de las hojas y todas las variedades comerciales de este cultivo siendo susceptibles a esta enfermedad (Czosnek *et al.*, 1988) que se transmite por el insecto vector *B. tabaci* y se ha extendido ampliamente. En las islas del Caribe se detectó en Jamaica (McGlashan *et al.*, 1994), República Dominicana, Cuba (Morales, 2011) y desde 1997 se ha reportado infectando tomate en Florida (Polston y Anderson, 1997), después se detectó en Texas y California (Isakeit *et al.*, 2007; Rojas *et al.*, 2007). En México se detectó por primera vez en Yucatán en las plantas de tomate (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999) posteriormente en 2007 se reportó en este mismo cultivo en Arizona y Sonora (Idris *et al.*, 2007). En Sinaloa se detectó en tomatillo (Gámez-Jiménez *et al.*, 2009) y en tomate tanto en la infección individual como mixta con el SLCuV (Lugo Melchor *et al.*, 2011), mientras que en Baja California Sur se detectó coinfectando plantas de chile con el tomato chino La Paz virus (ToChLPV) (Cardenas-Conejo *et*

al., 2010). A pesar de que no hay una estimación oficial de las pérdidas inducidas por el TYLCV en tomate es de suponer que las pérdidas asciendan a decenas de millones de dólares y algunos campos sufren pérdidas del 100% de rendimiento (Fonsah *et al.*, 2019). El manejo de la enfermedad ocasionada por TYLCV es difícil y costoso, ya que son limitadas las opciones de hospederos resistentes. Por esta razón, desde los 90s se han desarrollado variedades resistentes derivadas de especies silvestres como *Lycopersicon chilense* (Dunal) en cruza con *L. esculentum* L., cuya generación se inoculó con el virus y posteriormente se analizó el genoma del tomate. Incluso, se confirmó en dos poblaciones consecutivas que el locus principal de tolerancia a TYLCV es el TY-1, debido a que contiene información de la proteína responsable del movimiento intercelular del virus (Zamir *et al.*, 1994; Dueñas *et al.*, 2006). Los genes del tomate que han mostrado resistencia a TYLCV son el TY-1, TY-2 y el TY-3 presentes en diferentes cultivares que han permitido el desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento (Dueñas *et al.*, 2006). Otros estudios han demostrado que el cultivar de tomate resistente a TYLCV, CLN2777A de Loci TY-2 y el susceptible TMXA48-4-0 retado con TYLCV-IL presentan acumulación de TYLCV apenas detectable y una gran cantidad de TYLCV, respectivamente. Lo que demuestra que otra de las grandes desventajas es que estos cultivares siguen siendo compatibles a TYLCV, es decir, aunque en bajo nivel, pero el virus sigue replicándose y actúan como fuente de inóculo para otras especies o cultivos susceptibles, no obstante que tengan rendimiento (Lapidot *et al.*, 2001). Por esta razón, desde hace tiempo en ingeniería genética se realizan otras estrategias para inducir la resistencia a los begomovirus lo que generalmente implica el uso de la proteína asociada a la replicación Rep. Un ejemplo de esto es la resistencia a TYLCV, que se logró mediante la agro inoculación de un fragmento truncado del gen Rep, orientado en sentido y antisentido en plantas de *N. benthamiana*, demostrando que interfiere con la infección del virus (Noris *et al.*, 1996). Así también otros estudios han utilizado este gen ya sea total o parcialmente, demostrando resistencia al TYLCV en condiciones de campo en plantas inoculadas con el virus de manera natural por el insecto vector *B. tabaci* (Yang *et al.*, 2004).

1.3.1.4 Squah leaf curl virus

En 1960 reportaron una enfermedad causada por virus con síntomas como clorosis de venas, en una gama de hospederos que se limitaba a cucurbitáceas, transmitido por *B. tabaci* y fácilmente

transmisible mecánicamente (Cohen y Nitzany, 1960). Posteriormente, Flock y Mayhew (1981) documentaron en California una nueva enfermedad a la que propusieron el nombre de enrollamiento de la hoja de calabaza. Esta enfermedad ocasiona daños como: retraso severo del crecimiento, enrollado de la hoja hacia arriba y engrosamiento de venas y determinaron a *B. tabaci* como el agente causal de transmisión tanto de plantas de calabaza como de algodón. Después en 1982, una severa epidemia de la enfermedad relacionada con altas poblaciones de mosca blanca ocasionó altas pérdidas en el rendimiento de melón, sandía y calabaza, así como un 100% de afectación en plantas de lechuga con pérdida de rendimiento entre 50 y 75% (Duffus y Flock, 1982). El año siguiente se reportó que el agente causal de esta enfermedad es el squash leaf curl virus (SLCuV), un miembro de la familia *Geminiviridae*, que además de afectar cucurbitáceas también afecta diferentes cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) y su modo de transmisión en el insecto vector *B. tabaci* es circulativo (Cohen, 1983). El genoma de este virus fue caracterizado por primera vez en 1991 (Lazarowitz, 1991). Durante estos años se ha seguido reportando su presencia y afectación en un amplio rango de hospederos pertenecientes a seis familias entre las que destacan *Cucurbitaceae*, *Fabaceae* y *Solanaceae*. En la República Mexicana, el SLCuV ha afectado cultivos de cucurbitáceas en los estados de Sonora y Baja California Sur. En Sinaloa afectó cultivos de tomate, tanto en la infección sencilla como en la mixta con TYLCV (Lugo Melchor *et al.*, 2011).

1.3.1.5 Cucurbit leaf crumple virus

El *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV), miembro del género *Begomovirus*, es un bipartita que causa enfermedad y afecta seriamente a las plantas de cucurbitáceas. Este virus fue identificado por primera vez en las plantas de *C. lanatus* en California en 1998 (Guzman *et al.*, 2000) y posteriormente se identificó también en plantas de calabaza, melón dulce y melón (Brown *et al.*, 2000). En estudios experimentales sobre el rango de los hospederos, se determinó que es alto en miembros de la familia *Cucurbitaceae* y que los reordenamientos de CuLCrV-AZ A y B con los componentes de SLCuV A y B son viables (Brown *et al.*, 2002). Esta situación favorecería su eficiencia ante la posibilidad de encontrarlos juntos en condiciones naturales, lo cual ha ocurrido e incluso estos dos begomovirus se han asociado en la infección mixta con los virus del género *Crinivirus* (familia *Closteriviridae*) en las plantas de *C. melo*, en las que se observó el

mayor número de plantas positivas a SLCuV que a CuLCrV (Kuo *et al.*, 2007). El SLCuV tiene un área de distribución geográfica mayor que el CuLCrV; sin embargo, ambos comparten el sur y sureste de los Estados Unidos, donde han sido reportados tanto en la infección sencilla como en la mixta (Hagen *et al.*, 2008). En México han sido reportados en los estados de Sonora y Coahuila en diferentes tiempos en infección sencilla (Flock y Mayhew, 1981; Brown *et al.*, 2000). Un reporte reciente indica que el CuLCrV se ha identificado afectando cultivos de *C. lanatus* en el estado de Campeche (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2021).

1.3.2 Género *Curtovirus*

El género *Curtovirus* tiene tres especies reconocidas *Beet curly top virus*, *Horseradish curly top virus* y *Spinach severe curly top virus*, que infectan plantas dicotiledóneas y son transmitidos por las chicharritas (Hemíptera, familia *Cicadellidae*) de manera persistente (circulativa, no propagativa). La primera especie destaca como un patógeno con un amplio rango de hospederos y de importancia económica en América del Norte e Irán. Los curtovirus infectan una gran variedad de hortalizas y se cree que son prevalentes en dicotiledóneas no cultivadas. En México, los curtovirus se han reportado desde 2005, tanto en la infección sencilla como en mixta con los begomovirus en plantas de Chile con sintomatología similar (Velásquez-Valle *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Reveles Torres *et al.*, 2012). Su genoma consiste en un único componente circular de ssDNA de 2.9-3.0 kb, que por lo general codifica siete proteínas, sin embargo, se han reportado aislados que solo tienen cinco o seis genes (Varsani *et al.*, 2014). La hebra en el sentido del virión codifica tres ORFs, como la proteína de la cápside (CP) cuya función es encapsular el ssDNA, se involucra en el movimiento del virus y la transmisión al insecto vector, una proteína de movimiento (MP) y V3 que se involucra en la regulación de los niveles relativos de ssDNA y dsDNA. La hebra en sentido complementario codifica la proteína asociada a la replicación (Rep), la cual es necesaria para iniciar la replicación del ADN viral, la proteína C2 (ORF) que actúa como un factor de patogenicidad en algunos hospederos, la proteína (Ren) una potenciadora de replicación y la proteína C4, que es un determinante de los síntomas implicados en controlar el ciclo celular (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Por otro lado, los criterios que deben utilizarse como guía para establecer el estado taxonómico indican que debe haber un 77 % de identidad por pares en todo el genoma como el umbral de la

demarcación de las especies y un 94 % de identidad por pares en todo el genoma como umbral de demarcación de las cepas (Varsani *et al.*, 2014).

1.4 La ingeniería genética como estrategia para el control de enfermedades ocasionadas por begomovirus

Previo a la ingeniería genética, para el control de las enfermedades ocasionadas por los virus, los cultivos se protegían mediante el mejoramiento tradicional, para el desarrollo de plantas resistentes a estos patógenos, aunado a técnicas agronómicas como: el manejo integrado de plagas, la rotación de cultivos, la erradicación de fuentes de inóculo y el uso de semilla híbrida y certificada libre de virus (Quiñones *et al.*, 2007). Posteriormente, el concepto de la resistencia derivada del patógeno propone que cuando sus genes se expresan por un organismo hospedero potencial podrían conllevar a que este se hiciera resistente al patógeno (Sanford y Johnston, 1985). Considerando esta premisa, actualmente se involucra el uso de genes derivados del patógeno y con los avances en la biología molecular e ingeniería genética, se pueden obtener plantas transformadas que portan la información genética foránea que les confiere la resistencia a los begomovirus.

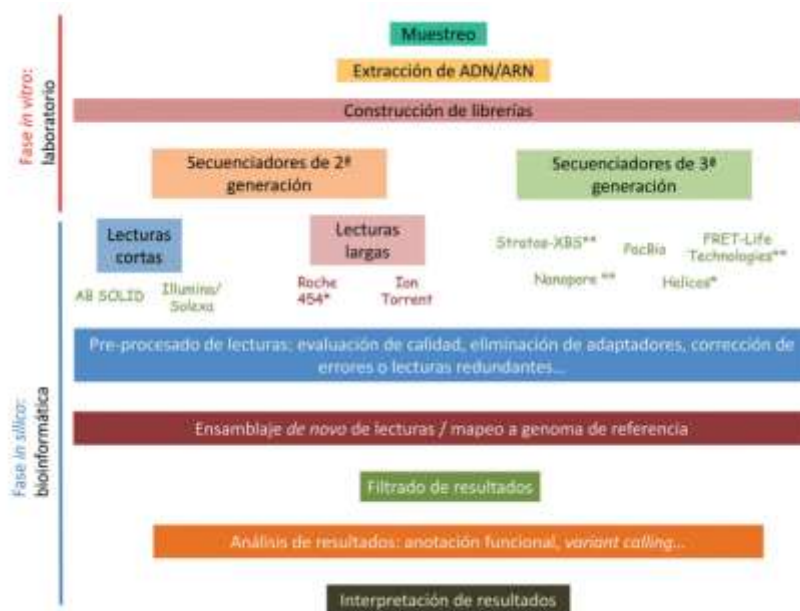
Para obtener plantas resistentes a los begomovirus se han evaluado diferentes estrategias con las cuales se han logrado buenos resultados. Entre ellas destaca la resistencia al virus mediada por las proteínas en la que las plantas expresan variantes de las virales para disminuir la eficiencia de la proteína viral nativa. Por ejemplo, la sobreexpresión del gen que codifica para la cubierta proteica (CP) del TYLCV con el cual se transformaron plantas de tomate sensibles al TYLCV, posteriormente se inocularon con este begomovirus logrando retardar la aparición de los síntomas. De esta forma, las plantas enfermas se recuperaron e incrementaron la resistencia en las inoculaciones posteriores. Todas las plantas que se recuperaron expresaron la proteína de la cápside de TYLCV (Kunik *et al.*, 1994). Otra estrategia ha sido que las plantas alojan proteínas que interactúan con el genoma o que las proteínas virales se mutan o eliminan para interrumpir la replicación o transmisión del virus (Mubin *et al.*, 2011). La resistencia mediada por el RNA viral es una de las estrategias con mayor éxito en el caso de los begomovirus; esta resistencia es mediada por la replicasa viral, en la que se utiliza el gen que codifica para la proteína Rep, con el propósito de interferir con la replicación viral y así conferir la resistencia (Quiñones *et al.*, 2007). La interferencia con la acción de la proteína Rep representa una de las

mejores opciones para la resistencia derivada del patógeno, ya que su uso representa dos alternativas: la primera relacionada con la resistencia mediada por la expresión del gen Rep, ubicado en antisentido en una construcción genética; y la segunda involucra el silenciamiento génico postranscripcional utilizando pequeños RNA interferentes que se basan en el silenciamiento génico dependiente de la homología (Chellappan *et al.*, 2004). Otra de las estrategias es la resistencia derivada del hospedero, en la que se potencializa la resistencia natural sobre expresando los genes de resistencia del hospedero.

1.5 Técnicas de secuenciación y análisis bioinformático

La secuenciación con plataformas de segunda y tercera generación han llegado para complementar la secuenciación tradicional por el método de Sanger, ya que permiten analizar un gran número de individuos y se obtiene una profundidad de secuenciación significativa de sus genomas o transcriptomas (López De Heredia Larrea, 2016). Las plataformas de secuenciación masiva permiten secuenciar en paralelo millones de fragmentos de ADN de múltiples individuos, lo que permite abaratar costos y el tiempo en que se realizan los experimentos (Schloss, 2008). Otras ventajas son que no es necesario clonar el ADN, ya que estas plataformas trabajan con bibliotecas genómicas preparadas en sistemas libres de células, se elimina el paso de la electroforesis para detectar las bases secuenciadas y además se implementan otras metodologías para acelerar el proceso. Además, la plataforma permite determinar un amplio espectro de polimorfismos genómicos, desde la variación de un único par de bases o mutaciones puntuales; inserciones, deleciones o duplicaciones genómicas (Van Dijk *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de sus considerables ventajas, la secuenciación masiva también presenta limitaciones que se van superando conforme se desarrollan nuevos avances en la tecnología. Una de las mayores limitaciones es el manejo del elevado volumen de datos generado en cada experimento, que requiere de ciertas destrezas en el manejo de técnicas bioinformáticas avanzadas y una adecuada infraestructura computacional que no siempre está al alcance de los grupos de investigación. Otro inconveniente es la ausencia de bases de datos y recursos -ómicos para especies no modelo, de las que se dificulta el análisis para investigadores no especializados. Las técnicas de secuenciación masiva deben abordar dos fases (Fig. 2): *in vitro* e *in silico*. La primera consiste en la construcción de bibliotecas genómicas de acuerdo a la

técnica ensayada, seguida de la secuenciación de dichas bibliotecas. La metodología para la construcción de bibliotecas es específica para cada técnica. La segunda fase comprende el análisis bioinformático de las lecturas generadas por la plataforma de secuenciación masiva seleccionada (López De Heredia Larrea, 2016). La plataforma condiciona las dos fases del análisis por lo que el investigador deberá seleccionar de acuerdo al tipo de análisis que desea implementar.



Tomado de (López De Heredia Larrea, 2016).

Figura 2. Procesos para realizar un experimento de secuenciación masiva.

Para el análisis bioinformático de las lecturas generadas por las plataformas de secuenciación masiva, que han mostrado notables avances en la tecnología de secuenciación del ADN se ha creado la necesidad de métodos de ensamblaje de genoma de novo, adaptados para trabajar con los nuevos tipos de datos de secuenciación. Al respecto muchos métodos se han publicado en los últimos años, pero el ensamblaje de datos de secuencia sin procesar para obtener un borrador del genoma sigue siendo un proceso complejo de varios pasos, que involucra varias etapas (Tritt *et al.*, 2012). La aplicación exitosa de estos pasos generalmente requiere un conocimiento profundo de un conjunto diverso de algoritmos y software. Las características reunidas para el desarrollo de un software de canalización de ensamblaje llamada A5 (Andrew And Aron's Awesome Assembly pipeline) (Tritt *et al.*, 2012) simplifica todo el proceso de

ensamblaje del genoma mediante la automatización de estas etapas y mediante la integración de varios algoritmos publicados anteriormente con unos nuevos para el control de calidad y la selección automatizada de parámetros de ensamblaje. Este software puede producir ensamblajes de calidad, sin ningún conocimiento previo del genoma particular que se está ensamblando y sin el ajuste extenso de parámetros requerido por otro algoritmo de ensamblaje. Los ensamblajes producidos por A5 exhiben una reducción del 50 % o más en las secuencias codificantes de proteínas rotas en relación con los ensamblajes de novo. A5 también puede ensamblar datos de secuencias de Illumina a partir de bibliotecas construidas por el protocolo Nextera (catalizado por transposones), que tienen características marcadamente diferentes a las bibliotecas cortadas mecánicamente. Para ensamblar un genoma es necesario implementar un flujo de trabajo de un procesamiento de datos completo que inicia con datos de secuencia sin procesar y termina con contigs (una serie de secuencias de ADN superpuestas que colectivamente forman una región genómica). Por lo general los pasos consisten en el recorte del adaptador, el filtrado de calidad, la corrección de errores, la creación de contigs, la verificación de contigs mediante la asignación de lecturas al ensamblaje y la creación/verificación de contigs (Coil *et al.*, 2015).

La versión A5 automatizó todos los pasos para generar ensamblajes de genomas bacterianos a partir de datos sin procesar de Illumina (Tritt *et al.*, 2012). El flujo de trabajo incluía cinco pasos, y los parámetros de cada paso se optimizaron en ensamblajes de arqueas halófilas y se probaron en *Escherichia coli*. Desde la divulgación de A5, la química de Illumina ha avanzado significativamente y los instrumentos MiSeq ahora son capaces de producir lecturas de más de 400 nt de largo, que es cuatro veces más de lo que era posible en un HiSeq 2000. El A5 original no podía procesar más de 150 nt, actualmente con las lecturas más largas es posible ensamblar genomas a partir de menos datos, lo que requirió revisiones y avances importantes de los algoritmos para el procesamiento de datos en A5. Por lo que A5-miseq, reemplaza varios componentes de la A5 original con nuevos módulos de software y produce ensamblajes sustancialmente mejorados (Coil *et al.*, 2015).

1.6 Silenciamiento de genes

El silenciamiento génico inicialmente denominado como fenómeno de co-supresión homóloga, fue descrito a partir de un intento por sobre expresar la chalcona sintasa (CHS) en pétalos de petunia mediante la introducción del gen CHS quimérico. En respuesta el gen introducido bloqueó la biosíntesis de antocianinas, con lo que un porcentaje de las flores fueron totalmente blancas y otras estampadas por sectores blancos o pálidos con fondo pigmentado. El RNAm de este gen se había reducido, mientras que en las flores blancas la expresión se había suprimido coordinadamente (Napoli *et al.*, 1990). Posteriormente, este fenómeno se utilizó con material genético de patógenos, los que demostraron que para la resistencia ante los virus era suficiente la presencia de la secuencia de RNA de la CP del potato virus Y (PVY), no traducible (van der Vlugt *et al.*, 1992). Tiempo después fue descrito el mecanismo biológico mediante el cual una dsRNA (doble cadena de RNA) provoca el silenciamiento de genes, RNA de interferencia del cual nace el nombre de RNAi (Fire *et al.*, 1998). Este mecanismo de RNAi está basado en el reconocimiento de secuencias homólogas, es adaptativo, sistémico y protege a la planta de ataques subsecuentes del mismo virus o de otros que presenten secuencias nucleotídicas similares (Tenllado *et al.*, 2004). El silenciamiento por RNA es un sistema regulado por RNAs pequeños que inhiben o suprimen las moléculas de ácidos nucleicos mediante interacciones específicas presentes y altamente conservadas en los organismos eucariotas como plantas, hongos y animales (Wang y Metzloff, 2005). En las plantas, el silenciamiento puede actuar a nivel transcripcional (TGS, transcriptional gene silencing) o post-transcripcional (PTGS, post-transcriptional gene silencing). Este mecanismo regula la expresión de genes para mantener la integridad del genoma, regula el crecimiento y desarrollo, funciona también como defensa a los ácidos nucleicos invasores al virus y es inducido por moléculas de RNA de doble cadena que activa una cascada de procesos enzimáticos dando como resultado la inhibición o supresión de ácidos nucleicos mediante interacciones específicas (Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009).

Las moléculas de dsRNA que inducen el silenciamiento pueden derivarse de la replicación viral, de repeticiones invertidas o de RNAs polimerasas dependientes de RNA (RDR) de ssRNA. Estas moléculas son procesadas por RNAsas III (en las plantas conocidas como DCLs, Dicer-like), en pequeños RNAs (small RNAs, sRNAs) nucleótidos de doble cadena de un tamaño de entre 19 a

25 nt con 2 o 3 nt protuberantes en los extremos 3' de las cadenas. Para que la dsRNA se produzca eficientemente es necesario que DRB (dsRNA binding protein) actúe con DCL (Landeo-Ríos *et al.*, 2017). El sRNA mediante una de sus hebras, se incorpora a un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC, RNA induced-silencing complex) que contiene la endonucleasa Argonauta (AGO). Una vez ensamblado, si es PTGS, el complejo será guiado por sRNA hacia un RNAm diana de secuencia complementaria al que se unirá e inducirá la inhibición de su traducción o su degradación. Sin embargo, si se trata de TGS, una vez que se una por complementariedad induce su metilación y con ello el bloqueo de su traducción. En otro caso en el que participa la RDR se generan nuevas moléculas de dsRNA que se procesan en sRNAs secundarios. Las estrategias de silenciamiento por RNA dirigido a otros organismos han desarrollado recientemente la aplicación externa de dsRNA a las plantas, denominándolo silenciamiento génico inducido por rociado, por sus siglas en inglés (SIGS spray-induced gene silencing). Wang y Jin (2017) demostraron que los tratamientos dsRNA suministrados de manera exógena son efectivos para inducir la resistencia correspondiente cuando se suministra previa o simultáneamente a la inoculación con el patógeno. Los siRNA secundarios son amplificados por RDR6 y DCL, luego se moverán a través del floema para inducir el silenciamiento sistémico en hojas superiores no pulverizadas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Begomovirus y secuenciación de alto rendimiento

Los métodos tradicionales de secuenciación carecen de la capacidad de discernir las secuencias virales menos abundantes y resultan ineficaces para determinar el grado de variabilidad en las poblaciones virales. Por otro lado, los begomovirus no codifican una polimerasa de ADN por lo que deben replicarse en el núcleo de la planta utilizando la polimerasa del hospedero y una forma del ADN de doble cadena mediante la replicación en círculo rodante (RCA, rolling circle amplification) (Bisaro, 1996). Por esta razón, el genoma completo de los begomovirus monopartita o bipartita se clonan a partir de los productos de RCA. Esta técnica utiliza la ADN polimerasa del bacteriófago phi29 para generar productos de alto peso molecular como los concatémeros de dsDNA que se digieren en componentes de longitud unitaria y se clonan completos (Johns *et al.*, 2009). Posteriormente, con estos productos también se puede realizar la caracterización mediante RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción). Luego entonces, para evaluar la diversidad de la población de begomovirus en las plantas naturalmente infectadas, la solidez de la ADN polimerasa se ha utilizado en la técnica de RCA, junto con la secuenciación profunda utilizando Illumina (Mardis, 2008) y la bioinformática (Idris *et al.*, 2014). Este tipo de enfoque favorece la exploración de la diversidad de los begomovirus en las plantas infectadas naturalmente.

2.2 RNA de interferencia (RNAi) y begomovirus

Una herramienta biotecnológica actual para combatir el fenómeno de las infecciones mixtas es el uso del silenciamiento génico transcripcional (TGS) o postranscripcional (PTGS) o también llamado RNA de interferencia (RNAi). El RNAi está involucrado en múltiples procesos que incluyen el control de la expresión génica, las modificaciones epigenéticas y se considera un sistema de defensa que proporciona la inmunidad adaptativa contra plásmidos, virus y otros elementos genéticos móviles (Raja *et al.*, 2010). Los siRNA con sus 21 nucleótidos tienen la capacidad de suprimir la expresión del gen deseado cuando presentan una transcripción de complementariedad perfecta con la cadena guía del siRNA, por lo que se asume que su silenciamiento es en extremo específico. Sin embargo, las evidencias han mostrado que el siRNA

podría regular genes no intencionados con complementariedades parciales principalmente a la región de siete nucleótidos del siRNA, lo que se conoce como efecto fuera de objetivo. Por lo que puede ser crítico elegir un siRNA específico al gen objetivo. En la actualidad hay diferentes softwares para esta tarea. El RNAi ha progresado como tecnología y se posiciona actualmente como el principal sistema inmunológico de la planta contra el virus, utilizando directamente el dsRNA de los genes de patógenos para proteger los cultivos (Kim *et al.*, 2019). Al respecto, el fenómeno de recuperación se ha descrito en las plantas de Chile, protegidas e inoculadas posteriormente con PepGMV, donde se observó una disminución en la severidad de los síntomas en las hojas recién desarrolladas. Las plantas recuperadas fueron resistentes a la re-inoculación con PepGMV, pero se infectaron cuando se les inoculó con otro begomovirus PHYVV. Este resultado sugiere que el silenciamiento por RNA es de secuencia específica, sin embargo se induce y se mantiene en los tejidos recuperados (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007). Otras evidencias muestran que las secuencias heterólogas también pueden activar el mecanismo de RNAi (Lin *et al.*, 2011; Mubin *et al.*, 2011). Este sistema ha sido estudiado en las plantas de nicotiana inoculadas con begomovirus como PepGMV, previamente protegidas con construcciones de doble cadena homólogas y heterólogas. En este caso, la eficacia para la disminución de los síntomas de severidad en la planta fue de 45 % con la construcción heteróloga y 80 % con la homóloga. Por otro lado, la incidencia se redujo 42.8 % y 57.2 % y la carga viral en un 95.6 % y 99.5 %, respectivamente (Medina-Hernández *et al.*, 2013). Las construcciones han sido dirigidas a los begomovirus y a sus betasatélites asociados, como las analizadas por Sharma y colaboradores en las que utilizaron regiones conservadas (TR1(AC1/AC2) y TR2(AC1/AC2/ β C1) del genoma del virus del enrollamiento de la hoja de Chile y del betasatélite asociado. Con ellas lograron una resistencia de amplio espectro contra varios begomovirus monopartitas y bipartitas y la acumulación de ADN viral se redujo en un 90% (Sharma *et al.*, 2015). En otro estudio se utilizaron dos genes del SLCuV para inducir resistencia a este virus; el primero fue un fragmento de 348 pb del gen de la proteína asociada a la replicación (Rep) y el segundo fue el gen completo de la proteína del movimiento (BC1) de 879 pb. Con el primero se registró un silenciamiento del 97% y evitó síntomas en la mayoría de las plantas hasta dos meses después de la infección, mientras que con el gen BC1 se redujo la acumulación de la carga viral en un 79% (Taha *et al.*, 2016).

2.3 Eficacia del RNA de interferencia

La interferencia del RNA (RNAi) es una herramienta útil y poderosa para la investigación de la función de los genes y se ha catapultado como una nueva estrategia terapéutica y antiviral mediada por fragmentos pequeños de RNA de doble cadena llamados siRNAs. Estos fragmentos, desempeñan un papel clave en la regulación de los genes ya sea durante el desarrollo de las plantas o como una respuesta inmune frente a las infecciones virales. Sin embargo, se ha descubierto que no todos los RNA pequeños (siRNA) son igualmente eficaces, ante lo cual se han desarrollado una serie de herramientas de software y plataformas en línea para la predicción de los siRNAs de alta eficacia (Holen, 2006; Naito *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2011). El uso de siRNAs se ha documentado con el objetivo de suprimir alelos mutantes con la especificidad de diferencia de un solo nucleótido que no afecta la expresión del alelo normal (Gonzalez-Alegre, 2007). Las moléculas antisentido también son candidatas para la supresión de alelos mutantes. No obstante la unión irreversible de estas moléculas hace que estos sistemas discriminen de manera deficiente los objetivos que difieren de un solo nucleótido. Como la relación uno a uno requiere altas concentraciones en la célula, esto pudiera resultar en situaciones tóxicas. No así las molécula en el sentido que exhiben multiplicidad, es decir, un solo siRNA puede causar la escisión de múltiples copias del RNAm diana (Allen *et al.*, 2013).

3. JUSTIFICACIÓN

Los begomovirus causan serias afectaciones a los cultivos hortícolas en la Península de Baja California desde hace aproximadamente 19 años. Sin embargo, el control de su dispersión se restringe al insecto vector *B. tabaci*. Por otro lado, se ha documentado que la eficiencia de los sistemas de silenciamiento derivados de las técnicas de RNAi han mostrado ser un modelo efectivo de protección transitoria en modelos planta/begomovirus. En estos modelos se ha observado la efectividad reconociendo secuencias homólogas y heterólogas, y que diversos componentes asociados a la expresión pueden influir en la eficiencia. Por esta razón, es importante determinar el estatus actual de los virus presentes en hortalizas y analizar la eficiencia del material genético de los begomovirus ToChLPV, PepGMV, TYLCV, CuLCrV y SLCuV, para activar el RNAi ante las infecciones sencillas y mixtas, como las observadas en áreas de cultivo.

4. HIPÓTESIS

Dado que la naturaleza de los begomovirus es asociarse entre sus especies e incluso con especies de otro género, entonces es posible encontrar evidencia de al menos una infección mixta en las hortalizas de Baja California Sur.

Si las construcciones que activan el RNAi proporcionan una eficiente protección en una infección begomoviral sencilla, entonces se podrá utilizar este mecanismo en el control de las infecciones begomovirales mixtas.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es realizar la caracterización molecular de los agentes causales asociados a las infecciones begomovirales sencillas y mixtas en hortalizas en BCS y evaluar la eficiencia del material genético de estos virus para activar el RNAi ante las infecciones sencillas y mixtas.

5.2 Objetivos particulares

Objetivo 1. Caracterización molecular de los agentes causales asociados a la infección begomoviral sencilla y mixta en hortalizas (solanáceas y cucurbitáceas) en BCS.

Objetivo 2. Realizar el análisis comparativo de la expresión de genes en plantas de *N. benthamiana* protegidas con secuencias homólogas y heterólogas ante una infección sencilla.

Objetivo 3. Evaluar la eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección con diferentes modelos begomovirales ante infección sencilla y mixta *in silico*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Objetivo 1. Caracterización molecular de los agentes causales asociados a la infección begomoviral sencilla y mixta en hortalizas (solanáceas y cucurbitáceas) en BCS.

6.1.1 Material biológico

Las muestras se recolectaron en áreas de cultivo de hortalizas ubicadas en localidades del estado de Baja California Sur, incluyendo el Valle de Santo Domingo en Ciudad Constitución 25°04'15.10"N, -111°37'13.24"O, El Pescadero 23°23'44.06"N, -110°10'28.10"O, San Juan de los Planes 23°55'56.44"N, -109°54'22.58"O, Todos Santos 23°28'15.30" N, -110°15'28.69"O y El Carrizal 23°50'24.87"N, -110°18'27.17"O. Las plantas de *S. lycopersicum*, *C. annuum*, *C. lanatus*, *C. pepo*, *C. sativus* y *C. melo* mostraron síntomas asociados a begomovirus como enrollamiento, arrugamiento, deformación, mosaicos, lento crecimiento, además de la presencia de altas poblaciones del insecto vector *B. tabaci*. Las muestras de las plantas sintomáticas -cinco de cada cultivo- y algunas asintomáticas también fueron recolectadas y conservadas en etanol al 70%, se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL, debidamente rotulados con datos del cultivo, lugar y fecha, se transportaron en hielera y se almacenaron a 4 °C. Los ácidos nucleicos totales se extrajeron de las muestras utilizando el método CTAB bromuro de hexadeciltrimetilamonio (ANEXO A) (Doyle, 1991). El ADN fue cuantificado con el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y almacenado a -20°C.

6.1.2 Detección de begomovirus en infección sencilla y mixta

La detección de los begomovirus se realizó con el método de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, polymerase chain reaction) utilizando oligonucleótidos degenerados con el par PAL1v1978/PAR1c496, que amplifica la parte del gen Rep, región intergénica y parte del gen CP en un fragmento de 1100 pb (Rojas *et al.*, 1993). Otros cebadores utilizados fueron los dirigidos a la cubierta proteica AC1048/AV494 que amplifican 550 pb (Wyatt y Brown, 1996). Para la amplificación de los fragmentos correspondientes, la reacción fue de 25 µL y contenía ADN en una concentración de 200 ng por 1 µL, 12.5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), 1 µL primers forward y reverse a 10 µM. La amplificación se realizó en un termociclador Arktik (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). La amplificación de los

fragmentos de ADN se realizó con una desnaturalización inicial de 2 min a 95 °C seguidos de 35 ciclos con desnaturalización por 40 s a 95 °C; el alineamiento de primers por 30 s a 60 °C (T° dependerá de los cebadores), una fase de elongación por 40 s a 72°C y un ciclo final de extensión a 72°C por 10 min. Los productos amplificados fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en presencia de SYBR safe DNA gel stain (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Estos fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar en ambos sentidos a Genewiz, South Plainfield, NJ, USA. Una vez recibidas las secuencias se limpiaron, se alinearon de acuerdo a su sentido con Molecular Evolutionary Genetics Analysis versión 10.0.5 (MEGA-X) y para una identificación preliminar se utilizó el algoritmo Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) para la comparación de las secuencias con otras disponibles en la base de datos de NCBI.

Los ácidos nucleicos totales de las muestras de las plantas que dieron positivo a begomovirus se utilizaron como plantilla para enriquecer los genomas virales mediante la técnica de la amplificación por círculo rodante (RCA, por sus siglas en inglés). Para lo cual se utilizó TempliPhi Kit (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, como se describe en el apartado 6.1.3. En la detección de SLCuV por PCR se utilizaron cebadores específicos dirigidos al ADN-A (SLCVA2295F/ *Xho*-SLCV-A-R y *Xho*-SLCV-A-F/SLCVA2314R) que amplifican un fragmento de 1.3 y 1.5 kb, respectivamente. En cuanto al ADN-B se utilizaron (SLCV-ADN-B1-F/SLCV-ADN-B1-R y SLCV-ADN-B2-F/SLCV-ADN-B2-R) que amplifican un fragmento de 1.3 y 1.6 kb, respectivamente, (Ali-Shtayeh *et al.*, 2014b). Por otro lado, para la detección de TYLCV obtenido del material vegetal de las plantas de tomate se utilizaron los primers (TYC1F/TYC1R), que amplifican un fragmento del gen Rep y la región intergénica en 856 pb c.

Para la amplificación del genoma completo de CuLCrV por PCR (ANEXO B) se utilizaron los oligonucleótidos específicos sobrepuestos que amplifican el ADN-A (CuLCrVA-*Eco*RI-V/CuLCrVA-*Eco*RI-C) y el ADN-B (CuLCrVB-*Apal*-V/CuLCrVB-*Apal*-C) (Hagen *et al.*, 2008). El tamaño de fragmento esperado para cada componente es de 2.6 kb. Los productos amplificados con oligonucleótidos específicos fueron visualizados mediante electroforesis en gel con las condiciones mencionadas anteriormente; los productos esperados se ligaron al vector pGEM-T easy (Promega, Madison, WI, USA). Los plásmidos recombinantes se enviaron a secuenciar por

el método de Sanger por ambos sentidos a Genewiz desde diciembre de 2021 Azenta, (South Plainfield, NJ, USA).

6.1.3 Amplificación por círculo rodante (ACR)

La enzima phi29 (del Kit de amplificación de DNA ilustra GenomiPhi V2, GE Healthcare) y el ADN genómico, se utilizaron para enriquecer el genoma completo de los begomovirus monopartita o bipartita de acuerdo a lo siguiente. A 1 μL de la plantilla se le agregan 8 μL de la solución de la muestra 10 X incluida en el kit, seguido de la desnaturalización de las muestras a 95 $^{\circ}\text{C}$ por 3 min y después se incubaba a temperatura ambiente por 10 min. Se agregan 8 μL de la solución de reacción II incluida en el kit y 0.2 μL de la enzima Phi29. Se incubaba a 30 $^{\circ}\text{C}$ por 18-20 hrs. A continuación, se inactiva la enzima incubando la muestra a 65 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Las muestras se corren en un gel de agarosa al 1 %.

6.1.4 Análisis de begomovirus mediante la secuenciación de alto rendimiento

Con el objetivo de evaluar la diversidad de la población de begomovirus en las plantas infectadas naturalmente los productos de RCA enriquecidos se enviaron a Illumina en California, USA donde se sometieron a Illumina-Next Generation Sequencing (NGS) en un equipo Novaseq 6000 system. El procedimiento se hizo de acuerdo al protocolo descrito para el kit de preparación de bibliotecas DNA Prep de Illumina en la guía de esta compañía (Illumina Inc., 2016).

6.1.4.1 Preparación de bibliotecas

El kit para la preparación de bibliotecas DNA Prep de Illumina (Illumina Inc., 2016), utiliza un complejo transposómico basado en perlas para marcar el ADN genómico. Este es un proceso que fragmenta el ADN y posteriormente lo marca con secuencias adaptadoras en un solo paso. Una vez saturado con el ADN de entrada, el complejo transposómico que se basa en microesferas fragmenta un número determinado de moléculas de ADN. Esta fragmentación proporciona cierta flexibilidad que permite utilizar una amplia gama de ADN de entrada para generar bibliotecas normalizadas con una distribución de fragmentos de tamaños consistente y ajustada. Un paso posterior de limpieza con perlas de purificación Illumina (IPB) purifica las

bibliotecas para su uso en un sistema de secuenciación Illumina. La biblioteca de ADN de doble cadena se desnaturaliza antes de la hibridación del conjunto de oligonucleótidos de la sonda de biotina.

Las muestras se incorporaron a un proyecto para el cual se prepararon 7000 librerías, se utilizaron insertos de aproximadamente 500 pb flanqueados por secuencias adaptadoras ubicadas en los extremos que se componen de una secuencia de un primer universal que permite secuenciar fragmentos de muestras que no son conocidas con lo que se puede realizar resecuenciación o secuenciación de novo, es decir no se necesita conocer el DNA inicial para realizar la secuenciación. Seguido de una secuencia index distinta para poder identificar a que muestra corresponde cada uno de los fragmentos, posterior a la secuenciación y en la región final se ubicaron los oligos P5 y P7 que permiten que las moléculas de DNA hibridicen en la flow cel. Para la secuenciación se corrieron las cuatro líneas de la flow cel S4, en el equipo Novaseq 6000 system en el que se esperan mínimo 100 millones de lecturas por librería, se realizaron 300 ciclos de los que se obtuvieron lecturas pareadas 2 x 150 pb.

6.1.4.2 Análisis Bioinformático

Una vez obtenidas las secuencias de Illumina fueron analizadas y ensambladas en la plataforma Linux. Para este propósito se utilizó pipeline A5-miseq que puede producir ensamblajes de genomas de alta calidad mediante la automatización del proceso de recorte de los adaptadores, filtrado de calidad, corrección de errores, generación de contig y detección de errores de ensamblaje. A5-miseq a diferencia de A5, puede usar lecturas largas de Illumina MiSeq, usar información de emparejamiento de lectura durante la generación de contig e incluye mejoras en el recorte de lectura. Estos cambios permiten ensamblajes mejorados que recuperan un conjunto más completo de genes de referencia que los métodos anteriores (Coil *et al.*, 2015).

Pipeline A5-miseq consta de cinco pasos:

1. Limpieza de lectura: Trimmomatic elimina los adaptadores de secuencia y las regiones de baja calidad (Lohse *et al.*, 2012). Luego, los errores en las lecturas los corrige utilizando el algoritmo de corrección de errores basado en k-mer de SGA (Simpson y Durbin, 2012).

2. Ensamblaje de Contig: en este paso utiliza lecturas emparejadas y no emparejadas para ensamblar con el algoritmo IDBA-UD (Peng *et al.*, 2012).

3. Ensamblaje crudo: los contigs se arman con cualquier biblioteca de inserción grande disponible utilizando parámetros permisivos.

4. Para la corrección de errores de ensamblaje: Los errores se detectan sobre la base de pares de la lectura que no se asignan en de la distancia esperada. Los contigs y los andamios que contienen montajes erróneos se rompen.

5. Montaje final: en una ronda final de ensamblaje con parámetros estrictos se repara cualquier contig. En esta etapa también se producen estadísticas de resumen de ensamblaje y estimaciones de calidad de la llamada base.

Para esto se utiliza `a5_pipeline.pl read1.fastq read2.fastq` y el nombre que se designará al archivo resultado.

Otro ensamblador NGS que se utilizó fue MEGAHIT en su versión 1.2.9 que permite el ensamblaje de datos metagenómicos grandes y complejos y también el ensamblaje de genomas pequeños, no necesita ningún procesamiento previo (Li *et al.*, 2015). Para esto se utilizó: `megahit --k-list 75,95` (lista valores a usar en el ensamblaje, dependerá de la longitud de las lecturas) `--k-min-value 3` (para eliminar k-mers que aparecen en menos de tres lecturas) `-m 120` (indica la memoria ram máxima que se utilizará para el ensamblaje) `-t 15` (de acuerdo a especificaciones de la computadora y el tamaño del conjunto de datos) `-1 fastq_calidad/nombre de archivo1.trim.fastq.gz -2 fastq_calidad/ nombre de archivo2.trim.fastq.gz -o MEGAHIT_output/`

Posteriormente, una vez ensambladas las secuencias se determinaron las de origen viral (Madden, 2003). Con `blastn -query final.contigs.fasta -db ../../Blastdb/(nombre de archivo) -outfmt "6 qseqid pident qstar qend sstart send evaluate qlen stitle" -num_alignments 5 -out (nombre archivo).txt`

Las secuencias de genomas de begomovirus, superiores a 2500 pb fueron separados, visualizados y editados manualmente utilizando SnapGene (<http://www.snapgene.com>, GSBL Biotech) y MEGA-X.

6.1.5 Identificación y caracterización de begomovirus y curtovirus

Los genomas completos de begomovirus obtenidos tanto por el método de secuenciación Sanger, como por secuenciación NGS, se analizaron para su identificación mediante la comparación por pares de bases de los genomas completos de los monopartit, y el ADN-A completo de los bipartita. Este proceso se llevó a cabo de acuerdo a los criterios de demarcación de las especies descritos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). Estos criterios indican que debe clasificarse como perteneciente a la especie con la que comparte ≥ 91 % de identidad de secuencia nt del genoma completo o como perteneciente a la cepa con la que comparte ≥ 94 % de identidad de secuencia del genoma completo (Brown *et al.*, 2015). Tal es el caso de las secuencias de CuLCrV obtenidas para las que se utilizaron como referencia las secuencias del aislado CuLCrV-California ADN-A y B (AF224760 y AF224761, respectivamente). De igual forma para los otros begomovirus se utilizaron como referencia las secuencias de los aislados con mayor identidad por pares de bases. En el caso del Curtovirus se utilizó como referencia la secuencia del beet curly top virus AY548948. Para este objetivo se siguieron los criterios para establecer el estado taxonómico, que indican que debe haber un 77 % de identidad por pares en todo el genoma como umbral de demarcación de las especies y un 94 % de identidad por pares en todo el genoma como umbral de demarcación de cepas (Varsani *et al.*, 2014). Para el alineamiento y análisis de las secuencias se utilizó ClustalW, en MEGA-X, Geneious Prime. Los marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés) para las secuencias de begomovirus monopartita y bipartita (ADN-A y ADN-B) y del curtovirus, se identificaron utilizando la plataforma en línea de NCBI (National Center for Biotechnology Information), buscador de ORF. ORF finder <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

6.1.6 Preparación de microcarriers y formación de cartuchos de ADN

Con el producto obtenido de RCA, los microcarriers o cartuchos de ADN se prepararon de acuerdo a la metodología para la pistola de alta presión Helios Gene Gun System (BioRad,

Hercules, CA, USA) y las recomendaciones de esta metodología modificada (López-López *et al.*, 2013). El procedimiento para preparar 45 cartuchos aproximadamente es el siguiente: se pesan 25 mg de microcarriers de oro de 0.6 o 1.6 μm de diámetro (BioRad, Hercules, CA, USA) en un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL; se adicionó espermidina 0.05 M, se agitó vigorosamente por 1 min con vortex y se efectuó sonicación de 3-5 s usando un limpiador por ultrasonido. Luego se adicionaron 50 μL (50 μg de ADN del begomovirus), en el caso de ser bipartita (50 μL ADN A + 50 μL ADN B) y se homogenizó vigorosamente la mezcla de ADN, espermidina y el oro por 5 s utilizando el vortex; mientras se mezclaba la solución se agregó gota a gota 50 μL de cloruro de calcio 1M. El volumen adicionado debe ser igual a la espermidina. Se dejó que la mezcla precipitara a temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó por 15 segundos, se eliminó el sobrenadante; se resuspendió el precipitado con el sobrenadante remanente y se dio vortex brevemente. La pastilla se lavó con 1 mL de etanol al 100 % fresco; se centrifugó por 5 s y se desechó el sobrenadante. El lavado se repitió dos veces más. Finalmente, la pastilla se re-suspendió en 100 μL de PVP (polivinil pirrolidona) al 5% en etanol; esta suspensión se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 mL y se adicionaron nuevamente 100 μL de la solución diluida de PVP, se selló el tubo con Parafilm y se almacenó ADN/microcartuchos a -20°C hasta ser utilizado (se puede almacenar hasta 2 meses). Para el revestir el tubo con el ADN/microcartuchos para la formación de cartuchos se conectó en la estación de preparación de cartuchos de micropartículas Tubing Prep Station (Fig. 3A) (BioRad, Hercules, CA, USA) el tanque de nitrógeno (Fig. 3B). Se insertaron 75 cm de tubo Tefzel (Fig. 3C) (BioRad, Hercules, CA, USA) en la estación y se extrajo la humedad pasando por el tubo 0.4 LPM de nitrógeno por 15 minutos. Se apagó el flujo de nitrógeno e inmediatamente se retiró el tubo de la estación. Se agitó la suspensión de ADN/microcartuchos, se llevó el volumen de la suspensión a 3 mL totales, se dio vortex y se invirtieron los tubos varias veces para re suspender el oro (en caso de ser necesario se puede sonicar brevemente para evitar grumos de oro). Con los 3 mL de la suspensión ADN/microcartuchos y con ayuda de una jeringa de 10 cc se llenó el tubo, evitando que se formaran burbujas. Inmediatamente el tubo lleno se introdujo a la estación con la jeringa adjunta. Se dejaron reposar los microcartuchos por 5 min y se marcaron con tinta indeleble los extremos que abarca la suspensión. Se removió el etanol del tubo, a una velocidad de 0.5-1.0 pulgadas por segundo con ayuda de la jeringa. La jeringa se desconectó, el tubo se giró 90° y se

dejó reposar por 2 s, se rotó nuevamente 90° y se dejó reposar otros 2 s, a continuación se encendió la estación para girar el tubo por 5 min. Para que el oro se adhiriera en el tubo se dejó durante 30 s y se abrió la válvula del nitrógeno para permitir un flujo de 0.4 LPM. El tubo se dejó girar durante 5 min. Posteriormente, se apagó la estación, se cerró la válvula del nitrógeno y se retiró el tubo recubierto con los microcartuchos de oro. Terminado el proceso, se segmentó el tubo con un cortador de tubos a una medida uniforme. Los cartuchos se almacenaron con desecante, en un frasco sellado con Parafilm a 4°C.

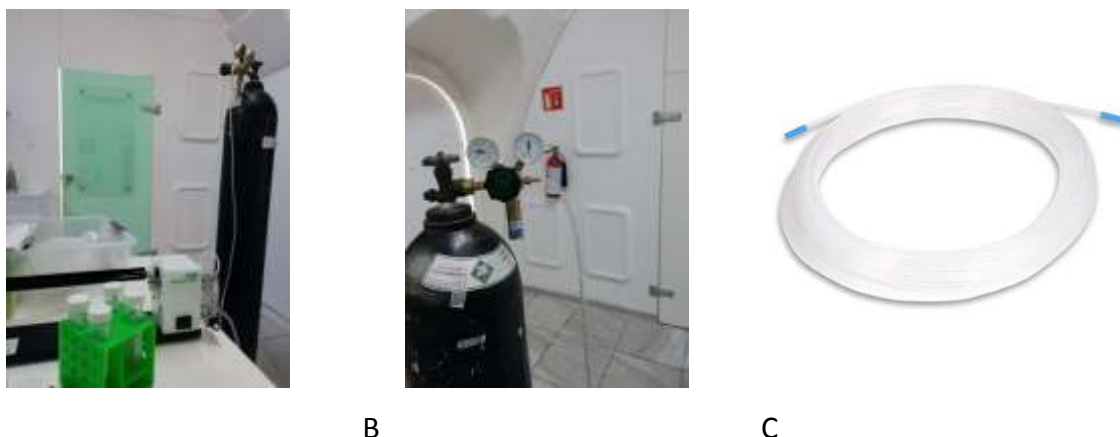


Figura 3. Estación de preparación de cartuchos de micropartículas e implementos. **A.** Estación de preparación de cartuchos de micropartículas Tubing Prep Station, BioRad conectada a tanque de nitrógeno para retirar la humedad del tubo antes y después de adherir el ADN/microcartuchos de los begomovirus utilizados. **B.** Válvula reguladora para control de presión de nitrógeno. **C.** Tubo Tefzel de BioRad al que se adhiere el ADN/microcartuchos.

6.1.7 Diseño de bioensayo e inoculación de plantas con los begomovirus SLCuV y CuLCrV

Las semillas de *N. benthamiana* y *C. pepo* se germinaron en una cámara de germinación a una temperatura de 28°C, con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Cuando las plantas jóvenes de *N. benthamiana* y *C. pepo* (cinco de cada una) tuvieron entre cuatro o cinco hojas verdaderas fueron inoculadas con los begomovirus SLCuV y CuLCrV, tanto en infección sencilla como en mixta. Para este propósito, se utilizó el método de biobalística una pistola de aceleración de partículas de alta presión Helios Gene Gun System (BioRad, Hercules, CA, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a lo previamente documentado (López-López *et al.*, 2013), utilizando partículas de tungsteno estériles adheridas de ADN de begomovirus. Como control negativo se mantuvieron las plantas que no fueron inoculadas, libres de virus. Después

de la inoculación, las plantas permanecieron en el área de los organismos genéticamente modificados acondicionada para evitar la entrada de insectos. Todos los días se supervisó para el mantenimiento de las plantas; la recolección de muestras se realizó dos semanas después de la inoculación con los virus cuando se observaron síntomas asociados a los begomovirus. Las muestras recolectadas se almacenaron en tubos de eppendorf de 2 ml en etanol al 70 % a 4 °C, debidamente etiquetadas.

6.1.8 Determinación de la presencia de SLCuV y CuLCrV en plantas inoculadas

Las muestras de las plantas de *N. benthamiana* y *C. pepo* se procesaron para la extracción de ácidos nucleicos totales con el método CTAB (Doyle, 1991). El ADN se cuantificó con el espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) y se almacenó a -20 °C. Posteriormente, mediante el uso de los oligonucleótidos específicos, antes mencionados, se confirmó la presencia del SLCuV y CuLCrV tanto para el ADN-A como para el ADN-B en las plantas inoculadas en infección sencilla y mixta. Los fragmentos obtenidos se enviaron a secuenciar por el método de Sanger a Azenta, (South Plainfield, NJ, USA). Otra parte del ADN extraído se envió para la secuenciación masiva mediante Illumina, en San Francisco, CA.

6.2 Objetivo 2. Realizar el análisis comparativo de la expresión de genes en plantas de *N. benthamiana* protegidas con secuencias homólogas y heterólogas en una infección sencilla

6.2.1 Bioensayo de plantas de *Nicotiana benthamiana* y construcciones de protección

Se utilizaron plantas de *N. benthamiana* protegidas con secuencias homólogas CIRP (construcción derivada de la región intergénica del PepGMV) y con secuencias heterólogas, CIRT (Construcción de la región intergénica del ToChLPV) en un bioensayo de cuatro tratamientos, (Medina-Hernández *et al.*, 2013) (ANEXO C) para evaluar los componentes centrales que interactúan durante la activación del mecanismo de silenciamiento génico.

6.2.2 Microarreglos y análisis de datos

Para el análisis comparativo del perfil de expresión global de los genes en las plantas experimentales de *N. benthamiana* se utilizó el chip de *Arabidopsis thaliana* V.3.0.3. Para obtener el RNA total que se utilizó en los microarreglos se obtuvieron tres hojas de cada planta

y se almacenaron a -80°C . El RNA total se extrajo usando TRizol (Invitrogen, Massachusetts, USA) y se utilizaron $10\ \mu\text{g}$ para la síntesis de DNA complementario (DNAC) con la incorporación de fluoróforos dUTP-Alexa Fluor 555 o dUTP-Alexa Fluor 647. Se mezcló la misma cantidad de DNAC marcado de control positivo con CIRP o CIRT y se hibridó en el chip de *Arabidopsis thaliana* V.3.0.3 durante 114 h a 42°C con la solución de hibridación UniHyb (ArrayIt). Se calcularon los valores medios de fondo de la densidad de cada punto de Alexa 555 y Alexa 647, se procesaron y cuantificaron las imágenes obtenidas de la hibridación de los microarreglos con el software Array-Pro Analyzer versión 6.3. La paquetería genArise (Desarrollada por la Unidad de Informática del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM) se utilizó para analizar los datos de microarreglos y se seleccionaron los genes que se expresan significativamente de manera diferencial entre clases de muestras. Los datos se normalizaron y se calculó la media y la desviación estándar de la distribución de los valores \log_2 (ratio) para definir una diferencia en el cambio global (fold-change o Z-score) y en la confianza.

Para el análisis de la Ontología Génica (GO, Gene Ontology), las ID obtenidas de la micromatriz se cargaron en la base de datos del Recurso de Información de *Arabidopsis* (TAIR) para convertirlas al formato FASTA. Posteriormente cada secuencia se cargó en Blast2GO versión 5.2.1 (Conesa *et al.*, 2005; Götz *et al.*, 2008) usando parámetros de 20 aciertos por secuencia, valor esperado $< 1 \times 10^3$ y se buscó en la base de datos la “nr” no redundancia. Una vez identificados los nombres de todos los genes, se obtuvieron códigos de evidencia (CE) que mostraban los valores del índice de confiabilidad de la anotación GO y se realizó el mapeo de cada gen en la base de datos GO. Se utilizó una prueba exacta de Fisher de una cola para eliminar los identificadores dobles y un corte de tasa de descubrimiento falso (FDR) de 0.01 para verificar una sobre representación significativa de anotaciones GO. El enriquecimiento de un término GO se consideró significativo en $P < 0.05$. Después del mapeo se realizó una anotación de cada gen y todas las enzimas se marcaron utilizando la base de datos de la enciclopedia de Kyoto de genes y genomas (KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Las anotaciones obtenidas de Tair se localizaron en diferentes bases de datos de ensamblajes del genoma y transcriptoma de *N. benthamiana* disponibles, como el borrador generado por el Instituto Boyce Thompson para investigación de plantas, identificado como: Niben0.4.4 (NbS000) y Niben1.0.1 (Bombarely *et al.*, 2012), así como Nbv3K, Nbv6.1 (Nakasugi *et al.*, 2013) y la re

anotación más reciente identificada con NbD (Kourelis *et al.*, 2018). Posteriormente los datos se etiquetaron de acuerdo con las familias de proteínas InterPro (Conesa y Götz, 2008).

6.2.3 Análisis de la expresión diferencial de genes

Los genes regulados al alza con puntuación $Z \leq 1.50$ a 3.0 se seleccionaron del análisis de microarreglos para analizar la expresión diferencial de los genes implicados en la respuesta y activación de RNAi por secuencia homóloga y heteróloga al begomovirus PepGMV. Se llevó a cabo una búsqueda de genes clave relacionados con las rutas de silenciamiento por RNA, como Argonautas (AGO), proteínas Dicer (DCL) y RNA polimerasas dependientes de RNA (RdRP), utilizando las herramientas GO y TAIR descritas con anterioridad. Para determinar los efectos de la expresión diferencial de genes e interpretar los resultados en el contexto de las interacciones proteína-proteína se realizó un análisis en la base de datos biológicos y recursos web de conocidas y predichas interacciones proteína-proteína (STRING, Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins) versión 9.1. La conexión de red STRING está restringida a aquellos genes que están relacionados con RNAi (Franceschini *et al.*, 2012; Szklarczyk *et al.*, 2016).

6.2.4 RT-qPCR análisis de expresión diferencial de genes

Para realizar este análisis, el RNA se trató con DNasa 1U/ μ L (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA), para eliminar el ADN genómico. La primera hebra de DNAc se sintetizó a partir de 5 μ g de RNA total con SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) según las instrucciones del fabricante. La actina (ACT) se utilizó como gen de control interno para la normalización, debido a que su nivel de expresión es similar en todas las infecciones por virus y a su eficiencia en la amplificación por PCR. Se utilizaron las moléculas DCL1, DCL2, DCL3, DCL4, AGO1-1, AGO2, polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6, RNA-DEPENDENT POLYMERASE 6) y la proteína de repetición pentatricopeptídica (PPR, pentatricopeptide repeat protein), involucradas en el mecanismo de RNAi de acuerdo a (Liu *et al.*, 2012) y (Wu *et al.*, 2014), así como los oligonucleótidos presentados en la Tabla 2. El qPCR se realizó por triplicado en termociclador de 96 pocillos (CFX-96, BioRad, Hercules, CA, USA) utilizando SsoFast EvaGreen Supermixes (BioRad, Hercules, CA, USA), en un volumen final de 20 μ L por reacción. En las siguientes condiciones: un ciclo a 95°C durante 30 s y 39 ciclos a 95°C por

0.05 s y 60°C durante 0.05 s. Después de la amplificación, se realizó un análisis de la curva de fusión para verificar los productos amplificados por sus temperaturas de fusión específicas (T_m) de 65°C a 95°C con incrementos de 0.5°C/0.05 s. Se usó control que no contenía ADN en cada análisis. Los resultados son de tres réplicas biológicas independientes ($n = 3$). La eficiencia de la amplificación (E), $E = 10^{-1/\text{pendiente}} \times 100\%$, se determinó de acuerdo con las directrices MIQE para los experimentos de RT-qPCR. Los datos de RT-qPCR se normalizaron con respecto al gen de referencia Ct (Tabla 2). La expresión relativa se obtuvo mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$, donde $\Delta\Delta CT = ((CT_{1\text{Target}} - C_{1\text{Reference}}) - (CT_{0\text{Target}} - C_{0\text{Reference}}))$, (Livak y Schmittgen, 2001). La significancia estadística se determinó al 99 % de confianza y el análisis de varianza de una vía (ANOVA) se determinaron con SPSS Statistics versión 22.0 (IBM, Corporation, 2013).

Tabla 2. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para el análisis RT-qPCR de expresión de genes en muestras de plantas protegidas con CIRT y CIRP.

Primer	Secuencia (5'-3')	Referencia
DCL2F	CGGGATCCCCGGGATTTATTCGTAAT	
DCL2R	CCCTCGAGAATGACAAAGCCGCTACT	
DCL3F	ACTTGTTGAATGCGGTGAAG	
DCL3R	CCCCTGTCGTTCTAGCTCAT	(Wu <i>et al.</i> , 2014)
DCL4F	CGTCCGTGCCAGAAATCT	
DCL4R	AATGCAATTGCCGCTTTGA	
AGO1F	GCTCTAGAAGATCTGTACAAGACTTGGC	
AGO1R	CGAATTCTTATTGGCAAACAACCTAGT	
AGO2F	CATTTGAACCTCCTTTCTATCGAC	
AGO2R	CATACCTCTAGAAGTGAGGATCAC	
RDR6F	TTCAGGAATGTCTTCTTCGAGCG	
RDR6R	AGTGATCTAGCAACCCAATGAG	(Liu <i>et al.</i> , 2012)
PPR1	ATGAGGGTCCATTTGAGTGAC	
PPR1	AGGCTGATGTTGGAATCTGG	
ACT	TCCTGATGGGCAAGTGATTAC	
ACT	TTGTATGTGGTCTCGTGGATTC	

6.3 Objetivo 3. Evaluar la eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección con diferentes modelos begomovirales ante infección sencilla y mixta in silico

6.3.1 Determinar la identidad de los fragmentos propuestos para las construcciones dsRNA de cinco begomovirus

Para iniciar la evaluación de la eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección ante la infección begomoviral sencilla y mixta con PepGMV, ToChLPV, TYLCV, CuLCrV y SLCuV, se utilizó software libre de Bioinformática como SnapGene, MEGA X, para realizar alineamientos de las secuencias con los siguientes números de acceso GenBank: NC_004101, AY339619, KX427166, MN625831 y MF187211, con los primers degenerados PAL1v1978/PAR1c496 con la finalidad de obtener los fragmentos que abarcan parte del gen Rep, región intergénica y parte del gen CP (Rojas *et al.*, 1993), que se proponen para la generación de las construcciones dsRNA. Con el software libre Geneious Prime se realizó un análisis de identidad por pares de los fragmentos de los genomas obtenidos con los cebadores degenerados (PAL1v1978/ PAR1c496) (Rojas *et al.*, 1993), que amplifican la región denominada (AC1-RI-AV1), de las secuencias de los begomovirus PepGMV (NC_004101), ToChLPV (AY339619), TYLCV (KX427166), CuLCrV (MN625831) y SLCuV (MF187211).

6.3.2 Determinación de siRNAs con mayor eficacia de cinco begomovirus

Con los fragmentos de los begomovirus PepGMV (AC1-RI-AV1), ToChLPV (AC1-RI-AV1), con los cuales fueron desarrolladas las construcciones de doble cadena mencionadas en el objetivo anterior y los fragmentos de TYLCV (AC1-RI-AV1), CuLCrV (AC1-RI-AV1) y SLCuV (AC1-RI-AV1), propuestos para las construcciones dsRNA se realizó un análisis de predicción de la eficacia de siRNA utilizando la plataforma en línea siPRED (Pan *et al.*, 2011).

6.3.3 Integración de la base de datos del género begomovirus

Se integró una base de datos que incluyen todas las secuencias asociadas a las 445 especies del género *Begomovirus*, actualizada en octubre 2020 por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus; se incluyeron las secuencias de los begomovirus reportados en la región. La base de datos se procesó en el Software Blast2Go versión 5.2.5 (Götz *et al.*, 2008).

6.3.4 Determinación de la eficiencia de siRNAs en infección sencilla y mixta

Con la finalidad de establecer cuál de las construcciones sería la más efectiva en un sistema de protección que activa el mecanismo de RNAi ante una infección sencilla y mixta por los begomovirus PepGMV, ToChLPV, TYLCV, CuLCrV y SLCuV *in silico* se realizó el análisis blastn local para la hibridación de los siRNAs obtenidos de los cinco begomovirus. Se tomaron como objetivo los diferentes genomas del género begomovirus de la base de datos, el análisis se realizó en el Software BlastGo2 versión 5.2.5 (Götz *et al.*, 2008) y su versión actualizada OmicsBox. En cada caso se determinaron los alineamientos significativos de los siRNAs con las secuencias de los genomas que hibridaron y la identidad por pares de cada siRNA con los respectivos genomas. Los datos obtenidos se analizaron con el uso del software Matlab. Finalmente, se determinó la historia evolutiva de los genomas hibridados por los siRNAs derivados de cada construcción mediante filogenia por el método de Máxima verosimilitud (Maximum Likelihood), utilizando el programa MEGA X, Molecular Evolutionary Genetics Analysis en su versión 11.

7. RESULTADOS

7.1 Objetivo 1. Caracterización molecular de los agentes causales asociados a la infección begomoviral sencilla y mixta en hortalizas (solanáceas y cucurbitáceas) en BCS.

7.1.1 Begomovirus en cultivos de hortalizas

Se realizaron inspecciones en diferentes áreas de cultivo en el estado de Baja California Sur, incluyendo El Valle de Santo Domingo en Cd. Constitución, El Pescadero, Todos Santos, San Juan de los Planes y El Carrizal, con el objetivo de realizar la caracterización molecular de los agentes causales asociados a enfermedades begomovirales, causadas por la infección sencilla y mixta en hortalizas. Se recolectaron muestras de plantas de *S. lycopersicum*, *C. annuum*, *C. lanatus*, *C. pepo*, *C. sativus* y *C. melo*, que mostraban síntomas asociados a begomovirus (Fig. 4) como enrollamiento, arrugamiento, clorosis, deformación, mosaicos, lento crecimiento, además se observó la presencia de altas poblaciones del insecto vector *B. tabaci*.

En relación a los síntomas presentados en las diferentes especies, en *C. pepo* se observaron principalmente hojas con deformación severa y clorosis (Fig. 4A). En *C. melo* se observaron síntomas de mosaico, moteado y clorosis (Fig. 4B). Las plantas de *C. sativus* mostraron hojas cloróticas y enrolladas (Fig. 4C), mientras que en *C. lanatus* se observaron hojas cloróticas y con mosaicos (Fig. 4D). Por otro lado, las plantas de *S. lycopersicum* mostraron síntomas severos de enchinamiento, clorosis, mosaicos y deformación (Fig. 4E) mientras que otras mostraron síntomas menos severos solo con mosaicos. Las plantas de *C. annuum* mostraron clorosis, mosaicos y deformación de las hojas (Fig. 4F). En general un síntoma común en las cucurbitáceas y el tomate, fueron sus hojas de tamaño reducido. Para determinar la incidencia en campo, se cuantificaron 80 plantas en puntos del cultivo al azar (cinco repeticiones). Los datos obtenidos indicaron que la incidencia media de las plantas cucurbitáceas con síntomas oscila del 20 al 50 %; siendo el 20 % en pepino, el 28 % en melón, 30 % en sandía y 50 % en calabaza. En cambio, en solanáceas osciló entre el 80 y el 90 %, siendo el 80 % en plantas de chile y el 90 % en plantas de tomate.



Figura 4. Síntomas representativos observados en hortalizas en BCS, asociados a begomovirus. **A.** *C. pepo* presentó hojas con deformación severa y clorosis. **B.** *C. melo* presentó síntomas de mosaico, moteado, clorosis. **C.** *C. sativus* presentó hojas cloróticas y enrollamiento. **D.** *C. lanatus* mostró hojas cloróticas y mosaicos. **E.** *S. lycopersicum* mostró síntomas severos de enchinamiento, clorosis, mosaicos y deformación. Un síntoma común en las cucurbitáceas y el tomate fueron sus hojas de tamaño reducido. **F.** *C. annuum* mostró clorosis, mosaicos y deformación de las hojas (asociados a curtovirus).

7.1.2 Detección begomovirus en infección sencilla y mixta en hortalizas de BCS

Se detectó la presencia de begomovirus en las muestras de plantas hortalizas, de las que se extrajeron los ácidos nucleicos totales utilizando el método CTAB (Doyle, 1991), posteriormente

fueron visualizados en un gel de agarosa al 1 % y se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA). Debido a que se obtuvo una alta concentración de ácidos nucleicos, se realizaron las diluciones correspondientes de acuerdo a la ADN polimerasa (50 – 250 ng/ μ L) utilizada para realizar la técnica de PCR. El ADN se utilizó para la detección de los begomovirus, inicialmente con primers degenerados (Rojas *et al.*, 1993) y/o otro par que amplifica CP (Wyatt y Brown, 1996). Se obtuvieron fragmentos de 550 y 1100 pb (Fig. 5A) los cuales se confirmaron mediante la técnica de electroforesis en gel. Los productos obtenidos se enviaron a secuenciar, tal como se describe en materiales y métodos. Las secuencias obtenidas por el método de Sanger, se limpiaron y se alinearon en la plataforma Blastn de NCBI contra la base de datos de secuencias de nucleótidos, posteriormente se utilizó MEGA-X para alinear las secuencias con las que hubo mayor identidad. El resultado preliminar confirmó la presencia de SLCuV, CuLCrV y ToChLPV. Por lo que, las muestras con resultado positivo se utilizaron como molde para enriquecer el ADN mediante la técnica de amplificación por círculo rodante, siguiendo el protocolo del fabricante, como se describe en la metodología. Se obtuvo la amplificación de fragmentos (Fig. 5B) y genomas completos de los virus utilizando este producto mediante la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos. Por ejemplo, se obtuvo el genoma completo de CuLCrV utilizando parte del producto enriquecido con oligonucleótidos específicos sobrepuestos que amplifican el ADN-A (CuLCrVA-*Eco*RI-V/CuLCrVA-*Eco*RI-C) y el ADN-B CuLCrVB-*Apal*-V/CuLCrVB-*Apal*-C (Hagen *et al.*, 2008), se observaron los fragmentos esperados para cada componente (Fig. 5C). Todos los productos obtenidos se enviaron a secuenciar por ambos sentidos.

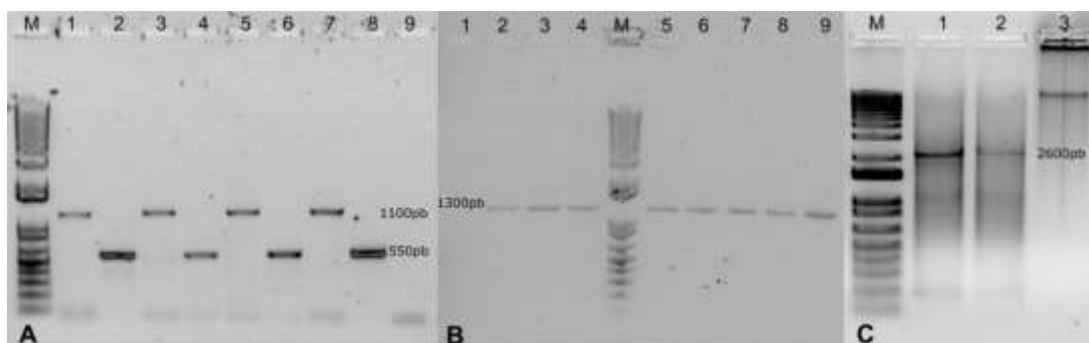


Figura 5. Detección de begomovirus con cebadores degenerados y específicos. **A.** Carril 1, 3, 5 y 7, muestran el fragmento de 1.1 kb, carril 2, 4, 6 y 8, muestran el fragmento de CP amplificado, carril 9 control negativo. Los carriles 1, 2 y 9, 3-4, 5-6, 7-8, corresponden a muestras de plantas de *C. pepo*, *C. melo*, *C. sativus*, *C. lanatus*, respectivamente. Los carriles M en A, B y C, corresponden a Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, cat. 10787018). **B.** Carril 1 control negativo, ADN de planta sana analizada con primers específicos. Los carriles 2-8 muestran fragmentos de 1.3 kb amplificados con cebadores específicos (SLCVA2295F/Xho-SLCV-A-R) de SLCuV. Carril 2 muestra fragmentos de *C. melo*, Carril 3 muestra fragmentos de *C. pepo*. Carril 4 control positivo previamente secuenciado extraído de plantas de *C. melo*. Los carriles 5,6 y 8 muestran fragmentos de SLCuV de plantas de *C. pepo*, *C. sativus* y *C. lanatus*, respectivamente. El carril 7 muestra control positivo de SLCuV previamente secuenciado. El carril 9 muestra un fragmento de 1.3 kb de ADN-B de SLCuV amplificado con SLCV DNA-B1-F/SLCV-DNA-B1-R muestra obtenida de *C. sativus*. **C.** Carril 1 y 2, muestran productos de 2.6 kb de genoma completo de CuLCrV (ADN-A y ADN-B) amplificado con productos de RCA de *C. melo* utilizando oligos específicos. Carril 3 Producto RCA de CuLCrV obtenido *C. melo*.

Por otro lado, se encontró que las muestras de plantas de Chile analizadas con oligos degenerados y específicos para la detección de begomovirus, fueron negativas. Mientras que en las muestras recolectadas de plantas de *S. lycopersicum* se logró la amplificación de fragmentos del TYLCV utilizando el par de oligos (TYC1F/TYC1R) (Fig. 6A), así como fragmentos de ToChLPV mediante el uso de oligos degenerados (Fig. 6B), como control negativo se utilizó ADN de plantas sanas. Además, en la figura 6C se observa la presencia de un fragmento de SLCuV amplificado en muestras de plantas de *C. sativus* utilizando los oligonucleótidos específicos mencionados en la metodología. Posteriormente se confirmó la identidad de los virus mediante las secuencias de los fragmentos y de genomas completos.

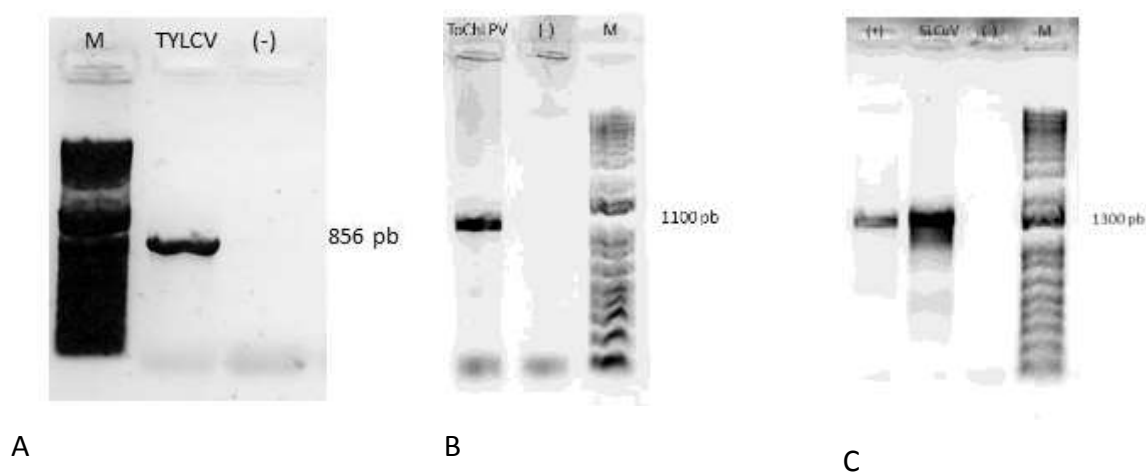


Figura 6. Detección de TYLCV, ToChLPV y SLCuV. Los carriles se enumeran de izquierda a derecha. **A.** Carril 1 Marcador, Carril 2 fragmento de TYLCV utilizando el par de oligos (TYC1F/TYC1R) en muestras de tomate, Carril 3 control negativo muestra de planta sana. **B.** Carril 1 Fragmento de ToChLPV amplificado de muestras de plantas de tomate, Carril 2 control negativo muestra de planta sana, Carril 3 Marcador. El Carril M en A, B y C es el Marcador Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, cat. 10787018). **C.** Carril 1 control positivo SLCuV previamente secuenciado, Carril 2 fragmento de SLCuV de muestra de *C. sativus*, Carril 3 control negativo H₂O, Carril 4 Marcador.

En la Tabla 3 se muestran resultados de los análisis por PCR y secuenciación de los begomovirus encontrados en diferentes cultivos de hortalizas en BCS. Se determinó la presencia de TYLCV, ToChLPV y SLCuV en las muestras de plantas de tomate obtenidas en el Valle de Santo Domingo, confirmando infecciones mixtas de ToChLPV con TYLCV y de TYLCV con SLCuV. En cambio, se encontró solo la infección sencilla de TYLCV en las muestras obtenidas en Todos Santos. Las muestras de plantas de *C. annuum* recolectadas en Todos Santos fueron negativas a los análisis de detección de begomovirus. Por otro lado, las muestras de plantas cucurbitáceas estaban infectadas con SLCuV y CuLCrV. Todas las muestras de *C. lanatus* y *C. sativus* dieron positivo a SLCuV, mientras que en las muestras de *C. pepo* se encontró tanto en la infección sencilla como en infección mixta con CuLCrV. Las muestras recolectadas en el Valle de Santo Domingo, Ciudad Constitución, fueron positivas a SLCuV, en infección sencilla. Mientras que, en los otros sitios muestreados como El Pescadero, El Carrizal y San Juan de los Planes, se encontraron tanto infecciones sencillas como mixtas. Además, en todas las muestras de *C. melo* se determinó la infección mixta SLCuV/CuLCrV. Se confirmaron las infecciones mixtas utilizando la técnica de

PCR, secuenciación por el método de Sanger y secuenciación masiva mediante Illumina, con la que se obtuvieron los genomas completos que se presentan a partir de la sección 7.1.3.

Tabla 3. Infecciones sencillas y mixtas causadas por begomovirus en hortalizas cultivadas en el estado de Baja California Sur, incluyendo El Valle de Santo Domingo en Cd. Constitución, El Pescadero, Todos Santos, San Juan de los Planes y El Carrizal.

Cultivo	Infección de Begomovirus confirmada por PCR	
	sencilla	mixta
<i>S. lycopersicum</i>	TYLCV	ToChLPV/TYLCV TYLCV/SLCuV
<i>C. annuum</i>	NE-B	
<i>C. lanatus</i>	SLCuV	
<i>C. pepo</i>	SLCuV	SLCuV/CuLCrV
<i>C. sativus</i>	SLCuV	
<i>C. melo</i>		SLCuV/CuLCrV

NE-B, No se encontraron begomovirus.

7.1.3 Caracterización de begomovirus en infección mixta aislados de plantas de tomate

Se determinó la infección sencilla y mixta por begomovirus en plantas de tomate de cultivos comerciales, mediante la detección de los virus con oligos degenerados (Rojas *et al.*, 1993) y específicos (TYC1F/TYC1R) (Lapidot, 2002) por la técnica de PCR y posterior secuenciación de los fragmentos obtenidos. Los resultados indican la presencia de TYLCV en infección sencilla en las muestras recolectadas en Todos Santos. Por otro lado, en las muestras recolectadas en el Valle de Santo Domingo, se determinó la presencia de la infección mixta de TYLCV con ToChLPV, así como de TYLCV con SLCuV.

Los resultados se confirmaron mediante la secuenciación masiva Illumina de tres muestras positivas, las secuencias se limpiaron y se ensamblaron los genomas, como se describe en la metodología. Las muestras presentaron tanto infección sencilla como mixta, en la tabla 4 se presentan los genomas completos de los begomovirus TYLCV, ToChLPV y SLCuV aislados de las muestras de plantas de tomate. En las muestras de plantas sintomática de tomate recolectadas en los cultivos de Todos Santos, se identificó la presencia de la infección sencilla causada por el TYLCV. El genoma completo del aislado BCS TSANTOS, con un tamaño de 2781 pb, se depositó

en GenBank con el número de acceso OQ466372. Los análisis de secuencia revelaron una alta identidad por pares de bases del 99.28 %, con un aislado de Guasave FJ012358, seguido de un 98.96 % de identidad con un aislado de China MG770210 y un 98.92 % de identidad con un aislado de Japón AB192965. Además, se encontró que el aislado BCS TSANTOS tenía una identidad del 98.85 % con un aislado KY971328 reportado previamente en Florida que afecta a las plantas de tomate.

En las muestras de plantas sintomáticas de tomate obtenidas de cultivo en malla sombra, en el Valle de Santo domingo, se determinó la infección mixta de SLCuV/TYLCV. El aislado BCS SDT3 de TYLCV con 2781 pb, se depositó en GenBank con el número de acceso OQ466368 mostró una alta identidad por pares de bases, del 99.32 % con el aislado de Sinaloa EF523478. Por otro lado, el componente ADN-A del SLCuV, el aislado BCS SDTA2 con 2640 pb, se depositó en GenBank con el número de acceso OQ466369 presentó una identidad por pares de bases el 99.17 % con el aislado en Arizona MW588376. El componente B el aislado BCS SDTB2 con 2608 pb, se depositó en GenBank con el número de acceso OQ466370. Mostró mayor identidad por pares de bases del 94.58 % con el aislado en Arizona MW558404, seguido de un 94.4 % de identidad con el aislado de Pakistán MF504013. En la misma muestra se identificó un segundo componente B del SLCuV, el aislado BCS SDTB3 que tiene 2593 pb, se depositó en GenBank con el número de acceso OQ466371 el cual presentó una identidad por pares de bases del 93.7 % con MW645361 y el 93.23 % con MW588395, ambos aislados de Arizona.

En otra muestra de plantas de tomate se identificó una infección mixta de SLCuV/TYLCV. El genoma completo de TYLCV el aislado BCS SDT (Tabla 4), se compone de 2781 pb, con número de acceso GenBank OQ466365. Este genoma presenta una alta identidad por pares del 99.64% con el TYLCV EF523478 de Sinaloa, seguido de un 99.6 % de identidad con el aislado EF210555 de Sonora y un 99.57 % de identidad con otro aislado de Sinaloa. Además, presenta un 99.5 % de identidad por pares de bases con el aislado HM459851 reportado en la región. En la misma muestra se obtuvo el genoma completo de SLCuV, cuyo ADN-A se compone de 2639 pb, se denominó aislado BCS SDTA1 con número de acceso GenBank OQ466363. Tiene una identidad por pares del 99.54 % con MW588384 de Arizona y del 97.27 % y 97.2 % con los aislados KM595212 y MF187211 de Jordania y del estado de BCS, respectivamente. El ADN-B tiene 2608 pb, es el aislado BCS SDTB1 con número de acceso GenBank OQ466364 presenta una identidad

por pares del 95.43 % con MW588408 aislado de Arizona, del 95 % con MW588403 reportado en México y del 94.98 % con MF504013 reportado en Pakistán. Por otro lado, una muestra de la misma área de cultivo presentó la infección mixta de ToChLPV y TYLCV. En esta el genoma de ToChLPV se compone de 2609 pb, es el aislado BCS SDToCh con número de acceso GenBank OQ466367. Presenta una identidad por pares de 98.93 % con HM459852 y del 96.02 % con AY339619, ambos aislados previamente en el estado de BCS. Además, presenta una identidad por pares de bases del 95.93 % con el aislado DQ347948, reportado en San Luis Potosí tiene. Por otro lado, el genoma del TYLCV se conforma de 2781 pb, es el aislado BCS SDT2 con número de acceso GenBank OQ466366. Se observó que tiene una identidad por pares del 99.57 % con el aislado FJ012358 de Guasave, seguido del 99.21 % con un aislado de China identificado con el número de acceso GenBank MG770210 y con otro aislado reportado en Japón AB192965. Cabe señalar que los aislados obtenidos de plantas de tomate, mostraron ligeras modificaciones en sus secuencias de nucleótidos, aunque no mostraron cambios en los tamaños ni en la organización de los ORFs.

Tabla 4. Genomas de los begomovirus TYLCV, ToChLPV y SLCuV, aislados de infección sencilla y mixta en muestras de plantas de tomate.

Acrónimo Begomovirus	Número de acceso GenBank	Genoma	Isolate	pb
TYLCV	OQ466372	monopartita	BCS TSANTOS	2781
TYLCV	OQ466368	monopartita	BCS SDT3	2781
SLCuV	OQ466369	ADN-A	BCS SDTA2	2640
SLCuV	OQ466370	ADN-B	BCS SDTB2	2608
SLCuV	OQ466371	ADN-B	BCS SDTB3	2593
TYLCV	OQ466365	monopartita	BCS SDT	2781
SLCuV	OQ466363	ADN-A	BCS SDTA1	2639
SLCuV	OQ466364	ADN-B	BCS SDTB1	2608
ToChLPV	OQ466367	ADN-A	BCS SDToCh	2609
TYLCV	OQ466366	monopartita	BCS SDT2	2781

7.1.4 Infección sencilla e infección mixta por begomovirus en cucurbitáceas

Se determinó la identidad de los begomovirus asociados a enfermedades de plantas cucurbitáceas, mediante la técnica de PCR con cebadores degenerados y específicos en muestras recolectadas de diferentes áreas de cultivo. Las secuencias obtenidas por el método de Sanger por Azenta (South Plainfield, NJ, USA) fueron limpiadas y analizadas en la plataforma Blastn en la que se determinó el porcentaje de identidad con los virus de la base de datos. Los análisis de las secuencias que abarcan parte del gen REn, el TrAP completo y parte del gen Rep revelaron la presencia de SLCuV en todas las cucurbitáceas, incluyendo *C. sativus*, *C. lanatus*, *C. pepo* y *C. melo*. Se encontró un porcentaje de identidad del 95.2 % con las secuencias KM595191, KM595205 aislados reportados en Jordania, y con la secuencia KM595235 un aislado reportado en Palestina. Además, se observó el 95.31 % con la secuencia KM595126 un aislado reportado en Israel.

Se ensamblaron las secuencias obtenidas de las muestras de plantas sintomáticas de *C. melo*, derivadas del uso de los primers CuLCrVA-EcoRI-V/CuLCrVA-EcoRI-C, para el ADN-A y con los primers CuLCrVB-ApaI-V/CuLCrVB-ApaI-C para el ADN-B (Hagen *et al.*, 2008), para lo cual se utilizó como referencia las secuencias de los aislados CuLCrV-California ADN-A y B (AF224760 y AF224761, respectivamente). Se identificó como la especie *Cucurbit leaf crumple virus* (CuLCrV) mediante el análisis de identidad por pares de bases, utilizando el software mencionado en la metodología y de acuerdo a los criterios de demarcación de especies del ICTV que establecen que debe haber 91 y 94 % de identidad por pares de bases de la secuencia completa del ADN-A (Brown *et al.*, 2015). Se identificaron los marcos de lectura abiertos para las secuencias del ADN-A y ADN-B de CuLCrV utilizando la plataforma en línea del NCBI, buscador de ORF (ORF Finder). La secuencia completa del ADN-A y ADN-B de CuLCrV fue de 2642 y 2611 pb, ambas fueron depositadas en GenBank con el número de acceso MN625831 y MW380744, respectivamente. Se observó que estas secuencias tienen 11 nt que no observan en las secuencias reportadas en California y Arizona. Se encontró que el ADN-A muestra alta identidad con el aislado CuLCrV-CA 98.5 %, y con el aislado CuLCrV-AZ 98.3 %. Además, se observó alta identidad con otros begomovirus relacionados como squash mild leaf curl virus (SMLCuV) el 81.4 %, con squash leaf curl virus (SLCuV-Mx:BCS:La Paz) el 80.3%, el 78% de identidad con melon chlorotic leaf curl

virus (MCLCuV/CR) que afecta plantas de melón, mientras que con cabbage leaf curl virus (CabLCV) solo compartió el 67.7 % de identidad. En cuanto al ADN-B, se encontró alta identidad por pares de bases con el aislado CuLCrV-CA 97.5 % y con el aislado CuLCrV-AZ 96.3 %. Además, se observó que el ADN-B de CuLCrV, comparte 61.6 % de identidad por pares de bases con SMLCuV, 59.8 % con SLCuV-Mx:BCS:La Paz, 59 % con MCLCuV/CR y solo 53.8 % con CabLCV.

En el presente estudio, se llevó a cabo secuenciación masiva utilizando la plataforma Illumina con el objetivo de lograr una profundidad de secuenciación significativa de genomas y determinar los begomovirus presentes en las muestras infectadas de manera natural. Se seleccionaron muestras previamente positivas de las cucurbitáceas provenientes de diferentes áreas de cultivo, para la secuenciación, la cual se realizó en San Francisco, CA. Una vez obtenidas las secuencias, se llevó a cabo un proceso de limpieza y ensamblaje de los genomas, de acuerdo con la metodología descrita en materiales y métodos.

Los resultados obtenidos revelan la presencia de infección simple y mixta causada por SLCuV y CuLCrV en las plantas infectadas de forma natural. En el caso de las plantas de *C. sativus* infectadas únicamente se encontraron los dos componentes genómicos del SLCuV (Tabla 5), cuyas secuencias fueron depositadas en GenBank con el número de acceso OP019702, OP019703, ADN-A y ADN-B, respectivamente. De este modo se confirma la infección simple o sencilla, donde se observó que el ADN-A se compone de 2638 pb y presenta una identidad por pares de bases oscila entre el 99.17 y el 99.24 % con aislados de SLCuV de Jordania KM595156, KM595202 y KM595191, respectivamente. Asimismo, se evidenció que con el SLCuV aislado en BCS de plantas de calabaza MF187211, tiene una identidad por pares del 99.3 %. En cuanto al ADN-B, se compone de 2608 pb y presenta una identidad por pares del 95.62 % con el componente B del SLCuV aislado en Arizona MW588408, seguido del 95.48 % con el aislado reportado en Pakistán MF504013 y del 95.16 % con otro aislado reportado en Arizona DQ285017.

En el presente estudio, se evaluaron muestras de plantas de *C. lanatus* infectadas de manera natural en campos de cultivo a cielo abierto. Se pudo determinar la presencia de una infección sencilla y se obtuvieron los dos componentes genómicos del SLCuV. Las secuencias se depositaron en GenBank con el número de acceso OP019704, OP019705, ADN-A y ADN-B,

respectivamente. El componente ADN-A está conformado por 2639 pb y se encontró que tiene una identidad por pares de bases del 98.60 al 99 % con dos aislados de SLCuV reportados en Arizona MW588384 y MW588389, respectivamente. Además, se observó una identidad por pares de bases del 97.80 % con el aislado en California DQ285016 y del 97.61 % con el aislado MF187211 de BCS. Por otro lado, el componente ADN-B consta de 2607 pb y se encontró una mayor identidad por pares de bases con dos aislados reportados en Pakistán el 95.51 % y 95.55 %, MF504012 y MF504013, respectivamente. Asimismo, se encontró una identidad por pares del 95.44 % con el aislado DQ285017 en California y del 95.43 % con aislado MW588408 en Arizona.

En plantas de *C. pepo* infectadas de manera natural se ha determinado la presencia de la infección mixta CuLCrV/SLCuV, en la cual se obtuvieron los componentes de su genoma. El componente ADN-A de CuLCrV con 2642 pb, el aislado BCS CP cuya secuencia se depositó en GenBank con el número de acceso OQ466347. Se determinó que presenta una identidad por pares de bases del 98.56 % con el MN625831 aislado de plantas de melón en BCS en la primera fase de este trabajo, una identidad por pares del 98.14% con el aislado reportado en Campeche, mientras que con el aislado de Arizona se observó una identidad por pares del 97.35 % y con el aislado de California AF224760, una identidad por pares de bases de 97.2 %. El componente ADN-B, con 2610 pb, el aislado BCS CpP12, con número de acceso GenBank OQ466346 se observó que tiene una identidad por pares de bases del 94.75 % con la secuencia MW380744 de BCS, el aislado de plantas de melón, seguido de un 93.26 % con un aislado de Arizona AF327559 y un 92.57 % de identidad con un aislado en California AF224761. Por otro lado, el SLCuV determinado en esta infección mixta presentó un componente ADN-A de 2638 pb, aislado BCS CpP con el número de acceso en GenBank OQ466348, mostró una identidad por pares de bases del 99.36 % con el KM595191, 99.32 % con KM595202 y 99.28 % con KM595184, todos aislados de Jordania. Cabe mencionar que el componente B del SLCuV de esta muestra estaba fragmentado, por lo que no fue posible ensamblar el genoma completo.

Se obtuvo el genoma completo del SLCuV a partir de plantas de calabaza infectadas de manera natural en áreas de cultivo de San Juan de los Planes. El componente ADN-A, con 2638 pb, el aislado CpL10, con número de acceso en GenBank OQ466344 muestra la mayor identidad por pares de bases con los aislados de Jordania KM595184, KM595191, que va del 98.94 al 99.01 %,

respectivamente. También se observó una identidad por pares de bases del 98.94 % con los aislados de Israel KM595109, KM595107, seguido de un 98.9 % con el aislado de Palestina KM595227. El componente ADN-B, de 2608 pb, el aislado BCS CpL11, con número de acceso GenBank OQ466345 tiene una identidad por pares de bases del 95.48 y 95.51 % con los aislados de Pakistán MF504012 y MF504013, respectivamente. Además, se observó una identidad por pares del 95.32 % con el aislado de California DQ285017 y del 95.29 % con un aislado de Palestina KC441466.

Se ha constatado la presencia de la infección mixta CuLCrV Y SLCuV en las plantas de melón cultivadas a cielo abierto. El ADN-A del CuLCrV de 2642 pb, aislado BCS CMPA, con número de acceso GenBank OQ466375 presenta una identidad por pares de bases del 98.41 % con el aislado MN625831 previamente reportado en BCS. Asimismo, se observó una identidad del 98.03 % con MW273384 reportado en el Estado de Campeche, 97.2 % con el aislado AF256200 de Arizona y 97.05 % con el aislado AF224760 de California. Por su parte, el ADN-B, compuesto por 2610 pb, el aislado BCS CMPB con número de acceso GenBank OQ466376, presenta una identidad por pares de bases del 94.75 % con el aislado del MW380744 de BCS, 93.26 % con el aislado de Arizona AF327559, 92.57 % con el aislado de California y 92.24 % con el aislado de Campeche MW273385. Los resultados del análisis de identidad por pares de bases del ADN-A de CuLCrV, aislados de calabaza y de melón indican una identidad del 99.8 % entre ellos, mientras que la identidad por pares de bases de su ADN-B es del 100 %. Por otro lado, en el caso de SLCuV, su componente ADN-A tiene 2638 pb, es el aislado BCS CMPA1, con número de acceso GenBank OQ466377 presenta una mayor identidad por pares de bases con aislados de Jordania: 99.32 % con KM595191, 99.28 % con KM595202 y 99.24 % con KM595184. Asimismo, con los aislados KM595107 y KM595109 de Israel se observa una identidad por pares del 99.24 % y con otros aislados de Jordania tiene una identidad por pares del 99.2 %: KM595186, KM595197 y KM595201. En cuanto al SLCuV ADN-B, compuesto de 2592 pb, el aislado BCS CMPB1, con número de acceso GenBank OQ466378 se observó que presenta una mayor identidad por pares de bases con aislados de Arizona: 92.96 % con el MW645361, seguido del 92.88 % con MW588395 y 92.61 % con MW588396.

En el Valle de Santo Domingo, se ha comprobado la presencia del SLCuV en infección sencilla en plantas de calabaza cultivadas al aire libre. El ADN-A de esta cepa de SLCuV, aislado BCS SDA1,

consta de 2639 pb, con número de acceso GenBank OQ466354 presenta la mayor identidad por pares de bases del 99.51 %, con aislados de Arizona y México, MW588376 y MW588379, respectivamente. Además, se observó una identidad por pares del 97.47 % con otros aislados de Arizona como MW588383 y MW588380, y del del 97.42 % con un aislado previamente identificado en la región MF187211. Por otro lado, el ADN-B de esta cepa, aislado BCS SDB1, consta de 2593 pb, con número de acceso GenBank OQ466355 mostró la mayor identidad por pares de bases del 93.5 % con MW645361 y del 93.46 % con MW588395, ambos aislados de Arizona, seguido del 93.24 % con un aislado de México MW588405.

En una muestra adicional del Valle de Santo Domingo se detectó la presencia de SLCuV con ADN-A y dos ADN-B. El ADN-A tiene una longitud de 2639 pb, es el aislado BCS SDA3, con número de acceso GenBank OQ466358 muestra una mayor identidad por pares de bases del 98.64 % con MW588379 un aislado de México y con tres aislados de Arizona MW588376, MW588374 y MW588373. Además, se observó una identidad por pares de bases del 98.6 % con MW588377 y MW588383 otros aislados de Arizona. El ADN-B tiene una longitud de 2593 pb, es el aislado BCS SDB3, con número de acceso GenBank OQ466359 mostró una identidad por pares de bases del 93.5 % con MW645361 y del 93.46 % con MW588395, seguido del 93.12 % con MW588412, MW588411, MW588396, todos aislados de Arizona. El segundo ADN-B tiene una longitud de 2608 pb, es el aislado BCS SDB4, con número de acceso GenBank OQ466360 mostró una mayor identidad por pares de bases del 95.23 % con MW588408 aislado de Arizona, seguido del 95.02 % con MF504013 y 94.98 % con MF504012, ambos aislados de Pakistán, mientras que con DQ285017 un aislado de California mostró una identidad por pares de bases del 94.9 %. Se observaron ligeras modificaciones en las secuencias de nucleótidos de los aislados obtenidos de cucurbitáceas, pero no hubo cambios en los tamaños ni en la organización de los ORFs.

Tabla 5. Genomas de los begomovirus SLCuV y CuLCrV, aislados de infección sencilla y mixta en muestras de plantas cucurbitáceas.

Cultivo	Acrónimo de begomovirus	GenBank accession numbers	GENOMA	ISOLATE	pb
<i>Cucumis melo</i>	SLCuV	OQ466378	ADN-B	BCS CMPB1	2592
	SLCuV	OQ466377	ADN-A	BCS CMPA1	2638
	CuLCrV	OQ466376	ADN-B	BCS CMPB	2610
	CuLCrV	OQ466375	ADN-A	BCS CMPA	2642
<i>Cucurbita pepo</i>	SLCuV	OQ466362	ADN-B	BCS SD5	2593
	SLCuV	OQ466361	ADN-A	BCS SDA4	2639
	SLCuV	OQ466360	ADN-B	BCS SDB4	2608
	SLCuV	OQ466359	ADN-B	BCS SDB3	2593
	SLCuV	OQ466358	ADN-A	BCS SDA3	2639
	SLCuV	OQ466357	ADN-B	BCS SDB2	2608
	SLCuV	OQ466356	ADN-A	BCS SDA2	2639
	SLCuV	OQ466355	ADN-B	BCS SDB1	2593
	SLCuV	OQ466354	ADN-A	BCS SDA1	2639
	SLCuV	OQ466353	ADN-B	BCS CpCB2	2608
	SLCuV	OQ466352	ADN-A	BCS-CpCA2	2638
	SLCuV	OQ466351	ADN-B	BCS-CpCB1	2608
	SLCuV	OQ466350	ADN-A	BCS CpCA1	2638
	SLCuV	OQ466349	ADN-B	BCS CpP14	2592
	SLCuV	OQ466348	ADN-A	BCS CpP	2638
	CuLCrV	OQ466347	ADN-A	BCS Cp	2642
	CuLCrV	OQ466346	ADN-B	BCS CpP12	2610
	SLCuV	OQ466345	ADN-B	BCS CpL11	2608
	SLCuV	OQ466344	ADN-A	CpL10	2638
	<i>Citrullus lanatus</i>	SLCuV	OQ466343	ADN-B	CL4
SLCuV		OP019705	ADN-B		2607
SLCuV		OP019704	ADN-A		2639
<i>Cucumis sativus</i>	SLCuV	OP019703	ADN-B		2608
	SLCuV	OP019702	ADN-A		2638

7.1.5 Postulados de Koch con los begomovirus SLCuV y CuLCrV

Los postulados de Koch para los begomovirus SLCuV y CuLCrV que se llevaron a cabo se presentan en la figura 7. Para lo cual se realizó la germinación y el cultivo de plantas de *N.*

benthamiana y *C. pepo*, bajo condiciones de temperatura de 28 °C y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Se presentan imágenes de una planta sana observada en las áreas de cultivo (Fig. 7A). A partir del ADN obtenido de muestras recolectadas en áreas de cultivo infectadas naturalmente en el estado de Baja California Sur, en las que se observaron los síntomas asociados a begomovirus (Fig. 7B, C), la técnica de RCA permitió enriquecer cada virus y sintetizar múltiples copias del genoma, y posteriormente se inoculó el virus en plantas de *N. benthamiana* y *C. pepo* utilizando la técnica de biobalística de acuerdo a las instrucciones del proveedor y lo reportado por (López-López *et al.*, 2013). Se observaron síntomas similares a los observados en el área cultivo a cielo abierto. Los síntomas comenzaron a aparecer a las dos semanas después de la inoculación (en adelante dpi) del virus. Se documentó que en la infección sencilla de SLCuV en plantas de calabaza, los síntomas son más severos (Fig. 7D, E) que los que se observaron en plantas de nicotiana (Fig. 7J). Estas últimas resistieron hasta las siete semanas que se prolongó el bioensayo, mientras que el 33% de las de calabaza perecieron entre la quinta y séptima semana. Sin embargo, se observó que las plantas de *N. benthamiana*, cuando se trata de infección una mixta tenían hojas cada vez más pequeñas, enrolladas y cloróticas, por lo que permitió diferenciar claramente entre plantas con infección sencilla y mixta. Como control negativo, se mantuvieron plantas libres de virus en las mismas condiciones de luz y temperatura (Fig. 7F, I). Además, se observó deformación, enrollamiento y reducción del tamaño de la hoja (Fig. 7G) en plantas de nicotiana inoculada con SLCuV en ensayo in vitro. La recolección de muestras para su procesamiento y análisis se presenta en (Fig. 7G). Se presentan los fragmentos de ADN-A y ADN-B de SLCuV amplificados con oligos específicos (Fig. 7H). Otra planta inoculada con SLCuV, presenta síntomas de clorosis, enrollamiento de las hojas (Fig. 7J). Mientras que la planta inoculada con CuLCrV, muestra síntomas de clorosis, enrollamiento, deformación y hojas de tamaño reducido (Fig. 7K). Los síntomas más severos se presentan en la planta inoculada con SLCuV y CuLCrV, en infección mixta, donde se observaron síntomas severos de enrollamiento, clorosis y reducción del tamaño de las hojas (Fig. 7L). El ADN del virus se aisló nuevamente de ambas especies de plantas y se detectó tanto del ADN-A como del ADN-B por la técnica de PCR con oligonucleótidos específicos descritos en la metodología. Se verificó el tamaño de los fragmentos en gel de agarosa al 1% y los productos se enviaron a secuenciar a Azenta (South Plainfield, NJ, USA). Una vez obtenidas las secuencias se realizaron

los alineamientos correspondientes para verificar que la identidad corresponde al begomovirus SLCuV. Se obtuvieron fragmentos tanto de la infección sencilla como de la infección mixta. Los fragmentos obtenidos del ADN-A de aproximadamente 1300 pb presentan un porcentaje de identidad nucleotídica del 98.6 % con la secuencia MF187211 del SLCuV previamente reportada en BCS y el mismo porcentaje con la secuencia KM595168 reportada en Medio Oriente. Los fragmentos obtenidos del ADN-B, de aproximadamente 1300 pb presentan un porcentaje de identidad nucleotídica del 89.9 % con la secuencia DQ285018 correspondiente al ADN-B del SLCuV reportado en Arizona y un 89.7 % con la secuencia HM368374 del ADN-B del SLCuV aislado de cucurbitáceas en el Líbano (Sobh *et al.*, 2012). El fragmento de la secuencia del ADN-A de CuLCrV de aproximadamente 1100 pb mostró una identidad del 99 % con MN625831 del CuLCrV de BCS. Considerando las evidencias se confirman los postulados de Koch para ambos virus.

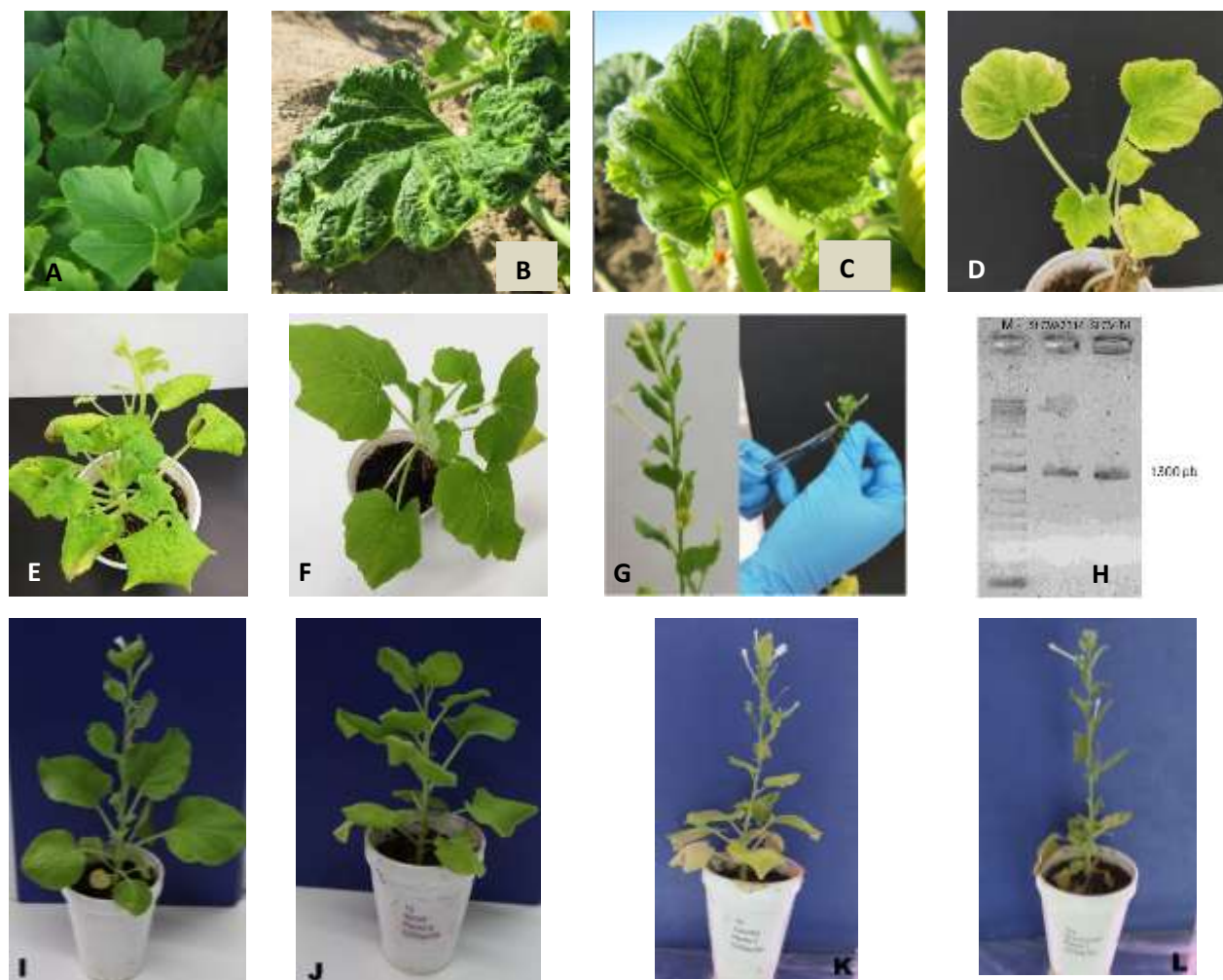


Figura 7. Postulados de Koch con los begomovirus SLCuV y CuLCrV. **A.** Hojas de planta sana observadas en áreas de cultivo. **B, C.** Síntomas observados en áreas de cultivo asociados a begomovirus, se presenta deformación, reducción del tamaño de las hojas, enrollamiento, clorosis. **D, E.** Plantas de calabaza inoculadas con SLCuV en ensayo in vitro, se observan síntomas como clorosis, deformación, enrollamiento y reducción del tamaño de las hojas. **F.** Planta de calabaza utilizada como control negativo. **G.** Planta de nicotiana inoculada con SLCuV en ensayo in vitro, se observa deformación, enrollamiento y reducción del tamaño de la hoja. Y la recolección de muestra para su procesamiento y análisis. **H.** Carril 1. Marcador Kb Plus. Carril 2. Fragmento de ADN-A de SLCuV amplificado con oligos específicos. Carril 3. Fragmento de ADN-B de SLCuV amplificado con oligos específicos. **I.** se presenta planta libre de virus. **J.** Planta inoculada con SLCuV, con síntomas de clorosis, enrollamiento de las hojas. **K.** Planta inoculada con CuLCrV, con síntomas de clorosis, enrollamiento, deformación y reducción del tamaño de las hojas. **L.** Planta inoculada con SLCuV y CuLCrV, se observan síntomas severos de enrollamiento, clorosis y reducción del tamaño de las hojas.

La secuenciación masiva mediante Illumina, realizada con una parte del ADN extraído de las muestras del bioensayo permitió la obtención de secuencias y ensamblaje de los genomas. En

consecuencia, se lograron obtener los dos componentes del genoma del SLCuV, siendo el ADN-A de 2638 pb, es el aislado BCS SAC1 y el ADN-B de 2592 pb, es el aislado BCS SAC2. Las secuencias fueron depositadas en GenBank con el número de acceso OQ466373 y OQ466374, ADN-A y ADN-B, respectivamente. Se observó que el ADN-A presenta una identidad por pares de bases del 99.43 % con el aislado KM595191, un 99.39 % KM595202 y un 99.36 % con el aislado KM595184, todos reportados en Jordania. Con los aislados de Israel KM595107 y KM595109, muestra una identidad por pares de bases del 99.36 %, mientras que con el aislado MF187211 de BCS, presenta el 99.24 % de identidad. Se observó que el ADN-B presenta una identidad por pares de bases del 93.27 % con los aislados MW645361 y MW588395, mientras que con el aislado MW588396 presenta una identidad por pares de bases de 93 %, todos reportados en Arizona.

7.1.6 Caracterización de curtovirus aislado de plantas de Chile

Como se ha señalado previamente, las muestras de plantas de Chile analizadas para la detección de begomovirus con primers degenerados y específicos descritos en la metodología, arrojaron resultados negativos. Sin embargo, considerando que los síntomas observados, se presentaron en el 80 % de las plantas evaluadas en campo (65 de 80 plantas), se seleccionaron tres muestras para la secuenciación masiva mediante Illumina, en San Francisco, CA. Una vez obtenidas las secuencias, se procedió a su limpieza y ensamblaje de los genomas, tal como se describe en la metodología. Como resultado se determinó que las muestras de plantas sintomáticas de Chile presentaban una infección sencilla por un miembro del género *Curtovirus*. Se trata de un componente circular de ssDNA, genoma monopartita completo. La identificación se realizó mediante la comparación por pares de bases del genoma completo, de acuerdo a los criterios de demarcación de especies del ICTV, los cuales establecen que debe haber un 77 % de identidad por pares en todo el genoma como umbral de demarcación de especies y un 94 % de identidad por pares en todo el genoma como umbral de demarcación de cepas (Varsani *et al.*, 2014). Se determinó que tiene una identidad por pares del 98.84 % con un aislado reportado en Texas identificado con el número de acceso GenBank AY548948 (Baliji *et al.*, 2004), mientras que con los aislados reportados en California mostró una identidad por pares que va del 97.16 al 98.33 %, KT583749, OL624880, respectivamente. De acuerdo a lo anterior, los resultados

indican que se trata de la especie *Beet curly top virus* (BCTV), cuyo genoma consta de 2925 pb, al aislado se le denominó BCS, su secuencia se subió a NCBI y se registró con el número de acceso GenBank OP019706. Este es el primer reporte del BCTV en la Península de Baja California del que se presenta la organización de su genoma en la figura 8. Los ORFs se denotan codificados en la cadena del sentido del virión (V) o en sentido complementario (C), y los productos proteicos se indican como corresponde. También se observa la posición del tallo asa que contiene la secuencia conservada 5'-TAATATTAC-3' localizada en la región intergénica larga (LIR), En sentido del virión se encuentra la CP proteína de la cápside, MP proteína de movimiento y V3 que regula los niveles de ssDNA y dsDNA. En sentido complementario, se observa la Rep proteína asociada a la replicación, Ren proteína potenciadora de la replicación y TrAP, proteína activadora transcripcional. En el esquema se muestran los sitios de corte por dos enzimas de restricción, *Bam*HI que presenta dos sitios de corte y *Eco*RI con un sitio de corte.

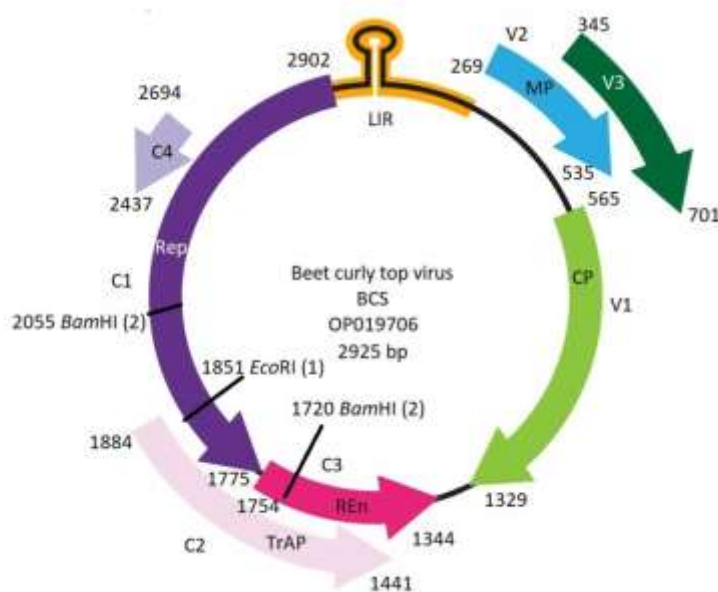


Figura 8. Organización del genoma del curtovirus, Beet curly top virus BCS. Los ORFs se denotan codificados en la cadena del sentido del virión (V) o en sentido complementario (C), y se indican los productos proteicos correspondientes. En sentido del virión, la CP proteína de la cápside, MP proteína de movimiento y V3 regula los niveles de ssDNA y dsDNA. En sentido complementario, la Rep proteína asociada a la replicación, Ren proteína potenciadora de la replicación y TrAP proteína activadora transcripcional. LIR indica la posición del tallo asa que contiene la secuencia conservada 5'-TAATATTAC-3'. Se observan sitios por enzimas de restricción *Bam*HI (2) y *Eco*RI (1) Adaptado del ICTV.

7.2 Objetivo 2. Realizar el análisis comparativo de la expresión de genes en plantas de *N. benthamiana* protegidas con secuencias homólogas y heterólogas ante una infección sencilla.

7.2.1 Análisis de la expresión génica en microarreglos de plantas protegidas por CIRP y CIRT antes de la infección por PepGMV

Se obtuvieron 27,342 genes en las muestras de plantas protegidas con CIRP y 27,218 genes en las muestras de plantas protegidas con CIRT, se presenta el conjunto del análisis de microarreglos (Fig. 9A), en el que los colores se asocian a la expresión diferencial de genes, el color de cada punto depende del valor absoluto de la puntuación Z-score. La caracterización funcional de los genes expresados diferencialmente se realizó utilizando el recurso de información de Arabidopsis (TAIR) y el programa de ontología génica (GO) Blast2GO (Fig. 9B). De estos 1473 genes sobre expresados se identificaron en plantas protegidas con CIRP y 2169 genes se identificaron en plantas protegidas con CIRT.

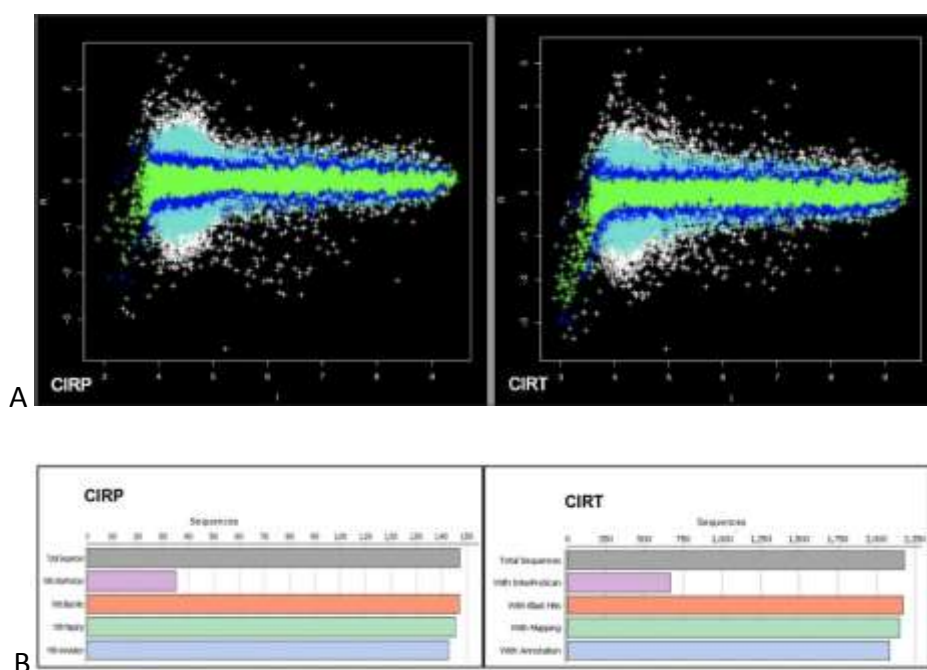


Figura 9. Expresión génica en microarreglos de plantas protegidas por CIRP y CIRT. A. Evaluación de la puntuación Z-score del análisis de microarray de plantas de *N. benthamiana* protegidas con CIRP (Construcción homóloga de la región intergénica de PepGMV) o CIRT (Construcción heteróloga de la región intergénica de ToChLPV) y desafiadas con PepGMV, donde los valores en el centro se indican en verde, los valores arriba y abajo se denotan en azul, azul celeste y blanco. B. Resultado de análisis de secuencias anotadas.

Cada uno de los genes que se identificaron se asignó a una de las tres categorías principales de ontología de genes GO (Fig. 10): proceso biológico (BP, biological process), función molecular (MF, molecular function) y componentes celulares (CC, cellular components).

La categoría BP (GO nivel 2) estuvo representada por transcripciones relacionadas con procesos celulares como diferenciación, organización, crecimiento, ciclo, señalización célula-célula (16% en plantas con CIRP y 17% en plantas con CIRT), con procesos metabólicos de proteínas, lípidos, carbohidratos, ADN (15% en plantas con CIRP y 16% en plantas con CIRT), con metabolitos primarios y secundarios (generación de metabolitos precursores y energía), así como respuesta a estímulos (bióticos, abióticos, endógenos) y respuesta de defensa (9% en plantas con CIRP y 10% en plantas con CIRT). En las plantas protegidas con CIRP, las transcripciones se asociaron con la respuesta a estrés, con estímulos abióticos, bióticos, endógenos y externos mediados a través de cascadas de proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK, mitogen-activated protein kinase), con la regulación de la expresión génica y con la epigenética (metilación de histonas y mantenimiento de la metilación del ADN). En CIRT, las transcripciones se asociaron con cascadas de MAPK; regulación de la transcripción, con la respuesta al ácido abscísico, la resistencia sistémica adquirida, con vías de señalización mediadas por ácido salicílico, con la respuesta hipersensible, con la transcripción de la regulación positiva dependiente del ADN y la ubiquitinación de las proteínas. La categoría MF fue representada por transcripciones relacionadas con la unión al ADN (51% en plantas con ambas construcciones), con actividad catalítica (41% en plantas con CIRP y 40% en plantas con CIRT), y con actividad reguladora de la transcripción (8% en plantas con CIRP y 9% en plantas con CIRT). La categoría CC fue representada en diferentes porcentajes para cada construcción, en plantas protegidas por CIRP las transcripciones se relacionaron con la parte celular (27%), con la célula (27%), con organelos (23%), con membrana (10%), con parte de organelo (6%), con parte de membrana (3%). Mientras que las relacionadas con la región extracelular fueron (3% en plantas con CIRP y 8% en plantas con CIRT). En plantas protegidas con CIRT las transcripciones relacionadas con el núcleo (25%), con cloroplasto (13%), con orgánulo intracelular (13%), con el complejo que contiene proteínas (13%), con la membrana plasmática (11%), con la mitocondria (9%) y con el citosol (8%) (Fig. 10).

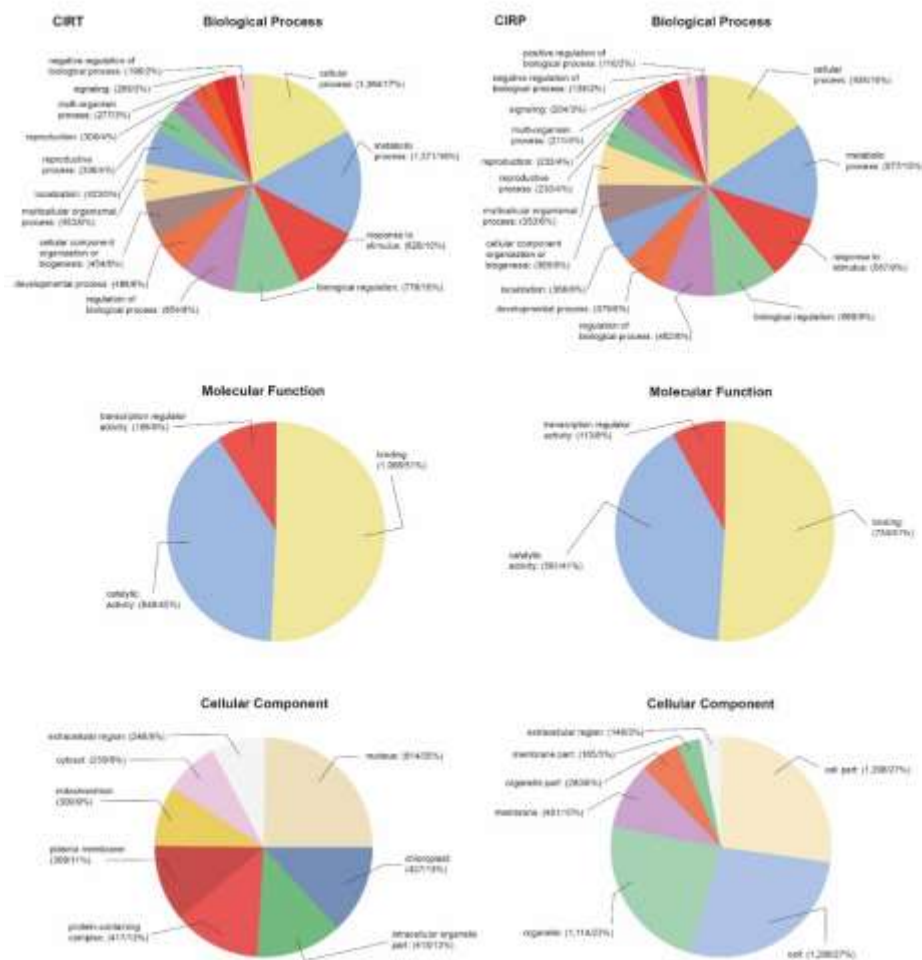


Figura 10. Anotación de ontología génica obtenida a partir de la respuesta de plantas de *N. benthamiana* protegidas con construcciones homólogas (CIRP) y heterólogas (CIRT) y desafiadas con PepGMV. Las transcripciones significativamente inducidas y reprimidas se agruparon en grupos funcionales en Blast2Go. Los gráficos para CIRT y CIRP muestran el proceso biológico, la función molecular y componentes celulares con puntajes Z - score 1.5 y 2. Los porcentajes de genes expresados diferencialmente durante la infección en cada categoría se muestran entre paréntesis.

Después de la anotación, se consideraron los genes expresados diferencialmente (DEGs, differentially expressed genes), aquellos con un valor de $P < 0.05$ y una puntuación Z - score con un cambio de \log_2 - fold change > 1.5 . Los genes sobre expresados relacionados con la respuesta al estrés, la respuesta hipersensible y el RNAi, se observaron en plantas protegidas con CIRP y CIRT, de estos, 201 fueron activados en plantas protegidas con CIRP y 290 en plantas protegidas con CIRT, compartiendo únicamente 61 genes. En la Tabla 6 se presentan los genes

regulados al alza asociados con la respuesta de defensa, el estrés, la respuesta hipersensible y la respuesta sistémica adquirida, en la Tabla 7 se presentan los genes asociados al RNAi. En ambas tablas se presentan los nombres de las proteínas que codifican estos genes y sus funciones biológicas derivadas de TAIR. Los locus identificados en TAIR se identificaron en diferentes versiones de ensamblajes del genoma y transcriptoma de *Nicotiana benthamiana* (Bombarely *et al.*, 2012; Nakasugi *et al.*, 2013; Kourelis *et al.*, 2018) y se presentan con su respectiva nomenclatura.

Tabla 6. Listas de genes regulados al alza en el transcriptoma de plantas de *N. benthamiana* protegidas con construcciones homólogas CIRP y heterólogas CIRT, asociados a respuesta de defensa, estrés y resistencia sistémica adquirida. Se presentan diferentes claves de anotaciones en el genoma de *Nicotiana benthamiana* Niben0.4.4 (NbS000) y Niben1.0.1 (Bombarely *et al.*, 2012). Nbv3K, Nbv6.1 (Nakasugi *et al.*, 2013). NbD (Kourelis *et al.*, 2018). NE=No encontrado.

Locus en Tair	Nombre de proteína	GO term	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	Ontología o producto	CIRP	CIRT
AT2G13360	AGT	Respuesta a estrés	AGT1 NbD006757 NbS00019758g0008.1 Niben101Scf00797g18009.1	Serina glioxilato amino-transferasa	1.5	2
AT2G14170	ALDH6B2	Oxido reducción	mmsA NbD000775 ALDH6B2 NbS00024307g0010.1	Respuesta al estrés oxidativo	2	2
AT2G19560	EER5	Respuesta al estrés	Niben101Scf01633g00029.1 Niben101Scf07229g00011.1 EER5 NbS00028917g0001.1	Respuesta al estrés	1.5	1.5
AT1G60940	SNRK2.9	Respuesta al estrés	Niben101Scf01993g08016.1 Niben101Scf01970g08001.1 SRK2B NbS00005219g0010.1	Respuesta al estrés	1.5	1.5
AT2G24850	TAT3	Respuesta al estrés	NE		1.5	1.5
AT2G30360	SIP4	Respuesta al estrés	WNK4 NbD010417 CIPK11 NbS00028941g0005.1	Respuesta al estrés	2	1.5
AT2G38730	RCA	Resistencia sistémica adquirida	Niben101Scf04098g00017.1 NbS00029897g0007.1	Resistencia sistémica adquirida	1.5	2
AT3G11840	PUB24	Respuesta	PUB24	Respuesta de	2	1.5

Locus en Tair	Nombre de proteína	GO term	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	Ontología o producto	CIRP	CIRT
		hipersensible	NbD001850	defensa		
AT3G11930	AT3G11930	Respuesta al estrés	NbS00032295g0001.1 Niben101Scf09610g00017.1 NbS00029709g0002.1	Respuesta al estrés	1.5	2
AT3G23250	MYB15	Respuesta de defensa	MYB4-like NbD008259 Niben101Scf01013g01003.1 NbS00011517g0003.1	Respuesta de defensa	2	2
AT3G32920	CSNSA	Respuesta de defensa	NE		2	1.5
AT3G58620	TTL4	Respuesta al estrés	NE		2	2
AT4G08500	MAPK MEKK1	Respuesta al estrés	STK10 Niben101Scf03906g03013.1 MEKK1 NbS00011174g0009.1	Respuesta al estrés	1.5	1.5
AT4G19530	AT4G19530	Respuesta de defensa	NE		2	2
AT4G19840	ATPP2-A1	Respuesta hipersensible	Niben101Scf03867g02041.1 Niben101Scf02174g03009.1 ATPP2-A1 NbS00041802g0007.1	Proteína del floema 2 LIKE A1	2	1.5
AT4G29100	AT4G29100	Respuesta de defensa	bHLH68-like NbD002325 NbS00049384g0003.1	Respuesta de defensa	2	2
AT4G30480	AT4G30480	Hsp90	TTC1 Niben101Scf03964g04005.1 NbS00020723g0011.1	TTC1	1.5	1.5
AT4G31550	WRKY11	Respuesta al estrés	WRK22 NbD013410 Niben101Scf01721g08007.1 NbS00042305g0004.1	Respuesta al estrés	2	1.5
AT5G09420	ATTOC64-V	Respuesta hipersensible	OM64 NbD010896 Niben101Scf01370g00007.1 NbS00018282g0024.1 NbS00011136g0002.1	Respuesta hipersensible	1.5	2
AT5G37930	AT5G37930	Proteína ubiquitina			2	2
AT5G40010	AATP1	Resistencia sistémica adquirida	AATP1 NbD010669.1 NbS00033104g0001.1	AATP1	1.5	1.5
AT5G40990	GLIP1	Resistencia sistémica adquirida	NE		1.5	1.5
AT5G42020	BIP2	Respuesta al estrés	BIP5 Niben101Scf04126g01011.1 NbS00020855g0001.1	BIP5	2	2

Locus en Tair	Nombre de proteína	GO term	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	Ontología o producto	CIRP	CIRT
AT5G45800	MEE62	Resistencia sistémica adquirida	Probable LRR NbS00022774g0009.1 NbS00016395g0015.1	LRR	2	2
AT5G50720	HVA22E	Respuesta al estrés	HVA22-like protein Niben101Scf03886g04003.1 NbS00031130g0003.1	Respuesta al estrés	1.5	1.5
AT5G55990	CBL2	Respuesta hipersensible	CBL2 NbS00029252g0013.1	CBL2	1.5	1.5

7.2.2 Expresión diferencial de genes asociados con RNAi en plantas protegidas con CIRP y CIRT antes de la infección por PepGMV

Al analizar los genes relacionados con RNAi en plantas protegidas con CIRP y CIRT (Tabla 7), con alta identidad con genes anotados en el transcriptoma de *N. benthamiana* (Bombarely *et al.*, 2012; Nakasugi *et al.*, 2013) se observó que algunos casos tienen nombres diferentes entre *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana benthamiana* por lo que se hace referencia a ellos como los que mostraron valores positivos y los que mostraron valores negativos. Los transcritos con valores positivos fueron DICER-LIKE 2 (DCL2), DCL4, ARGONAUTE 3 (en *N. benthamiana* es AGO2), AGO5, AGO6, AGO7, AGO10, NUCLEAR RNA POLYMERASE D2B (NRPD2B/POL IV), NUCLEAR RNA POLYMERASE D1 (NRPD1A), DAWDLE (DDL), DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3 (DMS3), DSRNA-BINDING PROTEIN 3 (DRB3), DRB4, DRB5, DOMAINS REARRANGED METHYLASE 3 (DRM3), RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6), CHROMO-METHYLASE 3 (CMT3), PENTATRIPEPTIDE REPEAT (PPR), SU(VAR)3-9 HOMOLOG 1 (SUVH1), SUVH5 and HUA ENHANCER 1 (HEN1). Estos genes participan en rutas entrelazadas de regulación génica y defensa de la planta produciendo y utilizando diferentes sRNAs (siRNA, miRNA, ta-siRNA, nat-siRNA and hc-siRNA), que proporcionan defensa contra virus, regulación del desarrollo, respuesta a estrés y silenciamiento transcripcional (Eamens *et al.*, 2008; Nakasugi *et al.*, 2013; Borges y Martienssen, 2015). En plantas protegidas con CIRP se observaron genes con valores positivos como Argonauta 4 (en *N. benthamiana* AGO4a); porque AGO9 de *A. thaliana* es homóloga de AGO4 de *N. benthamiana* AGO4b (Nakasugi *et al.*, 2013), DRM2, VARIANT IN METHYLATION 1(VIM1) y SUVH2. Mientras que en plantas protegidas con la construcción heteróloga CIRT, los genes con valores positivos fueron RDR2 y SUVH4. Además los genes con

valores positivos de CIRP y otros de CIRT, se asocian con la síntesis de siRNA y metilación (Eamens *et al.*, 2008).

Se observaron genes con valores negativos en plantas protegidas con ambas construcciones como DCL1, DCL3, AGO1, AGO2, RNA Pol II (NRPB1), DRB1, DRB2, DOMAINS REARRANGED METHYLASE 1 (DRM1), SUVH3 y SUVH6. DCL1 que procesa miRNA de 21 nt (Dong *et al.*, 2008) y DCL3 que se involucra en la biogénesis de hc-siRNAs (Kotakis *et al.*, 2011). En plantas protegidas con CIRP los genes que mostraron valores negativos fueron RDR2 y SUVH4. Mientras que, en plantas protegidas con CIRT los genes con valores negativos fueron AGO4a, DRM2, V1MI y SUVH2.

Tabla 7. Lista de transcritos obtenidos de plantas de *N. benthamiana* protegidas con construcciones homólogas (CIRP) y heterólogas (CIRT), ante el desafío con PepGMV. Los valores sub y sobre regulados son cambios en la expresión de los transcritos asociados a la activación de componentes que participan en el RNAi. Se presenta diferentes claves de anotaciones en genoma de *Nicotiana benthamiana* Niben0.4.4 (NbS000) y Niben1.0.1 (Bombarely *et al.*, 2012). Nbv3K, Nbv6.1 (Nakasugi *et al.*, 2013). NbD (Kourelis *et al.*, 2018). NE=No encontrado.

TAIR locus	Proteína	Descripción	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	CIRP sobre o sub regulación	CIRT sobre o sub regulación
AT1G01040	DCL1 (DICER-LIKE 1)	DICER es una RNA helicasa involucrada en el procesamiento de miRNA and siRNA y el silenciamiento génico inducido por virus.	DCL1 Nbv3K605750463 Nbv6.1trP38701 Niben101Scf03304g01025.1 NbS00015538g0006.1	-0.33	-0.41
AT3G03300	DCL2 (DICER-LIKE 2)	Funciones en la respuesta de silenciamiento antiviral. Participa en la producción de ta-siRNAs.	DCL2 Nbv3K725833766 Nbv6.1trP4604 Niben101Scf08272g00021.1 Niben101Scf06666g01011.1	0.70	0.53
AT3G43920	DCL3 (DICER-LIKE 3)	Necesaria para la formación endógena de siRNA (pero no de miRNA) dependiente de RDR2.	DCL3 Nbv3K585704110 Nbv6.1trP10636	-0.43	-0.53
AT5G20320	DCL4 (DICER-LIKE 4)	Cataliza el procesamiento de precursores de ta-siRNA en una ruta de biogénesis de sRNA distinta. Participa en la producción de siRNAs primarios de 21 nt tanto de	DCL4 Nbv3K725837175 Nbv3K625768999 Nbv6.1trP61740	0.829	0.93

TAIR locus	Proteína	Descripción	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	CIRP sobre o sub regulación	CIRT sobre o sub regulación
		construcciones repetidas invertidas, como de secuencias endógenas, así como en la producción de siRNAs secundarios de 21 nt dependientes de RDR6, involucrados en la señalización de célula a célula de largo alcance. Se une a DRB4 una proteína de unión a dsRNA.			
AT1G48410	AGO1 (ARGON AUTA 1)	Codifica un cortador de RNA que recluta selectivamente microRNAs and siRNAs.	AGO1a / AGO1-1 Nbv3K705826800 Nbv6.trA73469 Niben101Scf12841g03 019.1 AGO1b Niben101Scf08137g02 022.1 Niben101Scf05146g06 007.1	-1.1	-1.06
AT1G31280	AGO2 (ARGON AUTA 2)	Se une a los siRNAs virales y participa en la respuesta de defensa antiviral.	Nbv3K585706870 Nbv3K785652117 Nbv3K705830082	-1.05	-1.7
AT1G31290	AGO3 (ARGON AUTA 3)	Funciones en la respuesta de defensa a virus, silenciamiento de genes por RNA, regulación de transcripciones y traducciones con plantilla de ADN.	AGO2 Nbv3K585706870	0.82	1.193
AT2G27040	AGO4 (ARGON AUTA 4)	Participa en el silenciamiento génico mediado por siRNA. Mutaciones de pérdida de función reducen la metilación de CpNpG y CpHpH específicas del sitio y aumentan la susceptibilidad a patógenos bacterianos.	AGO4a Nbv3K585737054 AtAGO9 - AGO4b Nbv3K5745626388 Niben101Scf05519g01 007.1	0.18	-0.123
AT2G27880	AGO5 (ARGON AUTA 5)	Requerida para el silenciamiento por RNA. Confiere resistencia al virus X de la papa.	AGO5 Nbv3K585731374 Nbv6.1trP59647 Niben101Scf04371g04 008.1	2.13	1.05

TAIR locus	Proteína	Descripción	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	CIRP sobre o sub regulación	CIRT sobre o sub regulación
AT2G32940	AGO6 (ARGON AUTA 6)	Codifica una proteína nuclear de 879 aminoácidos que contiene dominios conservados PAZ y PIWI y es importante para acumulación de siRNAs específicos relacionados con la heterocromatina y la metilación del ADN y TGS.	AGO6 Nbv3K705827462 Nbv6.1trP35996	0.49	0.693
AT1G69440	AGO7 (ARGON AUTA 7)	Se requiere para la acumulación de TAS3 ta-siRNAs, pero no para la acumulación de miR171, miR173, miR390 o mi391.	AGO7 Nbv3K585720936 Nbv6.1trP11465 Niben101Scf20224g0004.1 Niben101Scf00272g02007.1 NbD002754.1	0.063	0.59
AT5G43810	AGO10 (ARGON AUTA 10)	Función en la respuesta de defensa a virus, silenciamiento por RNA y proceso metabólico de miRNA.	AGO10 Nbv3K585734208 Nbv6.1trP33879 Niben101Scf01240g11006.1 NbD010099.1 NRPD2b NbS00016929g0017.1	0.961	1.954
AT3G18090	Pol IV NRPD2B	Codifica una subunidad de RNA polimerasa IV (RNA polimerasa D). NRPD2b está estrechamente relacionada con NRPD2a, pero tiene niveles más bajos de transcripción y no afecta al siRNA cuando es mutada.		0.69	1.74
AT1G63020	Pol IV NRPD1A SDE4	Codifica una de las dos subunidades alternativas más grandes de la supuesta RNA polimerasa IV (RNA polimerasa D) específica de plantas. Requerida para PTGS.	NRPD1A Nbv3K585708997	0.84	1.17
AT4G35800	RNA Pol II (NRPB1)	Codifica la subunidad más grande y única de la RNA polimerasa II dependiente de ADN nuclear.	NRPB1 NbC23346514g0001.1	-0.81	-0.74
AT3G20550	DDL	Participa en la producción de miRNAs involucrados en el silenciamiento de genes	NE	0.614	1.05

TAIR locus	Proteína	Descripción	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	CIRP sobre o sub regulación	CIRT sobre o sub regulación
		miRNA			
AT3G49250	DMS3 (DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3)	Puede potenciar la unión de ácidos nucleicos para facilitar la modificación epigenética mediada por RNA1 que implica siRNA secundarios y la diseminación de la metilación del ADN.	DMS3 NbS00047856g0005.1 Niben101Scf08455g00014.1	1.48	1.26
AT1G09700	DRB1 (DSRNA-BINDING PROTEIN 1)	Codifica una proteína nuclear de unión a dsRNA. Participa en la escisión de mRNA.	DRB1 Nbv3K605753726 DRB1501 NbD009575.1 Niben101Scf01181g02012.1	-2.44	-2.036
AT2G28380	DRB2 (DSRNA-BINDING PROTEIN 2)	Codifica una proteína citoplasmática de unión a dsRNA. A maternally expressed imprinted gene. DRB2 and DRB4 have antagonistic impacts on polymerase IV-dependent siRNA levels.	DRB2 Nbv3K585718488 Niben101Scf02669g05009.1 NbD013708	-0.46	-0.58
AT3G26932	DRB3 (DSRNA-BINDING PROTEIN 3)	Participa en la defensa antiviral mediada por la metilación.	DRB3 Nbv3K725608215	1.24	2.12
AT3G62800	DRB4 (DSRNA-BINDING PROTEIN 4)	Codifica una proteína nuclear de unión a dsRNA que interactúa específicamente con DCL4. Puede regular la función de DCL4 y por lo tanto afectar la biogénesis de miRNA. También tiene impacto en los niveles de siRNA dependientes de la polimerasa IV.	DRB4 Nbv3K725839976 Niben101Scf05841g01021.1	0.63	1.45
AT5G41070	DRB5 (DSRNA-BINDING PROTEIN 5)	Codifica una proteína de unión a dsRNA.	DRB5 Nbv3K585684100	1.44	1.46
AT5G15380	DRM1 (DOMAINS REARRANGED)	Codifica una MTasa involucrada en la metilación de ADN de <i>novo</i> y en el mantenimiento de la	DRM1 NbS00047903g0006.1	-0.88	-1.56

TAIR locus	Proteína	Descripción	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	CIRP sobre o sub regulación	CIRT sobre o sub regulación
	NGED METHYL ASE 1)	metilación asimétrica de secuencias de ADN.			
AT5G14620	DRM2 (DOMAI NS REARRA NGED METHYL ASE 2)	Tiene funciones de metilación del ADN, repuesta de defensa a hongos, silenciamiento génico y metilación de la histona H3K9.	DRM2 NbS00009663g0003.1	3.11	-1.37
AT3G17310	DRM3 (DOMAI NS REARRA NGED METHYL ASE3)	Requerida para el mantenimiento normal de la metilación de ADN no CG, para el establecimiento de la metilación de ADN dirigida por RNA desencadenada por la acumulación de secuencias repetidas asociadas a sRNAs.	DRM3 Nbv3K745624408 DRM2a NbD010724.1 Niben101Scf01334g06 016.1	0.27	1.26
AT4G11130	RDR2 (RNA- DEPEND ENT POLYME RASE 2)	Codifica una RNA polimerasa dependiente de RNA requerida para la formación de siRNA (pero no para miRNA) endógenos.	RDR2 Nbv3K625766705 Niben101Scf04296g00 019.1	-1.55	0.569
AT3G49500	RDR6 (RNA- DEPEND ENT POLYME RASE 6) SDE1	RNA polimerasa dependiente de RNA. Participa en la biogénesis de ta-siRNAs y otros siRNAs. Requerida para PTGS y para la resistencia a virus.	RDR6 Nbv3K585707928 Niben101Scf12609g01 010.1	1.54	1.61
AT1G69770	CMT3 (CHROM O- METHYL ASE 3)	Cromometilasa que participa en la metilación de residuos de citosina en sitios no CG. Participa en el silenciamiento génico.	CMT3 Nbv3K625768297 Niben101Scf02006g04 014.1	0.50	0.75
AT1G02420	PPR (PENTAT RICOPEP TIDE REPEAT)		PPR NbS00000911g0002.1 Niben101Scf00151g05 009.1 NbD001629.1	1.06	0.156
AT1G57820	V1MI (VARIAN T IN METHYL ATION1)	Funciones en la metilación de citosina en secuencias CG y mantenimiento de la metilación de ADN.	VIM1 NbS00027916g0013.1 Niben101Scf01582g09 001.1 ORTH2 NbD012430.1	1.29	-0.55
AT5G04940	SUVH1	Participa en el control	SUVH1	0.35	0.19

TAIR locus	Proteína	Descripción	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	CIRP sobre o sub regulación	CIRT sobre o sub regulación
	(SU(VAR) 3-9 HOMOL OG 1)	epigenético de la expresión génica y actúa como una histona MTase.	NbS00008825g0019.1		
AT2G33290	SUVH2 (SU(VAR) 3-9 HOMOL OG 2)	Participa en el control epigenético de la expresión génica y actúa como una histona MTasa.	SUVH2 NbC23204936g0001.1	0.095	-0.23
AT1G73100	SUVH3 (SU(VAR) 3-9 HOMOL OG 3)	Participa en el control epigenético de la expresión génica y actúa como una histona MTasa.	SUVH3 NbS00008825g0007.1	-0.091	-0.23
AT5G13960	SUVH4 (SU(VAR) 3-9 HOMOL OG 4)	Codifica una MTasa específica de H3K9- involucrada en el mantenimiento de la metilación del ADN.	SUVH4 NbS00002211g0017.1 NbD040130.1	-0.17	0.13
AT2G35160	SUVH5 (SU(VAR) 3-9 HOMOL OG 5)	Tiene actividad de histona MTasa in vitro contribuye al mantenimiento de H3-mK9 (metilación de histona H3 en Lys 9) y metilación no CG mediada por CMT3 in vivo.	SUVH5 NbS00025360g0007.1 Niben101Scf00614g00 025.1 NbD005519.1	1.83	1.89
AT2G22740	SUVH6	MTasa involucrada en la metilación de histonas.	SUVH6 NbS00018104g0005.1 NbD001814.1	-0.5	-0.29
AT4G20910	HEN1 Hua enhance r 1	Involucrada en la metilación <i>de novo</i> , metila el nucleótido terminal de los sRNAs de 24 nt.	HEN1 Nbv3K645785075 NbD011168.1	0.48	0.71
AT1G05950	AT1G05 950	Metilación Reparación de ADN	RECA NbD009068.1 Niben101Scf01116g01 005.1 Unnamed protein NbS00029630g0016.1 NbS00029754g0004.1 NbS00043925g0028.1 Niben101Scf02044g06 013.1	3.86	2.44
AT1G65660	SMP1	Participa en silenciamiento génico pre-mRNA-splicing factor SLU7-like	slu7 NbD028145 SMP1 NbS00031927g0008.1	2.78	2
AT2G04660	APC2	Participa en silenciamiento	APC2	2	2

TAIR locus	Proteína	Descripción	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	CIRP sobre o sub regulación	CIRT sobre o sub regulación
		génico	Niben101Scf10322g01013.1 NbS00038059g0007.1		
AT2G19930	RDR3 (RNA-DEPENDENT POLYMERASE 3)	Silenciamiento de genes por RNA	RDR3 NbD002592 Niben101Scf00257g00018.1 Niben101Scf04189g00002.1 RDR5 NbS00054825g0009.1	1.5	1.5
AT3G11440	MYB65 MYB DOMAIN PROTEIN 65	Unión a ADN Contiene sitio de unión a miRNA159	MYB16 NbD007160 MYB65 NbS00013240g0015.1	2	2
AT3G12210	AT3G12210	Proteína de unión a ADN	Niben101Scf12783g01008.1 NbS00028950g0007.1	2	2
AT3G13682	LDL2 LSD1-LIKE2	Involucrada en la metilación en H3K4	LDL2 Niben101Scf01976g00017.1 NbS00024949g0008.1	1.5	1.5
AT3G26932	DRB3 DSRNA-BINDING PROTEIN 3	Silenciamiento génico	DRB1 Niben101Scf09603g04002.1 DRB3 Nbv3K725608215	2	2
AT3G57300	INO80 ATINO80	Silenciamiento génico Reparación de ADN Mantiene la estabilidad del genoma	INO80 NbD012748 Niben101Scf01634g02020.1 NbS00008749g0009.1	1.5	1.5
AT4G16420	ADA2B	Silenciamiento génico Remodelación de la cromatina	ADA2B Niben101Scf03129g01013.1 ADA2B NbS00013870g0004.1	2	2
AT4G29830	VIP3 VERNALIZATION INDEPENDENCE 3	Involucrado en la metilación de histonas en H3-K36 y H3-K4	Niben101Scf02790g03009.1 VIP3 NbS00040297g0001.1	1.5	2
AT5G23570	SGS3 SUPPRESSOR OF GENE	Requerido para silenciamiento postranscripcional y resistencia a virus	SGS3 NbE44071533 Niben101Scf01326g11010.1	2	2

TAIR locus	Proteína	Descripción	Locus en <i>Nicotiana benthamiana</i>	CIRP sobre o sub regulación	CIRT sobre o sub regulación
	SILENCIN G 3		Niben101Scf05278g04 003.1 Nbv3K785651293 NbS00001969g0002.1		
AT5G55920	OLI2 OLIGOCE LLULA 2	Metilación	OLI2 NbS00015992g0001.1	1.5	1.5

Además, el análisis de la red de proteínas con STRING permitió visualizar las interacciones moleculares entre los genes expresados diferencialmente identificados a partir de los resultados de microarreglos y se observó la interacción de moléculas involucradas en la activación del RNAi y aquellas involucradas en el proceso de metilación activadas por CIRT (Fig. 11A) y CIRP (Fig. 11B). Destacan las proteínas involucradas en la biogénesis de diferentes sRNAs, sRNAs secundarios y componentes que participan activamente en el inicio y mantenimiento de la metilación del ADN dirigida por RNA (RdDM) (Eamens *et al.*, 2008; Nakasugi *et al.*, 2013; Borges y Martienssen, 2015).

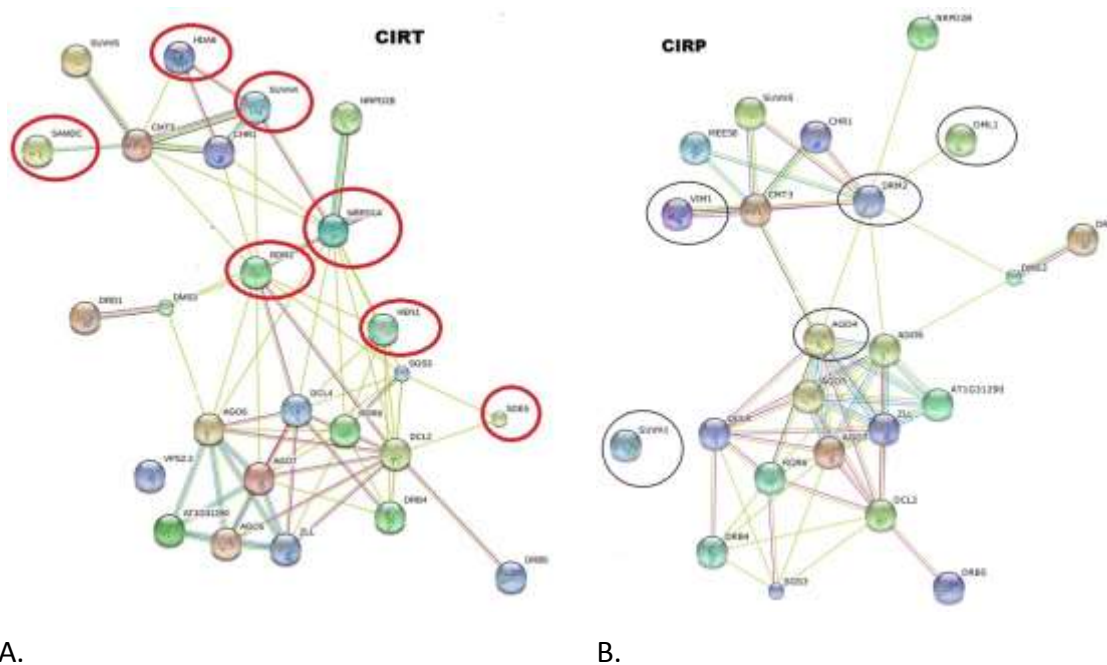


Figura 11. Red STRING de proteínas que muestran interacciones relacionadas con el RNAi. A. Se observa una alta conectividad entre las proteínas relacionadas con el silenciamiento génico y la metilación en CIRT. B. el subconjunto de proteínas implicadas en el silenciamiento génico y la metilación en CIRP. Los colores de las líneas que conectan las proteínas indican la interacción entre ellas.

7.2.3 Análisis de expresión diferencial por RT-qPCR

La validación de los genes de referencia mediante el gen Actina (ACT) permitió la normalización y el análisis del nivel de expresión relativa de los genes diana. Se presentan los resultados del RT-qPCR de siete genes asociados al RNAi (Fig. 12), previamente identificados por su expresión diferencial en el microarreglo de muestras de plantas de *N. benthamiana* protegidas con construcciones CIRP y CIRT e inoculadas con PepGMV. Estos genes incluyen DCL2, DCL3, DCL4, AGO1-1, AGO2, RDR6 y PPR1, en el análisis ANOVA de una vía todos mostraron diferencias significativas ($P = 0.001$).

El análisis de qPCR (Fig. 12) mostró que los genes RDR6, AGO2, DCL3 y AGO1-1 tenían niveles de expresión más altos 55, 38, 35 y 31 %, respectivamente, cuando las plantas estaban protegidas con construcciones CIRT heterólogas, mientras que los mismos genes, pero en plantas protegidas con CIRP homólogas representaron 8, 10, 8 y 17 %, respectivamente. Los niveles de expresión en los controles (cv con virus, plantas inoculadas con PepGMV y sv sin virus plantas libres de virus) fueron cercanos a cero. DCL4 tuvo un nivel de expresión mayor 6 % cuando las

plantas fueron protegidas con construcciones CIRT heterólogas, que cuando fueron protegidas por CIRP homólogas 2 % y en el control con virus se observó un nivel de expresión de 1.3 %. Sin embargo, PPR1 y DCL2 mostraron un patrón de expresión similar cuando se utilizaron las construcciones para protección y similar en los controles. PPR1 y DCL2 mostraron un nivel de expresión del 6 y 2 % respectivamente, cuando las plantas se protegieron con construcciones CIRT heterólogas, y cuando se protegieron con CIRP homólogas la expresión representó 40 y 27 % respectivamente. Mientras que en el control de con virus PPR1 y DCL2 tuvo un nivel de expresión de 10 y 11%, respectivamente y en los controles sin virus PPR1 y DCL2 tuvieron los niveles de expresión más altos representando 160 y 130%, respectivamente.

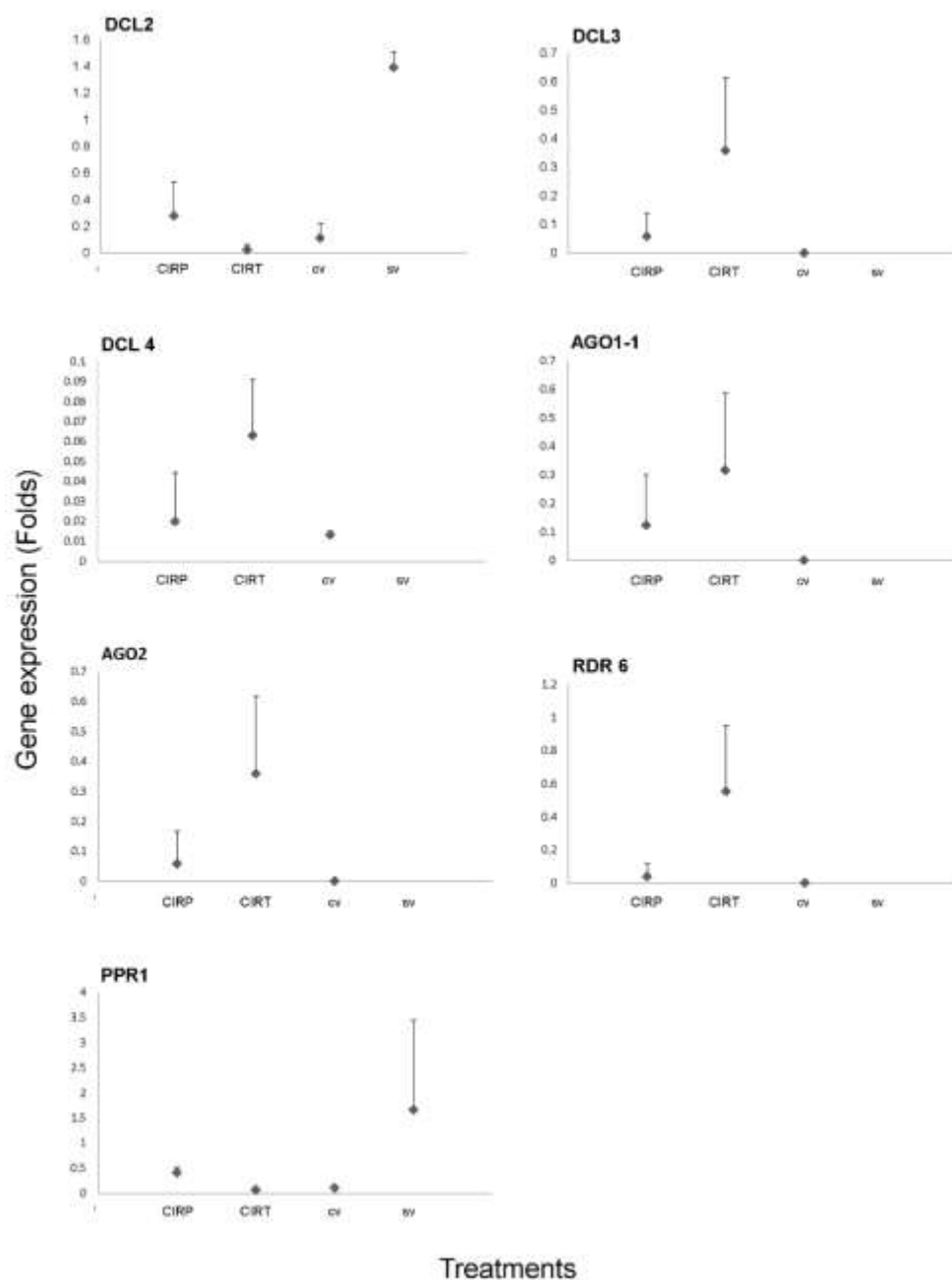


Figura 12. Análisis de expresión relativa por RT-qPCR de DCL2, DCL3, DCL4, AGO1, AGO2, RDR6 y PPR1, en plantas de *N. benthamiana* protegidas con CIRP (construcción homóloga de la región intergénica de PepGMV) y CIRT (construcción heteróloga de la región intergénica de ToChLPV) e inoculadas con PepGMV. Las medias indican una diferencia significativa ($P = 0.001$) entre los tratamientos (CIRT, CIRP, cv (con virus), sv (sin virus)).

7.3 Objetivo 3. Evaluar la eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección con diferentes modelos begomovirales en infecciones sencilla y mixta.

7.3.1 Identidad de los fragmentos propuestos para la construcción de dsRNA de cinco begomovirus

Las secuencias con las que se observó mayor identidad por pares de bases en el objetivo 1, se seleccionaron para las construcciones de dsRNA. Por ejemplo, el fragmento de TYLCV mostró una identidad del 99.4 % con la secuencia KX427166, así como un 99.3 % con la secuencia EF210555 ambas de TYLCV previamente reportadas en México. En el caso de los fragmentos de 1100 pb de ToChLPV (Fig. 13), se observó una identidad por pares de bases del 98 % con la secuencia HM459852 y del 94.3 % con la secuencia AY339619 ambas pertenecientes al ToChLPV aislado en BCS. Por otro lado, en el análisis de las secuencias obtenidas de SLCuV con los cebadores mencionados en la metodología, se obtuvo una identidad nucleotídica del 98.3 % con la secuencia KM595163 del SLCuV reportado en Jordania y un 98.1 % con la secuencia MF187211 previamente reportada en BCS. Estos resultados confirman la presencia constante de estos begomovirus en los campos agrícolas del Estado de Baja California Sur.

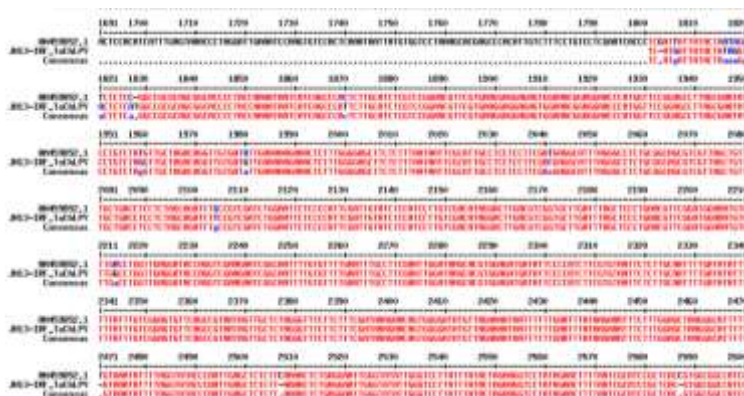


Figura 13. Alineamiento de secuencias de ToChLPV. Secuencia obtenida de ToChLPV en alineamiento con HM459852.1 obtenida de NCBI, el color rojo indica la alta identidad de las secuencias.

Se determinó la identidad nucleotídica de los fragmentos seleccionados para las construcciones dsRNA de los begomovirus PepGMV (NC_004101), ToChLPV (AY339619), TYLCV (KX427166), CuLCrV (MN625831) y SLCuV (MF187211), descritos en la metodología. Los resultados del análisis de identidad por pares de las secuencias del fragmento AC1-RI-AV1 del ToChLPV con el fragmento AC1-RI-AV1 del PepGMV, mostraron una identidad nucleotídica del 52.8 %. Mientras

que los resultados del análisis del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV con el fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV mostró una identidad del 52.2 %, el alineamiento del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV y el fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV presentó una identidad del 48.1 %. Finalmente, los resultados del análisis del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV con el fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV mostró una identidad por pares del 44.2 %.

Por otro lado, los resultados del análisis por pares de bases del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV y del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV mostró una identidad del 68.7 %, la identidad más alta en el alineamiento de estos fragmentos. Sin embargo, el alineamiento del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV con el fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV mostró una identidad del 56.4 %, el alineamiento del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV con el fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV mostró una identidad del 42.9 %, la identidad más baja en el análisis de estas secuencias. En estos resultados mostraron la mayor identidad del fragmento de ToChLPV y los fragmentos de PepGMV y TYLCV, respectivamente. Mientras que el fragmento de PepGMV mostró mayor identidad con SLCuV, CuLCrV y con ToChLPV, respectivamente.

7.3.2 siRNAs de mayor eficiencia de cinco begomovirus

El análisis de predicción de la eficacia de siRNA utilizando la plataforma en línea siPRED con los fragmentos AC1-RI-AV1 de PepGMV, de ToChLPV, de TYLCV, de CuLCrV y de SLCuV, permitió buenos resultados. Con los primeros dos fragmentos de PepGMV y ToChLPV, fueron desarrolladas las construcciones de doble cadena de las que hace referencia el objetivo dos. La predicción de siRNAs de alta eficacia tiene la finalidad de establecer cuál de las construcciones es más efectiva en el sistema de protección que activa el mecanismo de RNAi, ante la infección sencilla y mixta por los begomovirus PepGMV, ToChLPV, TYLCV, CuLCrV y SLCuV. Con el análisis del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV, se obtuvieron 238 siRNAs (Tabla 8) candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011), que presentan un rango de inhibición hacia el RNAm diana de entre el 70.26 y el 94.87 %. Con el análisis del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV, se obtuvieron 209 siRNAs (Tabla 9) candidatos de alta precisión predictiva que presentan un rango de inhibición entre 70.07 y 94.53 %. Con el análisis del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV, se obtuvieron 363 siRNAs (Tabla 10) candidatos de alta precisión predictiva, que presentan un rango de inhibición entre 70.08 y 94.60 %. El análisis del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV

presentó 225 siRNAs (Tabla 11) candidatos de alta precisión predictiva, que muestran un rango de inhibición entre 70.48 y 94.82 %. Mientras que, con el análisis del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV se determinaron 250 siRNAs (Tabla 12) candidatos de alta precisión predictiva, que presentan un rango de inhibición entre 70.11 y 94.32 %. Se obtuvo la mayor cantidad de candidatos de alta precisión predictiva cuando se analizó el fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV con 363 siRNAs, seguido de los obtenidos con el fragmento de SLCuV con 250 siRNAs, con el fragmento de ToChLPV se obtuvieron 238 siRNAs. Mientras que con el fragmento de CuLCrV se obtuvieron 225 siRNAs y con el fragmento de PepGMV se obtuvieron 209 siRNAs, el menor número de candidatos de alta predicción. En esta sección de resultados Se presentan 50 siRNAs derivados de cada fragmento cada virus y el resto se presentan en Anexos.

En el análisis de predicción de la eficacia de siRNA con el fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV, se obtuvieron 238 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva, es decir siRNAs de alta eficacia (≥ 70 % de inhibición del RNAm) (Pan *et al.*, 2011), que presentan un rango de inhibición que oscila entre 70.26 y 94.87 %. Los siRNAs del 51 al 230 se presentan en el anexo E.

Tabla 8. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
1	UUUUUAAAGAGAAGCUCCC	GGGAGCUUCUCUUUAAUAA	242 - 260	94.87
2	UUAGUAUAAUCAUCGAGGG	CCCUCGAUGAUUUAUCUAA	41 - 59	94.82
3	AUUUUUAAAGAGAAGCUCC	GGAGCUUCUCUUUAAUAAU	243 - 261	94.7
4	UUUUUCUAACAUACCCACAC	GUGUGGGUAUGUUAGAAAA	646 - 664	94.48
5	AUUUUUUUCUAACAUACCC	GGGUAUGUUAGAAAAUAAU	650 - 668	93.83
6	UAAUUAGACUACACACUCG	CGAGUGUGUAGUCUAAUUA	935 - 953	93.7
7	UCUAGUAUAAAUAAGGACC	GGUCCUUUUUAUACUAGA	776 - 794	93.63
8	UUAGAGUUUUUGAAGAGAG	CUCUCUCAAACUCUAA	741 - 759	93.48
9	UUUUUCAGUAUCACAACCU	AGGUUGUGAUACUGAAAAA	212 - 230	93.45
10	AAAAAUUAUCAAAAUUGC	GCAAUUUUGAUUAUUUUUU	566 - 584	93.36
11	AAAAUUGCAAGAGAAUUGC	GCAAUUCUCUUGCAAUUUU	555 - 573	93.32
12	AUUAGUAUAAUCAUCGAGG	CCUCGAUGAUUUAUCUAAU	42 - 60	93.26
13	UAAUAAUUAGACUACACAC	GUGUGUAGUCUAAUUAUUA	938 - 956	93.25
14	AAUUUUUUUCUAACAUACC	GGUAUGUUAGAAAAUAAUU	651 - 669	93.24
15	UAAUAAUUACGGAUGGCC	GGCCAUCGUAUAAUUAUUA	834 - 852	93.21
16	AUAAUUAGACUACACACUC	GAGUGUGUAGUCUAAUUAU	936 - 954	93.16
17	UUCAAAACGCAAAAUUGC	GGCAAUUUUGCGUUUUGAA	486 - 504	92.72
18	UUUUAGACCACAAAACAAC	GUUGUUUUUGUGGUCUAAU	973 - 991	92.66

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
19	UAGAGUUUUUGAAGAGAGC	GCUCUCUUCAAAAACUCUA	740 - 758	92.56
20	UAUAUCAAUUUGCAAGAG	CUCUUGCAAUUUUGAUUA	561 - 579	92.55
21	UGAUUGGCUAACUUUAUCC	GGAUAAAGUUAGCCAAUCA	911 - 929	92.52
22	UUUAACCAAGGAAGAAACC	GGUUUCUCCUUGGUUAAA	622 - 640	92.27
23	UAACCUAGACAGGAUUAUC	GAAUAUCCUGUCUAGGUUA	187 - 205	91.93
24	UUGAAAGUUCUAUAGGACC	GGUCCUAUAGAACUUUCA	796 - 814	91.86
25	AAAUCUAUAUUCUGGACC	GGUCCAGAUUAUAGAUUU	1010 - 1028	91.84
26	UUCAAAAUCUAUAUAUCUG	CAGAUUAUAGAUUUUGAA	1014 - 1032	91.83
27	UUUUCAAAAUCUAUAUAUC	GAUAUAUAGAUUUUGAAA	1016 - 1034	91.66
28	AUUCAAAACGCAAAAUUGC	GCAAUUUUGCGUUUUGAAU	487 - 505	91.54
29	UUCUAGUAUAAAUAAGGAC	GUCCUUAUUUAUACUAGAA	777 - 795	91.46
30	UCAAUAUCUAUAUAUCUGG	CCAGAUUAUAGAUUUUGA	1013 - 1031	91.36
31	UUUGAAGAGAGCUCAAUUG	CAAUUGAGCUCUCUUCAAA	733 - 751	91.08
32	UAUUUUCUAACAUACCCAC	GUGGGUAUGUUAGAAAUA	648 - 666	90.79
33	UUUCAGUAUCACAACCGU	ACAGGUUGUGAUACUGAAA	210 - 228	90.4
34	UUAGGCAUUUUCAAUAUCU	AGAUUUUGAAAUGCCUAA	1023 - 1041	90.29
35	UUCUUAGAGUUUUUGAAG	CUUCAAACUCUAAGGAA	745 - 763	90.27
36	UUGUAAUAUUAGACUAC	GUAGUCUAAUUUAUAAACA	942 - 960	90.11
37	AAAUCUAUAUUCUGGAC	GUCCAGAUUAUAGAUUUU	1011 - 1029	90.11
38	UUUCAAAAUCUAUAUAUCU	AGAUUAUAGAUUUUGAAA	1015 - 1033	89.72
39	UACUAUAUUUACAAAAAUG	CAUUUUUGUAAAUAUAGUA	706 - 724	89.48
40	UCUUUUUCAGUAUCACAAC	GUUGUGAUACUGAAAAGA	214 - 232	89.29
41	UAGACCACAAAACAACUUG	CAAGUUGUUUUGUGGUCUA	970 - 988	89.11
42	AAUUUAUAGACCACAAAAC	GUUUUGUGGUCUAUAAAUA	976 - 994	88.89
43	UAACGCAAAUUUAUAGAC	GUCUAUAAAUUUGUCGUUA	984 - 1002	88.69
44	AAAUUAUUUUCUAACAUAC	GUAUGUUAGAAAUAUUUU	652 - 670	88.68
45	UUUCUUUUUCAGUAUCACA	UGUGAUACUGAAAAGAAA	216 - 234	88.57
46	UAUAGACCACAAAACAACU	AGUUGUUUUGUGGUCUAUA	972 - 990	88.44
47	AAUAAUUAGACUACACACU	AGUGUGUAGUCUAAUUUAU	937 - 955	88.42
48	UUAUAUUUAGACUACACA	UGUGUAGUCUAAUUUAUUA	939 - 957	88.4
49	AAGUUGUUAUUUAUAGAC	GUCUAAUUUAUAAACAACU	945 - 963	88.38
50	UAUUAGUAUAAUCAUCGAG	CUCGAUGAUUAUACUAAUA	43 - 61	88.22

En el análisis de predicción de la eficacia de siRNAs con el fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV, se obtuvieron 209 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011), que presentan un rango de inhibición que oscila entre 70.07 y 94.53 %. Los siRNAs del 51 al 209 se presentan en el anexo F.

Tabla 9. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
1	UUAGUAUUGUCAUUGAGGG	CCCUCAAUGACAAUACUAA	44 - 62	94.53
2	AAAGACUCCAAAAAUCGC	GCGAUUUUUUGGAGUCUUU	842 - 860	94.35
3	UGUCUAUUUAAUCUCAGCC	GGCUGAGAUUAAAUAGACA	882 - 900	94.17
4	UUAACAUAUCCACAAUGCG	CGCAUUGUGGAUAUGUUAA	633 - 651	93.52
5	UUGCUGAAUAUUUUGGUCG	CGACCAAAAUAUUCAGCAA	89 - 107	93.52
6	UUAUCCUCGUUUAACAACG	CGUUGUUAACGAGGAUAA	132 - 150	93.2
7	UAACAUAAAGGCUAACAUC	GAUGUUAGCCUUUAUGUUA	199 - 217	92.24
8	UAAAGACUCCAAAAAUCG	CGAUUUUUUGGAGUCUUUA	843 - 861	92.04
9	AUUAGUAUUGUCAUUGAGG	CCUCAUGACAAUACUAAU	45 - 63	91.96
10	UCACUCUGUCUAUUUAAUC	GAUUAAAUAGACAGAGUGA	888 - 906	91.4
11	UUAUCAUAACAUAAGGCU	AGCCUUUAUGUUAUGAUAA	205 - 223	91.22
12	UGAUUGGUCAGUCAAUAUC	GAUUUUGACUGACCAAUCA	925 - 943	91.08
13	AUUACAUAACAAAAGAUGG	CCAUCUUUUGUUAUGUAAU	371 - 389	90.57
14	AACCAUUUUGAAUUAAGC	GCUUUAAUUCAAAUGGUU	1025 - 1043	90.29
15	AAUGCAACAUCAAGAUGC	GCAUCUUUGAUGUUGCAUU	476 - 494	90.22
16	AUUUUCUUAACAUAUCCAC	GUGGAUAUGUUAAGAAAAU	639 - 657	89.87
17	UUUAUGUAUAUAAGGGACU	AGUCCCUUAUAUACAUAUA	767 - 785	89.87
18	UACCAUAACGCUGUAAAUG	CAUUUACAGCGUUAUGGUA	288 - 306	89.59
19	AUAUUUGCAAAAUGCCAC	GUGGCAUUUUUGCAAUAU	693 - 711	89.55
20	UUAUGUAUAUAAGGGACUC	GAGUCCCUUAUAUACAUAUA	766 - 784	89.5
21	AAAUACAAUAUUUGGUGG	CCACCAUUUAUUUGAUUUU	912 - 930	89.08
22	UUUUCUUAACAUAUCCACA	UGUGGAUAUGUUAAGAAAA	638 - 656	89.01
23	AACAUAAGGCUAACAUCG	CGAUGUUAGCCUUUAUGUU	198 - 216	88.91
24	UCAAAGCAAUAAGACG	CGUCUUUAUUUGCUUUUGA	312 - 330	88.91
25	UGAUUAUUGUGAAUCUGGG	CCCAGAUUCACAAUUAUCA	352 - 370	88.72
26	UCGUUUACAUGUAAAAC	GUUUUUACAUUGUAAACGA	658 - 676	88.72
27	AAUAUCUAGACUUGACAGG	CCUGUCAAGUCUAGAUUUU	951 - 969	88.61
28	UCUGUCUAUUUAAUCUCAG	CUGAGAUUAAAUAGACAGA	884 - 902	88.45
29	UUGUUAGUUAUCAUAACA	AUGUUAUGAUAAACUAACA	212 - 230	88.35
30	UAGUUAUCAUAACAUAAG	CUUUAUGUUAUGAUAAUA	208 - 226	87.95
31	AAUCCUUUCGUUUAACAUG	CAUUGUAAACGAAAGGAUU	665 - 683	87.84
32	UAACCAUUUUGAAUUAAG	CUUUAUUCAAAAUGGUUA	1026 - 1044	87.76
33	UAGACCGAUUAGUAUUGUC	GACAAUACUAAUCGGUCUA	52 - 70	87.75
34	UUACAUAACAAAAGAUGGU	ACCAUCUUUUGUUAUGUAA	370 - 388	87.7
35	UUUGCAAAAUGCCACUAC	GUAGUGGCAUUUUUGCAAA	690 - 708	87.51
36	UAAUAUUUAAGGAUGGCCG	CGGCCAUCCUAUAAUAUUA	813 - 831	87.2
37	AUAUUUUGGUCGGAGUUGU	ACAACUCCGACCAAAAUAU	82 - 100	87.19
38	UGAAUUAAGCGAUAAAUG	CAUUUAUCGCUUUAUUUCA	1017 - 1035	87.19
39	UUACAAUGUAAAACAUUU	AAAUGUUUUUACAUUGUAA	654 - 672	87.05
40	UUGAAUUAAGCGAUAAA	AUUUAUCGCUUUAUUCAA	1018 - 1036	86.95

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
41	AAAGCAAUAAAGACGACG	CGUCGUCUUUAAUUUGCUUU	309 - 327	86.9
42	UACAUAAACAAAAGAUGGUG	CACCAUCUUUUGUUAUGUA	369 - 387	86.88
43	ACAUUUUCUUAACAUAUCC	GGAUUAUGUUAAGAAAUGU	641 - 659	86.74
44	UAAUUUAAAAUGGGCAGUG	CACUGCCAUUUUAAAUA	580 - 598	86.74
45	AAUAUCUAGACUUGACAG	CUGUCAAGUCUAGAUUUU	952 - 970	86.62
46	AACAUUUUCUUAACAUUUC	GAUAUGUUAAGAAAUGUU	642 - 660	86.59
47	AAAAAUACAUAACAAAAG	CUUUUGUUAUGUAAUUUUU	375 - 393	86.5
48	UUUACA AUGUAAAA CAUU	AAUGUUUUUACA UGUAAA	655 - 673	86.28
49	AUUUACAACUCCUCCUAUG	CAUAGGAGGAGUUGUAAA	172 - 190	86.25
50	UUUCUUAACAUUCCACAA	UUGUGGAUAUGUUAAGAAA	637 - 655	86.09

En el análisis de predicción de la eficacia de siRNA con el fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV, se obtuvieron 363 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011), que presentan un rango de inhibición que oscila entre 70.08 y 94.6 %. Los siRNAs del 51 al 363 se presentan en el anexo G.

Tabla 10. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
1	UUGUUCUCUCUCUAAAGAG	CUCUUUAGAGAGAGAACAA	625 - 643	94.6
2	UUAAAAACCUAGAAACCC	GGGUUUCUAGGUUUUUUA	591 - 609	94.59
3	UAAAAACCUAGAAACCC	GGGGUUUCUAGGUUUUUUA	590 - 608	94.56
4	UUUAUGUUUCUCCAUUUCU	AGAAAUGGAGAAACAUA	149 - 167	94.27
5	UAACAUACAACGAAUCCG	CGGAUUUCGUUGUAUGUUA	1051 - 1069	94.27
6	UAUAUUAAAAGAGAAGGCC	GGCCUUCUCUUUAAUAUA	241 - 259	94.12
7	UAGAAGUUUAUGUUUCUCC	GGAGAAACAUAACUUCUA	155 - 173	94.05
8	UUUUUCCUAACAUAUCCC	GGGAUAUGUUAAGGAAUA	646 - 664	94.04
9	UACAAAUUACCAAUAGC	GCUAUUUGGUAAUUUUGUA	775 - 793	93.91
10	AUUUUUCCUAACAUAUCC	GGAUUAUGUUAAGGAAUA	647 - 665	93.9
11	UAAGUAUUGUCAUUGAGGG	CCCUCUAUGACAAUACUUA	41 - 59	93.87
12	UUAGAUAGGAUUUUUAGUC	GACUAAAAUCCUAUCUAA	180 - 198	93.62
13	UAACAUAUCCCAAUUGUUC	GAACAAUUGGGAUAUGUUA	638 - 656	93.57
14	UAUAUAAAGACAAAUGAAC	GUUCAUUUGUCUUUAUAUA	962 - 980	93.37
15	UAAUAGCUAACAUACAACG	CGUUGUAUGUUAAGCUAUA	1058 - 1076	93.32
16	UAUGCCAAAAAUUUUCC	GGAAUAAUUUUUGGCAUA	657 - 675	93.3
17	UUAAUAGCUAACAUACAAC	GUUGUAUGUUAAGCUAUA	1059 - 1077	93.26
18	UAUUAAUAGCUAACAUAC	GUAUGUUAAGCUAUAUAUA	1062 - 1080	93.22
19	UAAUAUUUACGGAUGGCC	GGCCAUCCGUAAUAUAUA	845 - 863	93.21
20	UUACCAAUAGCCAUUUGG	CCAAAUGGCUAUUUGGUA	768 - 786	93.16

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
21	AUAAGUAUUGUCAUUGAGG	CCUCAUGACAAUACUUAU	42 - 60	92.99
22	UAGAUAGGAUUUUUAGUCC	GGACUAAAAAUCCUAUCUA	179 - 197	92.96
23	UUUGGAGUUUUCCAAAUCG	CGAUUUGGAAAACUCCAAA	348 - 366	92.54
24	UUCAUUUAGAAGUGGAUCC	GGAUCCACUUCUAAAUGAA	1015 - 1033	92.53
25	AUUGAUUUUGGAGUUUUCC	GGAAAACUCCAAAUAUCAAU	354 - 372	92.16
26	UACAACAGAUUAAGAUC	GGAUCUUAUAUCUGUUGUA	1138 - 1156	92.07
27	UUUUGGAGUUUUCCAAAUC	GAUUUGGAAAACUCCAAA	349 - 367	92.05
28	UAGUGCAAGACAAACUACU	AGUAGUUUGUCUUGCACUA	992 - 1010	91.69
29	UUUUGAAUUGCAAUGUACU	AGUACAUUGCAAUUCAAA	796 - 814	91.69
30	AUUUUGAAUUUUGAAUUGC	GCAAUUCAAAUAUCAAU	804 - 822	91.57
31	UAUAAAGACAAAUGAACAC	GUGUUCAUUUGUCUUUAUA	960 - 978	91.57
32	UAUCUAACGUUUGAGGAUG	CAUCCUCAAACGUUAGUA	940 - 958	91.53
33	UUUAAUGAUUUGAUUUUUG	CAAAAUACAAUUAUAAA	824 - 842	90.88
34	AAUAUAUUAAAAGAGAAGG	CCUUCUCUUUUAUAUAUU	243 - 261	90.66
35	UUUAAUCAAGUUCAGAUUG	CAUCUGGAACUUGAUUAAA	120 - 138	90.42
36	UAAGUUCAAUUUAGAUAG	CUAUCUAAAUAUGAACUUA	191 - 209	90.25
37	UGUACUUUUACAAAUAUAC	GUAUUUUUGUAAAAGUACA	783 - 801	90.25
38	AAAUACCAAUGUAAGAACC	GGUUCUUAUAUUGGUUUUU	486 - 504	90.23
39	UAUCCCAAUUGUUCUCUCU	AGAGAGAACAUAUGGGAUA	633 - 651	90.22
40	UUCUCCAUUUCUUCUUCU	AGAAGAAAGAAAUGGAGAA	142 - 160	90.12
41	UUUCCCAAUUAUUUUUUUU	AGGUUUUUUAUUUGGGAUA	599 - 617	90.11
42	UUUAUUUUAAAUAUAUGCC	GGCAUAUAUUUUAAAUAUA	670 - 688	90.07
43	AUAUAUUAAAAGAGAAGGCC	GGGCCUUCUCUUUUUAUAUA	240 - 258	90.04
44	UCUUCUUUUAAUCAAGUUC	GAACUUGAUUAAAAGAAGA	126 - 144	90
45	UUUCUCCAUUUCUUCUUC	GAAGAAAGAAAUGGAGAAA	143 - 161	89.92
46	UUAAUCAAGUUCAGAUUGA	UCAUCUGGAACUUGAUUAA	119 - 137	89.92
47	UACAAUUUCAUAUUUUUAA	CUUAAAUAUGAAAUAUGUA	206 - 224	89.7
48	AUUAAAAACCUAGAAACC	GGUUUCUAGGUUUUUUAUA	592 - 610	89.6
49	UUACAAAUAUACCAAUAG	CUAUUUGGUAAUUUUGUAA	776 - 794	89.53
50	AUUCAUUUCAACAUGCCUC	GAGGCAUGUUGAAAUGAAU	690 - 708	89.51

En el análisis de predicción de la eficacia de siRNA con el fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV, se obtuvieron 225 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011), que presentan un rango de inhibición que oscila entre 70.48 y 94.82 %. Los siRNAs del 51 al 225 se presentan en el anexo H.

Tabla 11. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
1	UUAAGUGUCCUAAAUUGU	ACAAUUUAGGACACUUUAA	1036 - 1054	94.82
2	UUUCUUAACAUUCCUCAG	CUGAGGAUAUGUUAAGAAA	628 - 646	94.09
3	AUUAUCAUAACAUAAAGGC	GCCUUUAUGUUAUGAUAAU	197 - 215	93.99
4	UAUCAUUUAUGAUAAAGG	CCUUUAUCUAUAAAUGAUA	1014 - 1032	93.68
5	UUAUUUACAAAUUGCCAC	GUGGCAUAAUUGUAAAUA	684 - 702	93.57
6	UUCAAUUAUCCGGUAAGUC	GACUUACCGGAUAAUUGAA	482 - 500	93.47
7	UUAUAGAUAAAGGACCACG	CGUGGUCCUUUAUCUAA	1008 - 1026	93.45
8	UAAUCAUAGAAGGUGACUC	GAGUCACCUUCUAUGAUUA	26 - 44	92.95
9	UAAAGUGUCCUAAAUUGUC	GACAAUUUAGGACACUUUA	1035 - 1053	92.84
10	UAACAUAAAGGCUAACAUC	GAUGUUAGCCUUUAUGUUA	190 - 208	92.24
11	UAGCCUUGAGAUUAAAUG	CAUUUAUAUCUCAAGGCUA	763 - 781	91.72
12	UUAUCAUAACAUAAAGGCU	AGCCUUUAUGUUAUGAUAA	196 - 214	91.22
13	AUUUUCUUAACAUUCCUC	GAGGAUAUGUUAAGAAAUA	630 - 648	91.16
14	AUUACAUCACCAAAGAAGG	CCUUCUUUGGUGAUGUAAU	362 - 380	91.08
15	AUAAUAUGUAGACUUGUC	GACAAGUCUACAUUUUAU	973 - 991	91.03
16	UCUUAUUUACAAAUUGCC	GGCAUAAUUGUAAAUAAGA	686 - 704	90.84
17	UUGUCAUUUAUCAUUUAUAG	CUAUAUAAUGAUAAUGACAA	1021 - 1039	90.26
18	AUUUUGAGUUAAGUGUCC	GGACACUUUAACUCAAAAU	1044 - 1062	90.26
19	UUUUGAGUUAAGUGUCCU	AGGACACUUUAACUCAAAA	1043 - 1061	90.09
20	AUUCUUUUCGUUAUUCAGC	GCUGAUUAACGAAAGGAU	656 - 674	90.05
21	AAUAUGUAGACUUGUCAG	CUGACAAGUCUACAUUUU	971 - 989	89.89
22	AUUUCCGUUAUCAUCGUUC	GAACGAUGUAACGGAAAU	130 - 148	89.53
23	UUAUCAUUUAUAGAUAAAG	CUUUAUCUAUAAAUGAUAA	1015 - 1033	89.47
24	UAUUGUGAAUUAUCAUAAC	GUUAUGAUAAUUCACAAUA	205 - 223	89.45
25	UAGAUUUUUCGACCUUGCU	AGCAAGGUCGAAAAUCUA	448 - 466	89.19
26	UGCGUAUUCUUUACGUGG	CCACGUAAAAGAAUACGCA	937 - 955	88.91
27	AACAUAAGGCUAACAUCG	CGAUGUUAGCCUUUAUGUU	189 - 207	88.91
28	AUUUACAAAUUGCCACGG	CCGUGGCAUAAUUGUAAAUA	682 - 700	88.41
29	UUAGCCUUGAGAUUAAAUA	AUUUAUAUCUCAAGGCUAA	764 - 782	88.38
30	UUAUCCGGUAAGUCUAACA	UGUUAGACUUACCGGAUAA	477 - 495	88.37
31	UAUGUAGACUUGUCAGAAG	CUUCUGACAAGUCUACAU	968 - 986	88.26
32	UAAUAUGUAGACUUGUCA	UGACAAGUCUACAUUUUA	972 - 990	88.24
33	UUUUCUUAACAUUCCUCA	UGAGGAUAUGUUAAGAAAUA	629 - 647	88.21
34	UAAUAUUUAUUGCGGAUGGC	GCCAUCCGCAUAAUAUUA	827 - 845	87.97
35	UUUAUAGAUAAAGGACCAC	GUGGUCCUUUAUCUAAAA	1009 - 1027	87.96
36	UUUCGUUAUUCAGCCAAGA	UCUUGGCUGAUUAACGAAA	651 - 669	87.83
37	UAAGUCUAACAUCAAGGAU	AUCCUUGAUGUUAAGACUUA	469 - 487	87.78
38	UUGGUGCGUAUUCUUUUAC	GUAAAAGAAUACGCACCAA	941 - 959	87.66
39	UAAAUUGUCAUUUAUCAUUU	AAAUGAUAAUGACAAUUUA	1025 - 1043	87.66
40	UCAAUUAUCCGGUAAGUCU	AGACUUACCGGAUAAUUGA	481 - 499	87.59

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
41	UCCAUUUCCGUUAUCAUCG	CGAUGAUAACGGAAAUGGA	133 - 151	87.56
42	UAUAAUCAUAGAAGGUGAC	GUCACCUUCUAUGAUUAUA	28 - 46	87.44
43	UAUAUCAGCCAAGAACAUU	AAUGUUCUUGGCUGAUUAUA	646 - 664	87.17
44	UCGACAUUAUAAAAGCCGG	CCGGCUUUUAUAAUGUCGA	239 - 257	87.15
45	UCUCGACAUUAUAAAAGCC	GGCUUUUAUAAUGUCGAGA	241 - 259	87.11
46	AAGUCUAACAUCAAGGAUG	CAUCCUUGAUGUUAGACUU	468 - 486	87.03
47	UUACACUGCCUCAUUCAAU	AUUGAAUGAGGCAGUGUAA	495 - 513	86.93
48	UAUCCGGUAAGUCUAACAUA	AUGUUAGACUUAACCGGAUA	476 - 494	86.88
49	UCAUUUAUAGAUAAAGGAC	GUCCUUUAUCUAUAAAUGA	1012 - 1030	86.8
50	AAUUAUCAUAACAUAAGG	CCUUUAUGUUAUGAUAAUU	198 - 216	86.78

En el análisis de predicción de la eficacia de siRNA con el fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV, se obtuvieron 250 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011), que presentan un rango de inhibición que oscila entre 70.11 y 94.32 %. Los siRNAs del 51 al 250 se presentan en el anexo I.

Tabla 12. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
1	UAAUUUAUUAGCUAACGUC	GACGUUAGCUAAUAAAUAUA	196 - 214	94.32
2	UUUAUAAAAGCUGGUGAUCC	GGAUCACCAGCUUUUAUAUA	239 - 257	94.06
3	UUUUUAUAGGGACCACAC	GUGUGGUCCCUAUAUAAUA	1003 - 1021	93.63
4	UCAUUUAUCUGGAAAUAUC	GGAUUUUCAGAUAAUUGA	487 - 505	93.5
5	UUUUUUAAUGAGUGUUC	GGAACACUCAUUAAAUAUA	79 - 97	93.31
6	UUCAAUUUAUCUGGAAAUAUC	GAUUUUCAGAUAAUUGAA	488 - 506	93.31
7	AUAUAUUCUUAACUUAUCC	GGAUAAAGUUAAGAAUAUAU	638 - 656	93.12
8	UUUAUGUGUCUUGAGGUUAU	AUACCUCAAGACACAUAUA	775 - 793	92.59
9	UUGAAUUAAAAGAGGUUAUGG	CCAUACCUCUUUAAUUCAA	1034 - 1052	92.14
10	UAUUAUGUAGACUCGUCAG	CUGACGAGUCUACAUAUAUA	968 - 986	91.99
11	AUUUAUCAUAAUUUAUUAGC	GCUAAUAAAUAUGAUAAUA	203 - 221	91.88
12	AUUCUUAACUUAUCCAAGG	CCUUGGAUAAGUUAAGAAU	634 - 652	91.5
13	AUUCUUUUCGUUUAACUGC	GCAGUUAACGAAAGGAUA	662 - 680	91.49
14	UUUUAAUGAGUGUCCGCU	AGCGGAACACUCAUAAAA	76 - 94	91
15	UCAAGUCGAACAAAGACG	CGUCUUUGUUCGACUUUGA	309 - 327	90.36
16	UAUUCUUAACUUAUCCAAG	CUUGGAUAAGUUAAGAAUA	635 - 653	90.3
17	UUAACUGCCAGAAUAUAUAU	AUAUAUUUCUGGCAGUUAUA	651 - 669	90.29
18	UUUUUAUGUAGACUCGUCA	UGACGAGUCUACAUAUAUA	969 - 987	90.13
19	UAAAAUAAAAAAGGUUGU	ACAACCUUUUUUAUUUUA	911 - 929	89.93
20	UUGGUUGGAAUAUUAUUAUG	CAUUAUUUAUCCAACCAA	938 - 956	89.86

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
21	UAUUUUAAUGAGUGUCCG	CGGAACACUCAUUAAAAUA	78 - 96	89.66
22	AAUUUAUUAGCUAACGUCCG	CGACGUUAGCUAAUAAAAUU	195 - 213	89.36
23	AUUUAUUAGUAGACUCGUC	GACGAGUCUACAUAAUAAU	970 - 988	89.14
24	UUCAAGUCGAACAAAGAC	GUCUUUGUUCGACUUUGAA	310 - 328	89.11
25	UAAAAAAGGUUGUGGUUG	CAACCACAACCUUUUUUUA	906 - 924	89.03
26	UAAUCCUUUCGUUUAACU	AGUUAAACGAAAGGAAUUA	664 - 682	88.84
27	AUUUUAUGAGUGUCCGC	GCGGAACACUCAUUAAAAU	77 - 95	88.7
28	UUAUCAAAUUUAUUAGCU	AGCUAAUAAUUUAUGAUAA	202 - 220	88.63
29	AUUUUCUGGAAAAUCCAAC	GUUGGAUUUCCAGAUAAU	484 - 502	88.49
30	UCGACAUUAAAAAGCUGG	CCAGCUUUUUAUAAUGUCGA	245 - 263	88.49
31	UUACCAUUUUGAAUAAAG	CUUUAUUCAAAAUGGUA	1042 - 1060	88.41
32	UAUUUACGAAAUUGCCAC	GUGGCAUAAUUUCGUAAUA	690 - 708	88.08
33	UUAUCUGGAAAAUCCAACA	UGUUGGAUUUCCAGAUAA	483 - 501	87.99
34	UAAUAUUUUGCGGAUGGC	GCCAUCGCAAUAAUUAUUA	824 - 842	87.97
35	UUUAUUAGCUAACGUCGAG	CUCGACGUUAGCUAAUAAA	193 - 211	87.74
36	UGAAUUAAAGAGGUUUGGG	CCCAUACCUCUUAAAUUCA	1033 - 1051	87.68
37	AAAUAAAAAAGGUUGUGG	CCACAACCUUUUUUUUUUU	909 - 927	87.52
38	AAUAUAUUUCUUAACUUAUC	GAUAAGUUAAGAAUUAUU	639 - 657	87.51
39	UUGGAAUAAUUAUGUGGU	ACCACAUAAUUUAUCCAA	934 - 952	87.51
40	UUUGAAUUAAAGAGGUUUG	CAUACCUCUUAAAUUCAA	1035 - 1053	87.5
41	AUUUUUCAGAAACCUCCG	CGGAGGUUUCUGAAUAAU	172 - 190	87.49
42	AAUAUGAGAAAGUUGAGAG	CUCUCAACUUUCUCAUUAU	733 - 751	87.47
43	AAGAACUACAUACCAAAG	CUUUGGUGAUGUAGUUCU	372 - 390	87.39
44	UGUCUUGAGGUUAUAUAG	CUAUAUAUACCUCAAGACA	769 - 787	87.38
45	AAUCCUUUCGUUUAACUG	CAGUUAAACGAAAGGAAU	663 - 681	87.11
46	UUUUGAAUUAAGAGGUUAU	AUACCUCUUAAAUUCAA	1036 - 1054	87.1
47	UAGUAUAUCAUAGAAGGU	ACCUUCUAUGAUUAUACUA	40 - 58	87.06
48	UUACACUGCCUCAUUCAAU	AUUGAAUGAGGCAGUGUAA	501 - 519	86.93
49	AUAAAAUAAAAAAGGUUG	CAACCUUUUUUUAUUUUUAU	912 - 930	86.82
50	UAAUCAUAGAAGGUGGUUC	GAACCACCUUCAUGAUUA	35 - 53	86.75

7.3.3 Integración de la base de datos del género begomovirus

Para la integración de la base de datos se utilizaron como referencia 1012 secuencias reconocidas por el ICTV en su actualización de octubre de 2020, que corresponden a 445 especies del género begomovirus, con los números de acceso se bajaron las secuencias de NCBI. Además se incorporaron a la base de datos, las secuencias con números de acceso GenBank EF523478, KX427166, KX440611, MF187211, MN625831, que corresponden a begomovirus

reportados en la región. Los genomas de begomovirus que integran la base de datos se presenta en el anexo D.

7.3.4 siRNAs derivados de ToChLPV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta

El análisis blastn local en el software Blast2Go, cuyo objetivo fue la hibridación de los siRNAs con los diferentes genomas de begomovirus de la base de datos, permitió determinar la mayor eficiencia de los siRNAs obtenidos *in silico* de los begomovirus PepGMV, ToChLPV, TYLCV, CuLCrV y SLCuV, ante una infección sencilla y mixta.

Del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV denominado CIRT se obtuvieron 238 siRNAs (Tabla 8) candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011), que presentan un rango de inhibición de su RNAm diana entre el 70.26 y el 94.87 %. El análisis blastn local de los 238 siRNAs con la base de datos de begomovirus mostró que se produjeron 904 alineamientos significativos (Fig. 14), donde los siRNAs hibridaron con los genomas de la bases de datos con una identidad por pares de bases del 94.7-100 %. De estos, 233 fueron con la secuencia AY339619 del tomate chino La Paz virus, es decir con la secuencia homóloga, que corresponden al 25.7 % de los alineamientos significativos, 132 con la secuencia JN676150 del tomate chino La Paz virus –SLP, correspondientes al 14.6 % de los alineamientos significativos, 50 con la secuencia JN680352 del tomate severe leaf curl virus que corresponden al 5.5 %. Se observaron 34 alineamientos significativos con las secuencias NC_005843 y AY339618 que corresponden a tomate chino La Paz virus y tomate chino La Paz geminivirus, respectivamente. En ambos casos representan el 3.8 %. Seguidas de la secuencia AJ508784 del tomate severe leaf curl virus, con la que se observaron 22 alineamientos significativos que representan el 2.4 %. Con las secuencias NC_014510.2, GQ334472.2 que corresponden a tomate leaf deformation virus, y AY044135, NC_004099 de Macroptilium yellow mosaic Florida virus se observaron 11 alineamientos por pares, que representan cada una el 1.2 %. El resto de los alineamientos significativos oscilaron entre uno y 10, que presentan 0.1 % y 1.1 %, respectivamente.

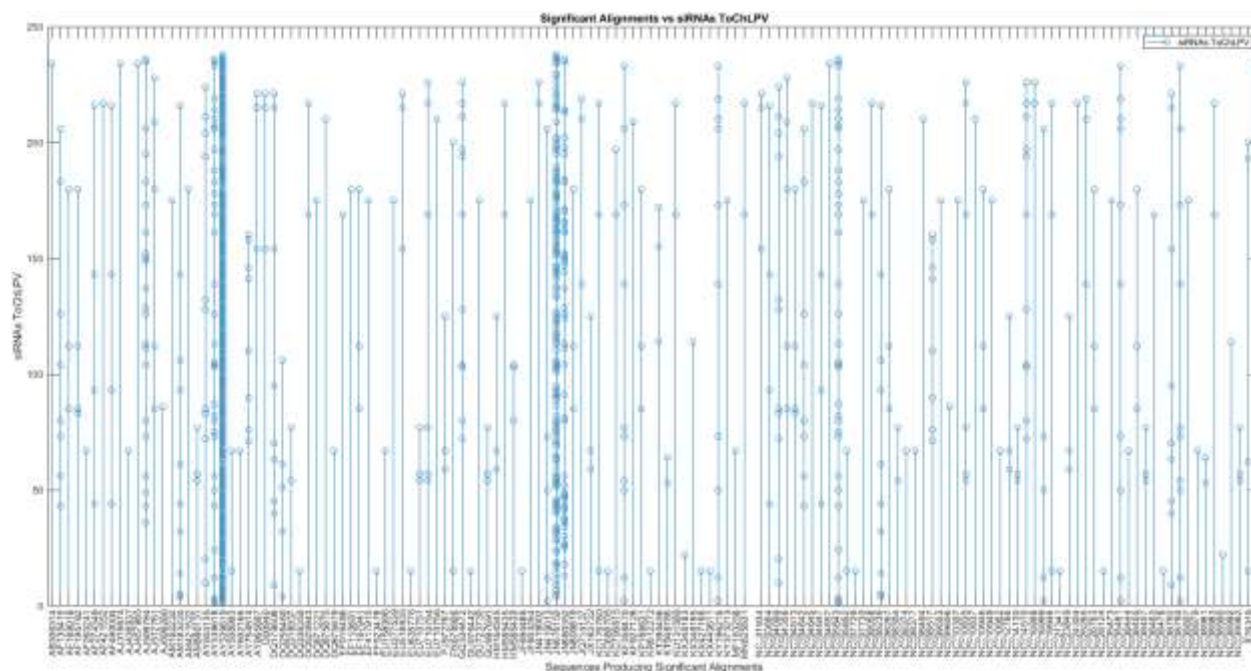


Figura 14. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV denominado CIRT flanqueando las secuencias asociadas al género *Begomovirus*.

Los siRNAs descritos a continuación hibridaron con 94.7-100 % de identidad por pares de bases, destacando los siRNAs 15, 67, 169 y 217 que mostraron identidad con la mayor cantidad de secuencias de genomas diferentes, 19 cada uno (Fig. 15). Seguidos de los siRNAs 85, 175 y 180 donde cada uno mostró identidad con 15 secuencias diferentes, mientras que el siRNA 54 fue similar a 14 secuencias diferentes, seguidos de los siRNAs 77 y 112, que mostraron identidad con 13 secuencias diferentes. Los siRNAs 73, 206 y 210 cada uno mostraron identidad con 12 secuencias diferentes. Los siguientes fueron los siRNAs 80 y 104, donde cada uno mostró identidad con 13 secuencias diferentes. Por otro lado, los siRNAs dos, 12, 50, 57 y 139 cada uno mostraron identidad con nueve secuencias diferentes. Seguidos de los siRNAs 43, 44, 56, 93, 126, 143, 154, 173, 183, 215, 216, 221 y 226 donde cada uno mostró identidad con ocho secuencias de genomas diferentes. Los siRNAs 103, 197, 233 y 234 mostraron identidad con siete secuencias cada uno. Seguidos de los siRNAs 59, 113, 125, 161, 236 y 235, los que cada uno mostró una identidad con seis secuencias diferentes. Los siRNAs cuatro, 32, 61, 72, 83, 106, 114, 128, 194, 209, 211 y 214, mostraron identidad con cinco secuencias diferentes. Por otro lado, los siRNAs cinco, nueve, 14, 24, 40, 45, 53, 63, 64, 70, 71, 75, 76, 82, 86, 90, 95, 105, 106, 110, 137, 141, 146, 152, 158, 160, 178, 188 y 195 mostraron una identidad con cuatro

secuencias cada uno. Los siRNAs uno, tres, 10, 18, 20, 22, 34, 36, 41, 42, 46, 49, 51, 52, 87, 91, 111, 124, 129, 132, 144, 147, 149, 150, 151, 155, 162, 165, 166, 171, 172, 184, 198, 203, 204, 207, 224 y 228 mostraron identidad con tres secuencias. Mientras que los siRNAs siete, 11, 13, 17, 19, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 33, 37, 38, 47, 48, 55, 58, 65, 69, 74, 78, 79, 81, 89, 92, 101, 102, 116, 117, 118, 120, 122, 123, 127, 133, 134, 138, 145, 153, 157, 163, 167, 168, 171, 176, 177, 179, 182, 185, 187, 190, 199, 200, 201, 213, 220, 223, 229, 230, 237 y 238, mostraron identidad con dos secuencias. Y los siRNAs seis, ocho, 16, 21, 35, 39, 60, 62, 66, 68, 84, 88, 94, 96, 97, 98, 99, 100, 107, 108, 109, 115, 119, 121, 130, 131, 135, 136, 140, 142, 148, 156, 159, 164, 174, 181, 186, 189, 191, 192, 193, 196, 203, 205, 208, 212, 218, 222, 225, 227, 231 y 232, mostraron identidad únicamente con una secuencia. El siRNA 181 no mostró identidad con alguna secuencia. Mientras que, los siRNAs que mostraron identidad por pares con dos secuencias fueron 65, seguidos de los que mostraron identidad por pares con una secuencia, estos fueron 52 siRNAs, los siRNAs que mostraron identidad por pares con tres secuencias fueron 38, mientras que, los siRNAs que mostraron identidad por pares con cuatro secuencias fueron 29. Finalmente, los siRNAs que mostraron identidad por pares con ocho secuencias fueron 13, y que los que mostraron identidad con cinco secuencias fueron 12. El 99.5 % de los siRNAs derivados de CIRT, hibridaron con una secuencia objetivo de la base de datos.

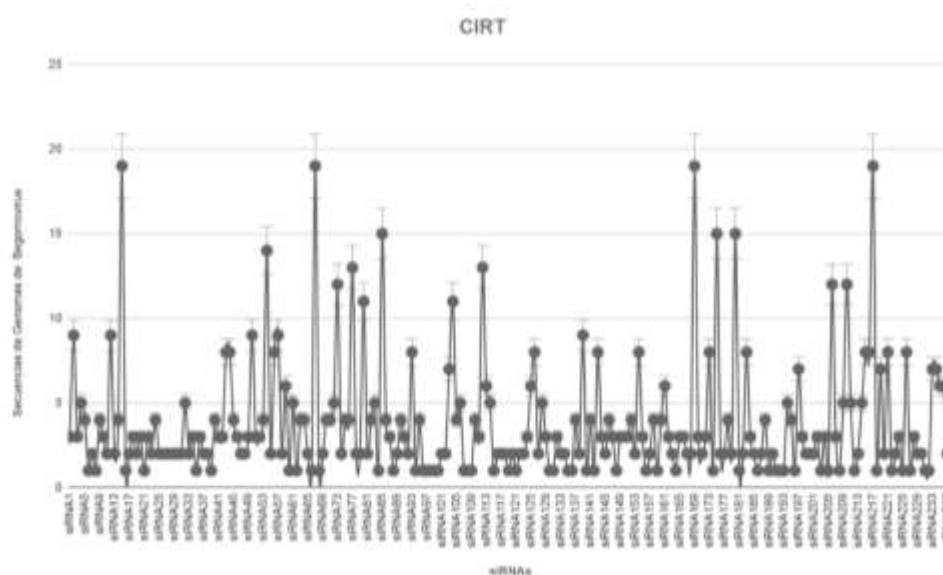


Figura 15. siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV denominado CIRT flanqueando secuencias de genomas de begomovirus.

En la gráfica de distribución paralela se observan los siRNAs que corresponden al fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV denominado CIRT (Fig. 16), la cantidad de genomas que cada siRNAs reconoció, los genomas reconocidos de la base de datos, la cantidad de nucleótidos con los hubo reconocimiento de identidad por pares; estos fueron de 18 o 19 en cada caso y finalmente, considerando que, si cada siRNA fue de 19 nucleótidos, el porcentaje de eficiencia de reconocimiento oscila entre 94.7 y 100 %.

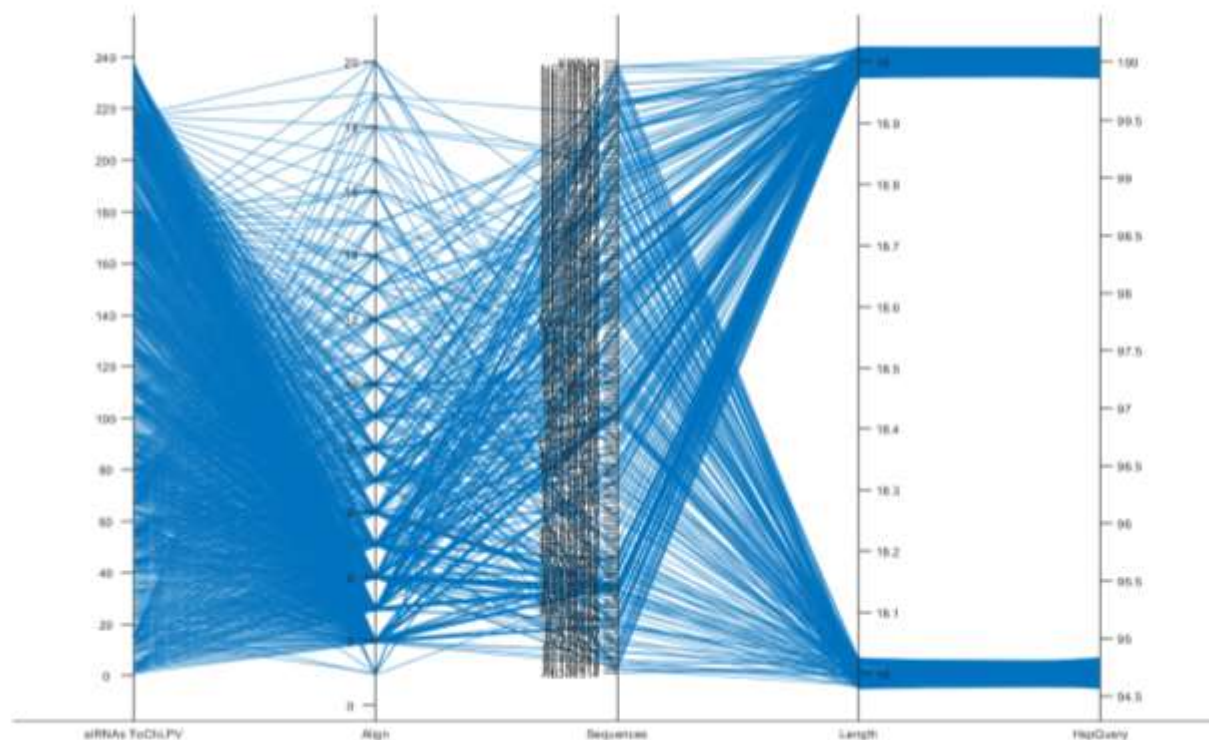


Figura 16. Distribución paralela de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV. Se observan los siRNAs de ToChLPV, la cantidad alineamientos en cada caso, los genomas que cada siRNAs reconoció, la longitud o cantidad de nucleótidos con los hubo reconocimiento de identidad por pares; estos fueron de 18 o 19 en cada caso, finalmente HspQuery corresponde porcentaje de eficiencia de reconocimiento, que oscila entre 94.7 y 100 %.

Se observó que de los 238 siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV denominado CIRT, 237 hibridaron con un total de 142 secuencias de la base de datos de los genomas del género begomovirus que corresponden a 70 especies.

7.3.5 siRNAs derivados de PepGMV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta

En el análisis de predicción de la eficacia de siRNAs con el fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV, se obtuvieron 209 siRNAs (Tabla 9) candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011), que presentan un rango de inhibición que oscila entre 70.07 y 94.53 %. El análisis Blastn local de los 209 siRNAs con la base de datos del género *Begomovirus* mostró que hubo 782 alineamientos significativos (Fig. 17), con una identidad por pares de bases del 94.7-100 %. La mayor cantidad de alineamientos fueron 204 fueron con la secuencia NC_004101 de pepper golden mosaic virus que representan el 25.8 %; con la secuencia homóloga. Seguidos de 203 alineamientos significativos con la secuencia U57457 de pepper golden mosaic virus-Tamaulipas que representan 25.7 %. La siguiente mayor cantidad de alineamientos significativos fueron con las secuencias JQ743486 y AF149227 con 57 y 50 alineamientos, que representan 7.2 y 6.4 % respectivamente, secuencias que corresponden también a pepper golden mosaic virus. Los siguientes alineamientos significativos fueron 18 con la secuencia U65529.2 de cabbage leaf curl virus, que representan 2.3 %, seguidos de 16 y 14 alineamientos con KC430935 y NC_038438 de Abutilon golden mosaic virus que representa 2 y 1.8 %, seguidos de 13 alineamientos con las secuencias NC_003866 de cabbage leaf curl virus, y NC_038802, DQ406672 ambas de Rhynchosia golden mosaic virus las que individualmente representan 1.7 %. Con la secuencia MN625831 de cucurbit leaf crumple virus se observaron 11 alineamientos que representan 1.4%, con otras secuencias de este virus como NC_002984 y af224760.2 se observaron 10 alineamientos que se representan cada una 1.3 %. Mientras que con las secuencias KX857725, NC_043524 ambas del bean leaf crumple virus y NC_038462 del Sidastrum golden leaf curl virus se observaron seis alineamientos significativos que representan individualmente el 0.8%. Con las secuencias NC_004614 de tomato leaf curl virus, AF188481 del tomato leaf curl Bangladesh virus y HM357458.2 del Sidastrum golden leaf curl virus se observaron cinco alineamientos significativos por lo que cada una representa el 0.6 %. El resto de los alineamientos fueron con entre uno y cuatro secuencias, representado del 0.1 al 0.5 %.

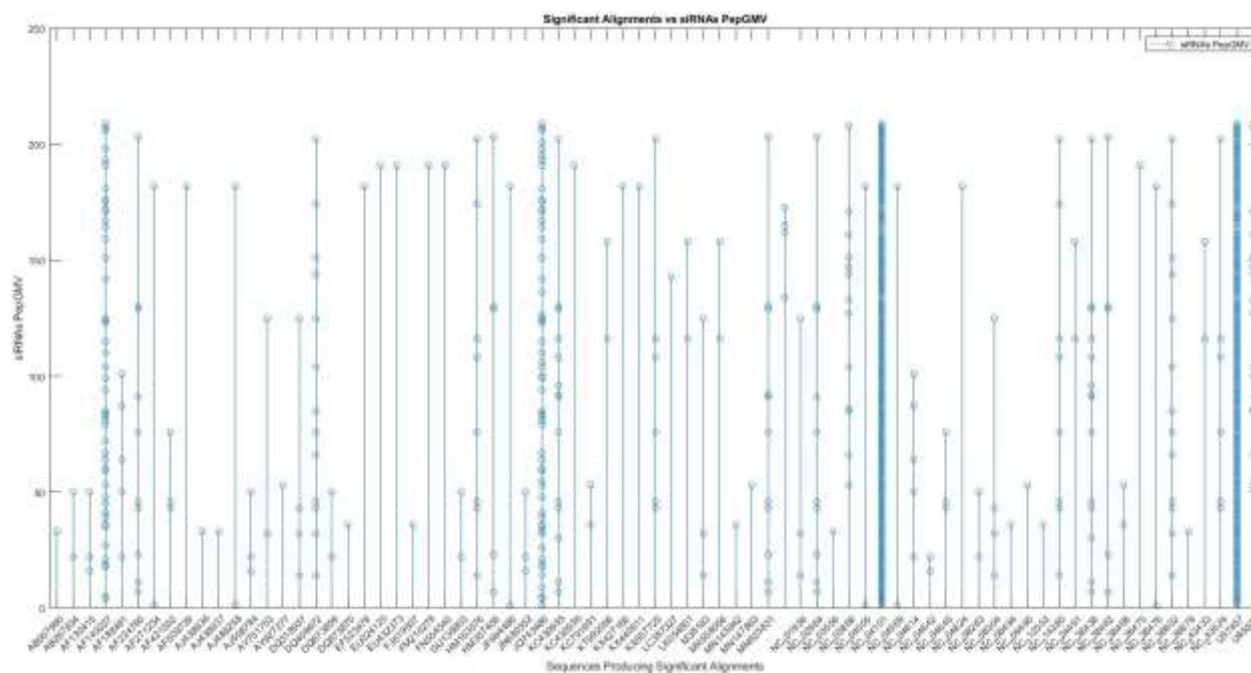


Figura 17. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV denominado CIRP, flanqueando las secuencias asociadas al género *Begomovirus*.

Los siRNAs descritos a continuación hibridaron con 94.7-100 % de identidad por pares de bases (Fig. 18), destacando el siRNA 43 que mostró identidad con la mayor cantidad de secuencias de genomas diferentes, 17, seguido de los siRNAs 46 y 76 que cada uno mostró identidad con 15 secuencias de genomas diferentes, a estos siguieron los siRNAs 116 y 182 que mostraron identidad con 14 secuencias cada uno. Por su parte los siRNAs 22, 50 y 125 mostraron identidad con 12 secuencias. Los siRNAs 14, 36, 53 y 191 mostraron identidad con 11 secuencias de genomas diferentes. Mientras que los siRNAs 32, 129 y 202, mostraron identidad con 10 secuencias de genomas diferentes. Los siRNAs uno, siete, 104, 108, 130 y 151 mostraron identidad con nueve secuencias de genomas diferentes. Por otro lado, los siRNAs 33, 85 y 158 151 mostraron identidad con ocho secuencias de genomas diferente. Los siRNAs 11, 23, 91, 144, 171, 174 y 203, mostraron identidad con siete secuencias de genomas diferentes. Los siRNAs 16, 64 y 66 mostraron identidad con seis secuencias de genomas diferentes, mientras que siRNAs como 92, 110, 147 y 167 mostraron identidad con cinco secuencias de genomas diferentes. Los siRNAs cuatro, cinco, 18, 19, 21, 30, 35, 39, 41, 48, 59, 60, 67, 79, 81, 83, 84, 86, 87, 94, 96, 99, 101, 115, 123, 124, 127, 133, 142, 159, 161, 164, 172, 175, 176, 181, 193, 198, 206, 207, 208, 209, mostraron identidad con cuatro secuencias diferentes. Mientras que los siRNAs nueve, 26,

27, 45, 55, 72, 100, 102, 106, 126, 136, 143, 195 y 201, mostraron identidad con tres secuencias de genomas diferentes. Por otro lado, los siRNAs dos, tres, seis, ocho, 10, 12, 13, 15, 17, 20, 24, 25, 28, 29, 31, 34, 37, 38, 40, 42, 44, 47, 49, 51, 52, 54, 56, 57, 58, 61, 62, 63, 65, 68, 69, 70, 71, 73, 74, 75, 77, 78, 80, 82, 88, 89, 90, 93, 95, 95, 97, 98, 103, 105, 107, 109, 111, 112, 113, 114, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 128, 131, 132, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 145, 146, 148, 149, 150, 152, 153, 155, 156, 157, 160, 163, 166, 168, 169, 170, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 192, 194, 196, 197, 199, 200, 204, 205, mostraron identidad con dos secuencias de genomas diferentes. Y únicamente los siRNAs 162, 165 y 173, mostraron identidad con una secuencia. Fueron 111 los siRNAs que mostraron identidad con dos secuencias diferentes, 44 los siRNAs que mostraron identidad con cuatro secuencias diferentes y 14 los siRNAs que mostraron identidad con tres secuencias de genomas diferentes. En contraparte los siRNAs 134, 162, 165 y 173, no mostraron identidad con ninguna de las secuencias. Por lo tanto, el 98 % de los siRNAs derivados de CIRP, hibridaron con al menos una secuencia objetivo de la base de datos.

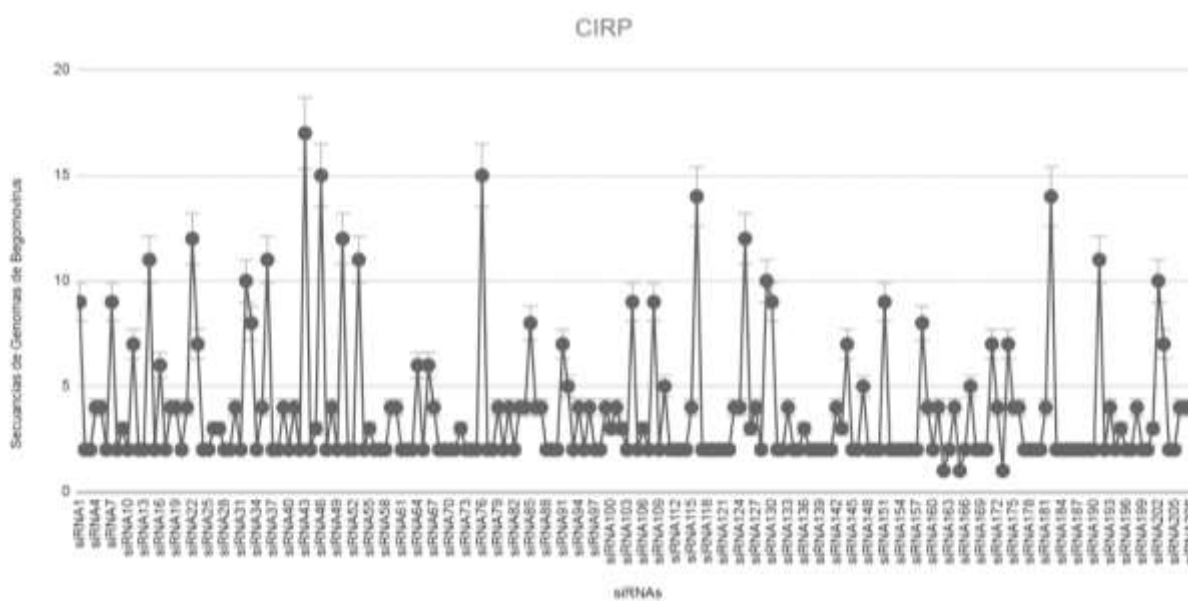


Figura 18. siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV denominado CIRP flanqueando secuencias de genomas de begomovirus.

De los 209 siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV denominado CIRP, se observó que 205 hibridaron con un total de 73 secuencias que corresponden a 32 especies. Estas secuencias se alinearon utilizando el método ClustalW y se realizó el análisis evolutivo por el método de Máxima verosimilitud (Fig. 19). La secuencia con número de acceso GenBank 456789 del *Beet curly top Iran virus*, que corresponde al género *Becurtovirus* de la familia *Geminiviridae* se utilizó como raíz del árbol.

La historia evolutiva se dedujo mediante el método de Máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Se presenta el dendograma con la mayor probabilidad logarítmica (-68688,18). Junto a las ramas se muestra el porcentaje de dendogramas en los que los taxones asociados se agrupan. Los dendogramas iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron de manera automática utilizando dos algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias entre pares determinada mediante el enfoque de Máxima verosimilitud Compuesta (MCL) y se seleccionaron a continuación la topología con un valor de probabilidad logarítmica superior. El dendograma se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en número de sustituciones por sitio. El estudio incluyó 74 secuencias nucleotídicas. Las posiciones de codones incluidas fueron 1ª + 2ª + 3ª + no codificadas. En el conjunto final de datos había un total de 3080 posiciones. Estos análisis se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Los resultados del análisis evolutivo se observó que las secuencias se concentraron en dos grandes grupos; en el primero se puede ver la secuencia de la que se obtuvo el fragmento para la dsRNA, en un clúster con otras secuencias de la misma especie a las que flanquearon más de 50 siRNAs, estas se marcaron en color verde. Por lo tanto, son una representación de las secuencias homólogas. Posterior a ellas, pero dentro de ese gran grupo se concentran las secuencias a las que se unieron más de 10 siRNAs. Mientras que en el segundo gran grupo se observan las secuencias que fueron flanqueadas por menos de 10 siRNAs. En color azul se observan las secuencias aisladas por el grupo de trabajo de Fitopatología de CIBNOR. Los datos aquí obtenidos indican una clara respuesta tanto ante una posible infección sencilla, como en una infección mixta, al observarse la posibilidad de apareamiento de los siRNAs, con secuencias de begomovirus de diferentes especies.

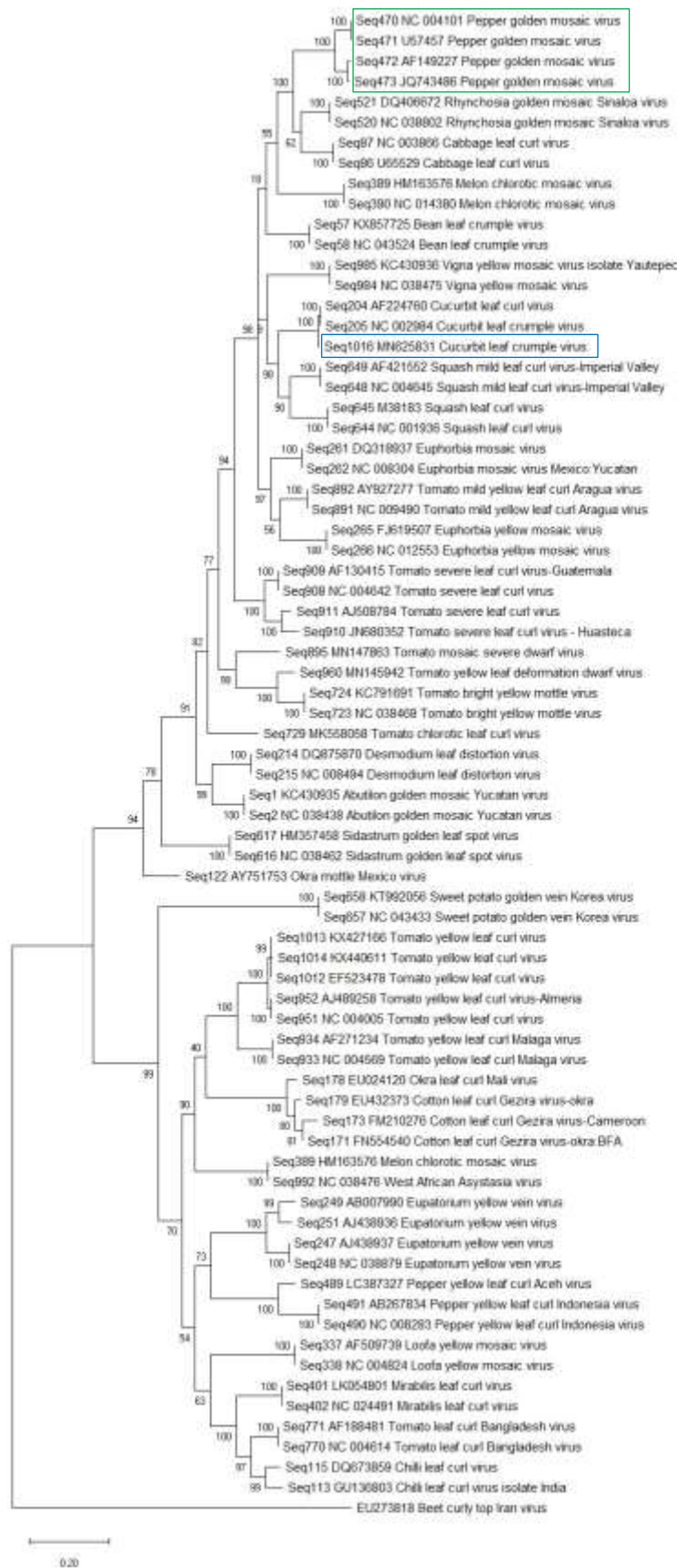


Figura 19. Análisis evolutivo por el método de máxima verosimilitud de 73 secuencias del género *Begomovirus* flanqueadas por siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV denominado CIRP. Se observan dos grandes grupos, en el primero se observa la secuencia NC_004101 del PepGMV de la se obtuvo el fragmento de la dsRNA y las secuencias a las que se agruparon la mayor cantidad de siRNAs. En color verde se observan las secuencias flanqueadas por más de 50 siRNAs. En el segundo se agruparon las secuencias a las que se alinearon menos de 10 siRNAs. En color azul se observan las secuencias aisladas por el grupo de trabajo de Fitopatología de CIBNOR.

7.3.6 siRNAs derivados de TYLCV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta

Se obtuvieron 363 siRNAs (Tabla 10) candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011), del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV denominado CTYLCV, que presentan un rango de inhibición entre el 70.26 y el 94.87 %. El análisis Blastn local de los 363 siRNAs con la base de datos de begomovirus mostró que se produjeron 4384 alineamientos significativos (Fig. 20), con un 94.7-100 % de identidad por pares de bases. De estos, 1874 fueron con la secuencia NC_004005.1 del tomato yellow leaf curl virus, que corresponden al 5.4 %, seguidos de 1574 con la secuencia AJ489258.1 de tomato yellow leaf curl virus-Almería, que corresponde al 4.5%. Con las secuencias NC_011024.1 y EU734831, se observaron 1429 y 1261, que corresponden al 4.1 y 3.6 %, respectivamente, secuencias que corresponden a begomovirus asociados con tomato yellow leaf curl disease ambas reportados en Italia. Con la secuencia EF523478.1 mostró 1078 alineamientos significativos que corresponden al 3.1 %, con la secuencia NC_005855.1 mostró 933 alineamientos significativos que representan el 2.7 %. Seguida de las secuencias NC_038963, KM926624 que corresponden al tomato latent virus y AY044137.1 del tomato leaf curl Sudan virus con las que mostraron 885, 872 y 862 alineamientos significativos, que individualmente representan el 2.5 %. Mientras que con la secuencia KX427166.1 se observaron 714 alineamientos significativos, esto es con la secuencia homóloga; en este caso la secuencia homóloga mostró menos alineamientos significativos que otras secuencias. Por otro lado, con las secuencias DQ358913, NC_027215.1 y LM651400 del tomato yellow leaf curl Mali virus se observaron 695, 694 y 631 alineamientos significativos, respectivamente, que representan 2 % individualmente las primeras dos, y 1.8 %, la tercera. Otra secuencia de este virus fue la AY502934.1 con la que se observaron 581 alineamientos que representan el 1.7 %. Con la secuencia NC_004569.1 del tomato yellow leaf curl Malaga virus se observaron 629

alineamientos significativos que representan el 1.8 %. Otra secuencia de este virus fue la AF271234.1 con la que se observaron 562 alineamientos significativos que representan el 1.6 %. Mientras que con las secuencias MF402918.1 y NC_043531.1, de *Datura leaf curl virus-Sudan*, se observaron 545 y 513 alineamientos significativos que representan el 1.6 y 1.5 %, respectivamente. Con la secuencia X76319.1 de *tomato yellow leaf curl virus-mild* se observaron 525 alineamientos significativos que representan el 1.5 %. Con la secuencia EU635776.1 del *tomato yellow leaf curl virus* mostró 464 alineamientos significativos que representan el 1.3 %. El resto de los alineamientos osciló entre 388 que representan 1.1 % y 20, que representan el 0.1 %. El 100 % de los siRNAs derivados de CTYLCV, hibridaron con una secuencia objetivo de la base de datos.

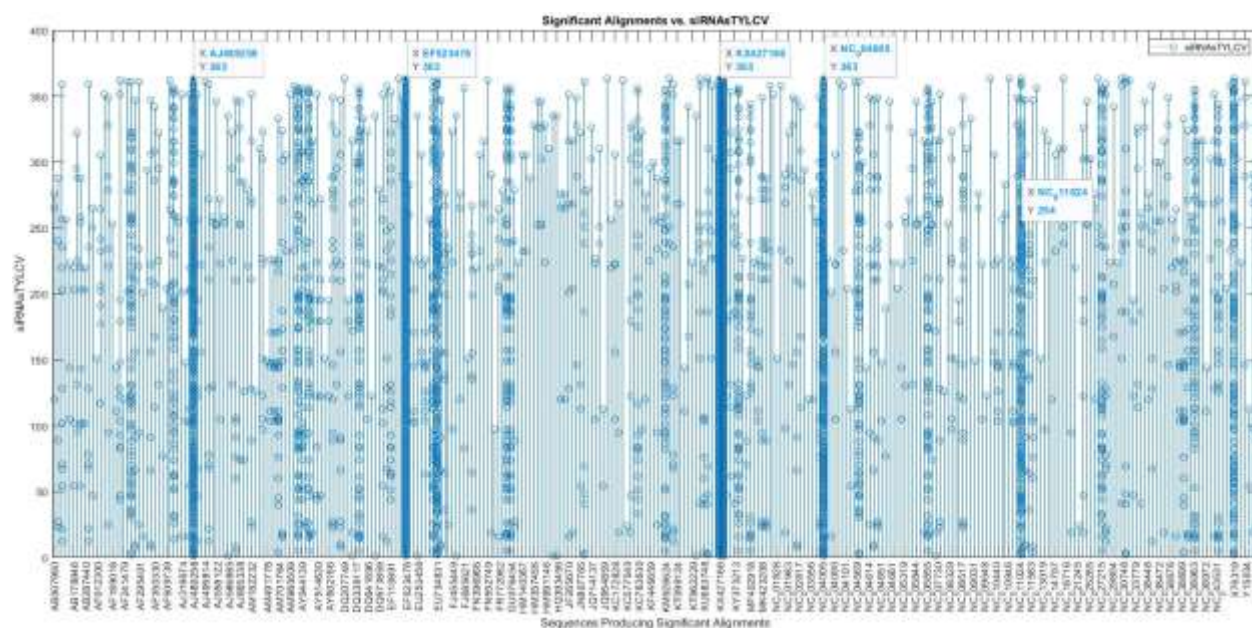


Figura 20. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV denominado CTYLCV flanqueando las secuencias asociadas al género *Begomovirus*.

Los siRNAs descritos a continuación hibridaron con un 94.7-100 % de identidad por pares de bases (Fig. 21), cabe destacar que hubo 79 siRNAs que mostraron identidad con la mayor cantidad de secuencias de genomas diferentes, 20 cada uno, estos fueron los siRNAs 16, 19, 23, 25, 26, 27, 44, 47, 51, 54, 61, 63, 74, 83, 84, 89, 93, 95, 97, 104, 105, 111, 114, 118, 120, 122, 123, 126, 128, 131, 144, 148, 149, 151, 179, 183, 188, 194, 195, 196, 198, 201, 211, 220, 221, 223, 224, 234, 238, 251, 253, 256, 265, 268, 272, 276, 279, 285, 288, 289, 295, 302, 307, 315,

316, 322, 323, 325, 326, 328, 333, 334, 340, 349, 351, 353, 356, 361 y 363. Seguidos de 17 siRNAs que mostraron identidad con 19 secuencias de genomas diferentes, estos fueron los siRNAs cinco, 15, 17, 18, 129, 132, 157, 173, 187, 197, 239, 252, 271, 301, 310, 324 y 346. Los siRNAs que mostraron identidad por pares de bases con 18 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 53, 225, 254, 258 y 341. Mientras que los siRNAs que mostraron identidad con 17 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 145, 156, 171, 213, 226, 240, 304 y 358. Los siRNAs que mostraron identidad por pares de bases con 16 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 102, 113, 203, 233 y 278. Seguidos de los siRNAs que mostraron alineamientos con 15 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 12, 41, 67, 125, 186, 222, 227, 255, 261, 286, 3000, 306 y 308. Los siRNAs que mostraron identidad con 14 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs uno, cuatro, ocho, 33, 76, 77, 91, 103, 106, 175, 189, 201, 244, 298, 317, 344 y 347. Mientras que los siRNAs que mostraron identidad por pares de bases con 13 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs dos, tres, 48, 70, 81, 88, 116, 147, 153, 168, 200, 204, 207, 212, 232, 236, 260, 283, 305, 319 y 342. Los siRNAs que mostraron identidad con 12 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 10, 22, 56, 60, 66, 71, 119, 130, 190, 235, 247, 257, 335 y 359. Los siRNAs que mostraron identidad por pares de bases con 11 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 14, 31, 32, 69, 78, 94, 100, 108, 143, 180, 202, 206, 215, 241, 264, 293, 299, 312, 327, y 354. Mientras que los siRNAs que mostraron identidad con 10 secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 35, 36, 40, 45, 46, 58, 64, 124, 135, 138, 146, 155, 158, 174, 181, 182, 199, 217, 218, 229, 231, 237, 245, 248, 249, 267, 274, 297, 309, 336 y 352. Los siRNAs que mostraron identidad con nueve secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 24, 65, 82, 112, 121, 165, 209, 287, 294 y 355. Por otro lado, los siRNAs que mostraron identidad con ocho secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 75, 87, 96, 101, 117, 134, 141, 176, 177, 191, 230, 250, 259, 284, 348 y 362. Los siRNAs que mostraron identidad con siete secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs seis, siete, 30, 34, 42, 43, 50, 52, 72, 73, 79, 80, 86, 92, 110, 142, 154, 161, 167, 169, 172, 184, 205, 214, 228, 243, 246, 262, 267, 273, 277, 280, 282, 291, 313, 331, 350. Los siRNAs que mostraron identidad con seis secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 29, 57, 62, 68, 107, 109, 170, 193, 275, 338 y 360. Los siRNAs que mostraron identidad con cinco secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs 13, 37, 38, 39, 59, 85, 136, 140, 150, 152,

159, 185, 192, 216, 219, 266, 270, 292, 314, 318, 321, 339 y 357. El siRNA 290 fue el único que mostró identidad con cuatro secuencias de genomas diferentes. Mientras que 32 siRNAs mostraron identidad con tres secuencias de genomas diferentes, fueron los siRNAs nueve, 11, 20, 21, 28, 49, 55, 90, 98, 99, 133, 137, 139, 160, 162, 163, 164, 166, 178, 208, 242, 281, 296, 303, 311, 320, 329, 330, 332, 337, 343 y 345. Y únicamente el siRNA 269 mostró identidad con dos secuencias de genomas diferentes. Todos los siRNAs mostraron identidad con las secuencias de los genomas de la base de datos, fueron 79 los siRNAs que mostraron identidad con la mayor cantidad de genomas, 20 y solo uno mostró identidad al menos con dos secuencias.

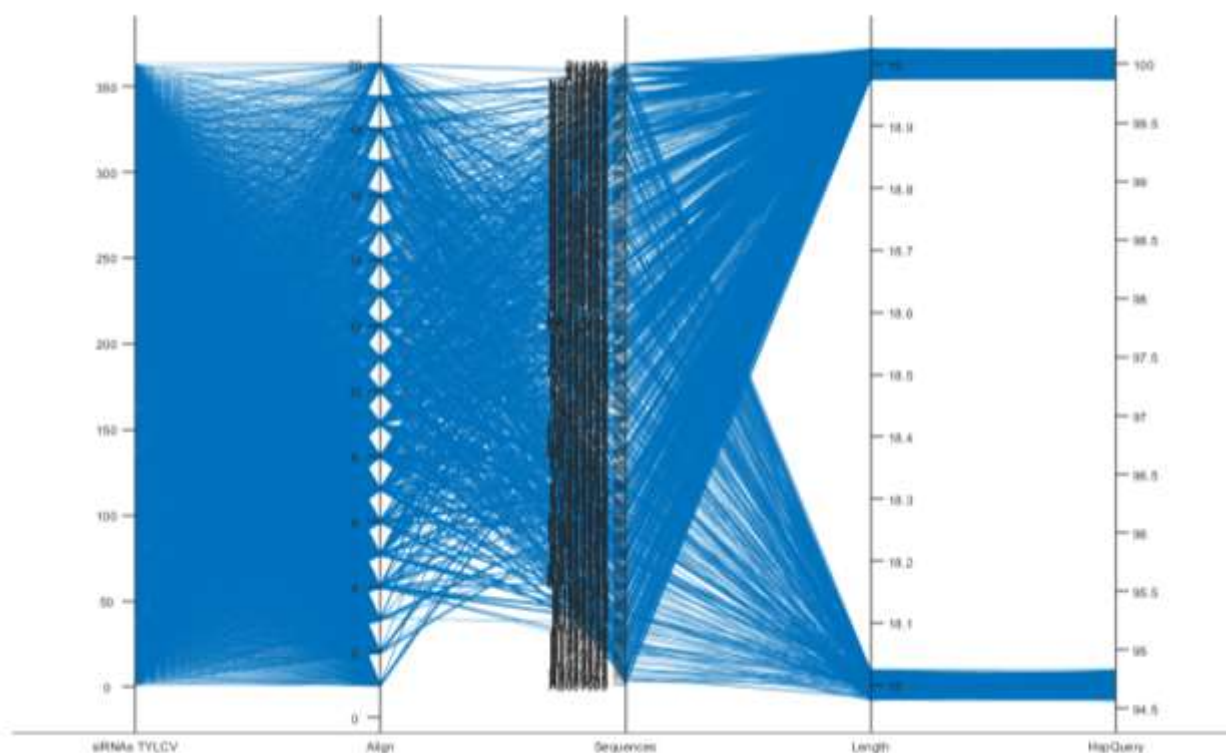


Figura 21. Distribución paralela de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV. Se observan los siRNAs de TYLCVV, la cantidad alineamientos en cada caso, los genomas que cada siRNAs reconoció, la longitud o cantidad de nucleótidos con los hubo reconocimiento de identidad por pares; estos fueron de 18 o 19 en cada caso, finalmente HspQuery corresponde porcentaje de eficiencia de reconocimiento, que oscila entre 94.7 y 100 %.

Se observó que los 363 siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV denominado CTYLCV, hibridaron con un total de 314 secuencias que corresponden a 150 especies.

7.3.7 siRNAs derivados de CuLCrV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta

Se obtuvieron 225 siRNAs (Tabla 11) candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011) del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV, que presentan un rango de inhibición que oscila entre 70.48 y 94.82 %. El análisis Blastn local de los 225 siRNAs con la base de datos de begomovirus mostró que se produjeron 1247 alineamientos significativos (Fig. 22), con 94.7-100 % de identidad por pares de bases. De estos, 222 fueron con la secuencia MN625831 del cucurbit leaf crumple virus que corresponden al 17.8 %, es decir con la secuencia homóloga, 173 y 168, con las secuencias NC_002984 y AF224760 que corresponde a 13.8 y 13.4 %, respectivamente, ambas de cucurbit leaf crumple virus. Los siguientes alineamientos significativos fueron 27 con las secuencias AF421552 y NC_004645 ambas del squash mild leaf curl virus Imperial Valley, cada una representa el 2.2 %. Seguidos de 26 y 25 alineamientos significativos con la secuencia NC_043526 y KY617094 del Jacquemontia yellow vein virus, que representan el 2.1 y 2 %, respectivamente. Con las secuencias NC_008304 y DQ318937 de Euphorbia mosaic virus se observaron 21 y 18 alineamientos significativos que representan el 1.7 y 1.4 %, respectivamente. Con la secuencia HM163576 del melon chlorotic mosaic virus se observaron 17 alineamientos significativos que representan el 1.4 %. Con las secuencias NC_004642, JN680352, AJ508784 y AF130415 del tomato severe leaf curl virus se observaron 15 alineamientos significativos que representan el 1.2 %. Con la secuencia AY927277 y NC_009490 del tomato mild yellow leaf curl Aragua virus, se observaron 13 alineamientos significativos, mientras que con las secuencias EU710754 del tomato common mosaic virus, NC_020257 y JN381819 del tomato rugose yellow leaf curl virus y M38183, NC_001936 del squash leaf curl virus se observaron 12 alineamientos significativos donde representan cada una el 1 %. Con la secuencia AF325497 del melon chlorotic leaf curl virus se observaron 10 alineamientos significativos que representan el 0.8 %. Se observaron nueve alineamientos significativos con la secuencia U57457 del pepper golden mosaic virus, que representan el 0.9 %. Mientras que con la secuencia MF187211 del squash leaf curl virus se observaron nueve alineamientos significativos que representan el 0.7%. Seguidos de ocho y siete alineamientos significativos que

se observaron con la secuencia MK558058 y NC003865, respectivamente, del tomato chlorotic leaf curl virus que representan cada una el 0.6 %. Se observaron seis alineamientos significativos con las secuencias NC_039082 del Euphorbia mosaic virus-Peru, KC791691 del tomato bright yellow mottle virus, NC_038462 y NC_031451 del Sidastrum golden leaf spot virus y Wissadula yellow mosaic virus donde cada una representan el 0.5 %. Se observaron alineamientos significativos de cinco a uno, que representan de 0.4 a 0.1 %, respectivamente. El 98.6 % de los siRNAs derivados de CCuLCrV, hibridaron con una secuencia objetivo de la base de datos.

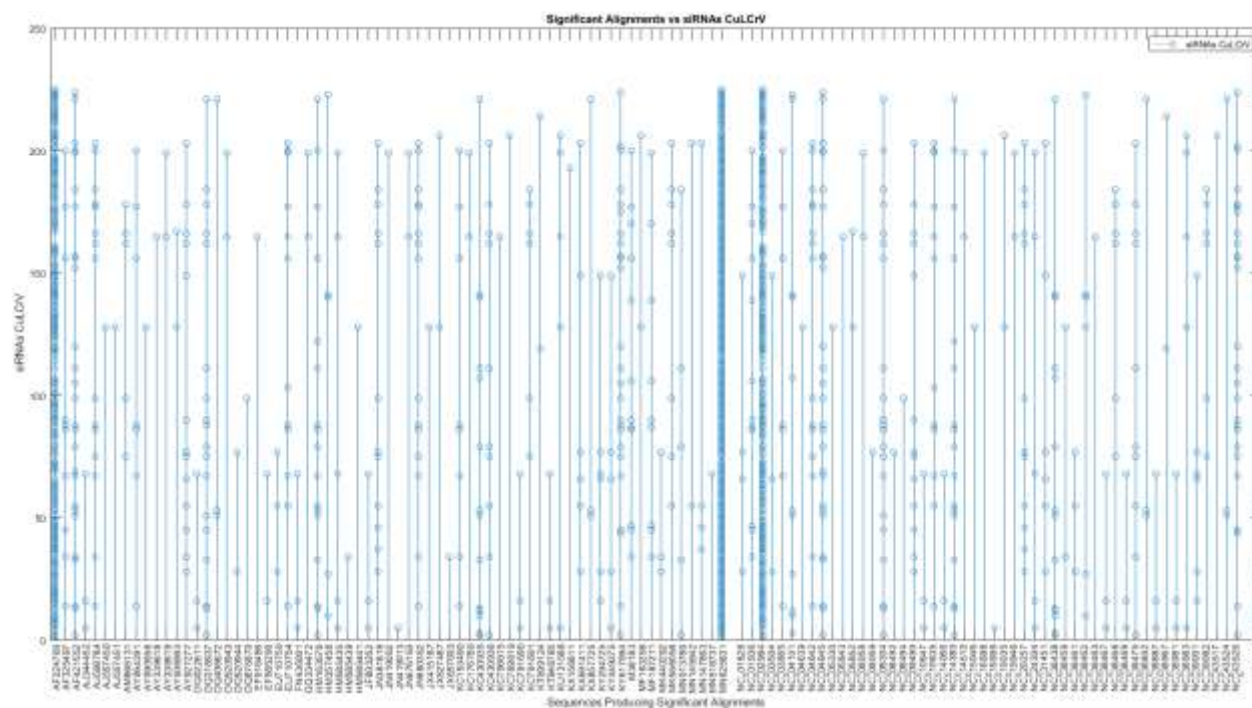


Figura 22. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV denominado CCuLCrV flanqueando las secuencias asociadas al género *Begomovirus*.

Los siRNAs descritos a continuación se alinearon con 94.7-100 % de identidad por pares de bases (Fig. 23), cabe destacar que hubo 24 siRNAs que mostraron identidad con la mayor cantidad de secuencias de genomas diferentes, 20 cada uno, estos fueron los siRNAs cinco, 14, 16, 28, 34, 55, 67, 68, 75, 77, 86, 88, 99, 128, 156, 162, 165, 166, 177, 178, 184, 199, 200 y 203. Seguidos de dos siRNAs que mostraron identidad con 17 secuencias de genomas diferentes, estos fueron los siRNAs 51 y 221. Fueron tres los siRNAs que mostraron identidad por pares de bases con 16 secuencias de genomas diferentes, estos fueron los siRNAs dos, 79 y 111. Seguidos del siRNA 53 que mostró identidad con 15 secuencias de genomas diferentes. Los siRNAs 66 y

149 mostraron identidad con 14 secuencias de genomas diferentes. Mientras que los siRNAs 45 y 90 mostraron identidad por pares de bases con 13 secuencias de genomas diferentes. Los siRNA 33 y 13 mostraron identidad con 12 y 11 secuencias de genomas diferentes, respectivamente. Por otro lado, los siRNAs 10, 140 y 141, mostraron identidad con nueve secuencias de genomas diferentes. Mientras que los siRNAs 12, 27, 105, 107, 120, 152, 157, 223 y 224, mostraron identidad con siete secuencias de genomas diferentes. Fueron siete los siRNAs que mostraron identidad con seis secuencias de genomas diferentes, estos fueron los siRNAs 37, 46, 47, 87, 106, 139 y 170. Seguidos de 10 siRNAs que mostraron identidad con cinco secuencias de genomas diferentes, estos fueron los siRNAs tres, 44, 69, 103, 119, 122, 167, 175, 202 y 214. Únicamente el siRNA 193 mostró identidad con cuatro secuencias de genomas diferentes. En contraparte fueron 118 los siRNAs que mostraron identidad con tres secuencias de genomas diferentes, estos siRNAs fueron uno, cuatro, seis, siete, ocho, nueve, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 30, 31, 32, 35, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 48, 49, 54, 56, 57, 58, 59, 61, 62, 63, 64, 70, 71, 72, 80, 83, 84, 85, 89, 91, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 114, 117, 118, 121, 124, 125, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 142, 143, 144, 145, 147, 148, 150, 153, 154, 158, 159, 160, 161, 169, 171, 172, 174, 176, 180, 181, 182, 185, 186, 187, 189, 190, 191, 192, 194, 195, 196, 197, 198, 201, 204, 205, 206, 207, 208, 211, 212, 213, 215, 216, 217, 218, 220, 222 y 225. Por otro lado, los siRNAs que mostraron identidad solo con una secuencia de genoma fueron el siRNA 11, 24, 29, 50, 52, 60, 65, 78, 81, 82, 93, 102, 104, 108, 109, 110, 112, 113, 115, 123, 135, 138, 146, 151, 155, 163, 164, 168, 173, 179, 183, 188, 210 y 219. Mientras que los siRNAs 74, 116, y 209 no mostraron identidad con ninguna secuencia de la base de datos de begomovirus.

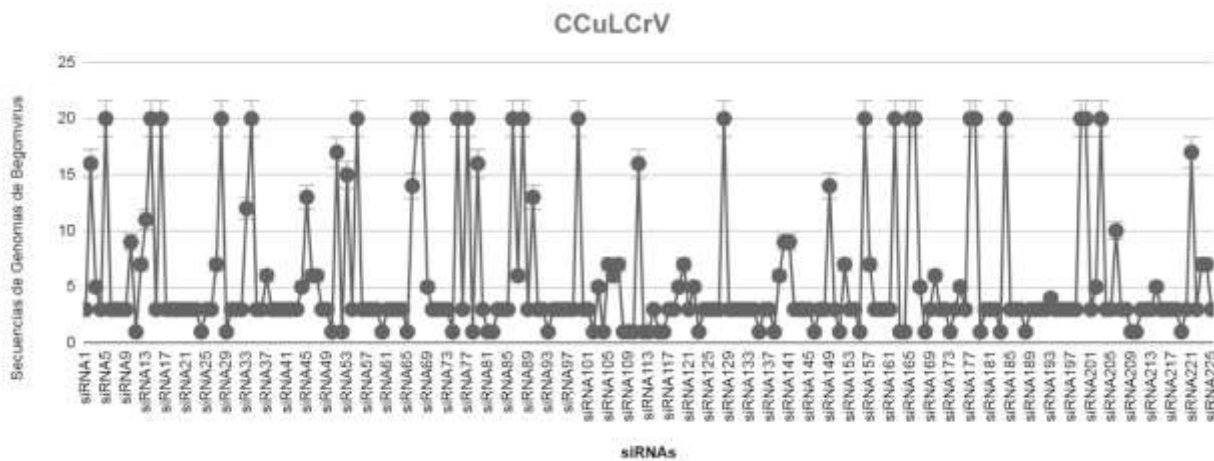


Figura 23. siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV denominado CCuLCrV flanqueando secuencias de genomas de begomovirus.

De los 225 siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV denominado CCuLCrV, se observó que 222 hibridaron con un total de 121 secuencias de la base de datos que corresponden a 60 especies. Las secuencias se alinearon utilizando el método ClustalW y se llevó a cabo el análisis evolutivo por el método de Máxima verosimilitud (Fig. 24). La secuencia con número de acceso GenBank 456789 del beet curly top Iran virus, que corresponde al género *Becurtovirus* de la familia *Geminiviridae*, se utilizó como raíz del árbol. La historia evolutiva se dedujo mediante el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Se presenta el árbol con la mayor probabilidad logarítmica (-108154.07). Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan. Los dendogramas iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron de forma automática utilizando los algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias entre pares estimada a través del enfoque de máxima verosimilitud Compuesta (MCL) y seleccionado a continuación la topología con un valor de probabilidad logarítmica mayor. El dendograma se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas por la cantidad de sustituciones por sitio, el análisis incluyó 122 secuencias. Las posiciones de codones incluidas fueron 1ª + 2ª + 3ª + no codificadas. En el conjunto final de datos había un total de 3088 posiciones. Se llevaron a cabo los análisis evolutivos en MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021).

En el análisis evolutivo se observó que las secuencias se concentraron en dos grandes grupos; el primero en la parte superior agrupa secuencias flanqueadas por la mayor cantidad de siRNAs. En un clúster se agrupan tres secuencias marcadas en verde flanqueadas por más de 150 siRNAs, incluida la secuencia de la que se obtuvo el fragmento propuesto para la dsRNA. Mientras que en el grupo inferior se observan las secuencias flanqueadas por la menor cantidad de siRNAs. En color azul se observan las secuencias aisladas por el grupo de trabajo de Fitopatología de CIBNOR.

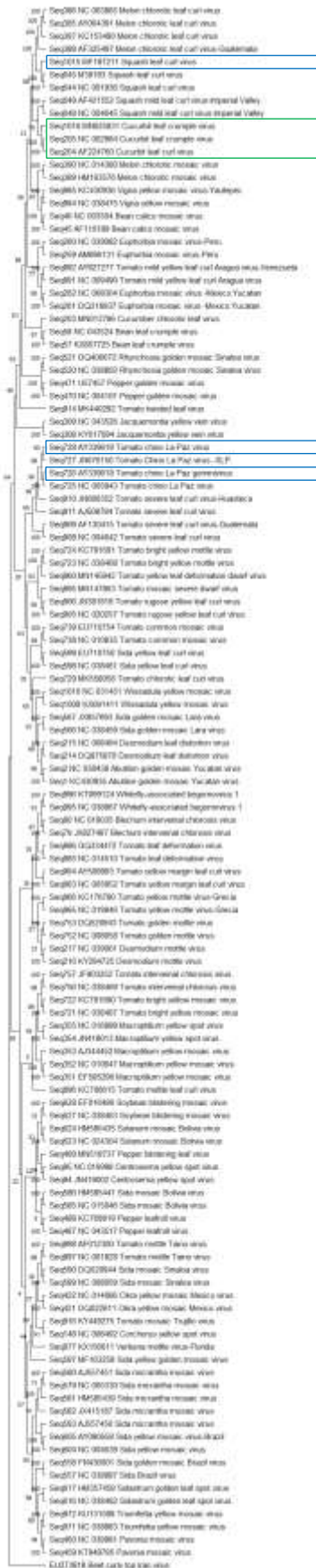


Figura 24. Análisis evolutivo por el método de máxima verosimilitud de 121 secuencias del género *Begomovirus* flanqueadas por siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV denominado CCuLCrV. Se observan dos grandes grupos, en la parte superior se agruparon las secuencias flanqueadas por la Mayor cantidad de siRNAs, en un clúster se observan tres secuencias marcadas con un cuadro en color verde que fueron flanqueadas por más de 150 siRNAs. Mientras que en la parte inferior se observan las secuencias flanqueadas por la menor cantidad de siRNAs. En color azul se observan las secuencias aisladas por el grupo de trabajo de Fitopatología de CIBNOR.

7.3.8 siRNAs derivados de SLCuV de mayor eficiencia en infección sencilla y mixta

Se obtuvieron 250 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva (Pan *et al.*, 2011) del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV, que presentan un rango de inhibición que oscila entre 70.11 y 94.32 %. El análisis blastn local de los 250 siRNAs con la base de datos de begomovirus mostró que se produjeron 852 alineamientos significativos (Fig. 25), con 94.7-100 % de identidad por pares de bases. De estos, 241 fueron con la secuencia MF187211 del SLCuV que corresponden al 28 %, es decir con la secuencia homóloga. En orden descendente los siguientes alineamientos significativos fueron 167 y 160, con las secuencias NC_001936 y M38183 del squash leaf curl virus que corresponde a 19.4 y 18.6 %, respectivamente. Los siguientes alineamientos significativos fueron 19 con las secuencias NC_008304 y DQ318937 del Euphorbia mosaic virus, que representan cada una el 2.2 %. Seguido de 13 y 12 alineamientos significativos con la secuencia KC153490 y MN625831 del melon chlorotic leaf curl virus y cucurbit leaf crumple virus que representan el 1.5 y 1.4 %, respectivamente. Se observaron 11 alineamientos significativos con las secuencias AY927277 y NC_009490 del tomato mild yellow leaf curl Aragua virus, donde cada una representan el 1.3 %. Seguido de las secuencias NC_002984 y AF224760 del cucurbit leaf crumple virus y cucurbit leaf curl virus, con las que se observaron 10 alineamientos que representan el 1.2 % cada una. Se observaron ocho alineamientos significativos con las secuencias AY064391 y NC_003865 del melon chlorotic leaf curl virus que representan cada una el 0.9 %. Seguido de seis alineamientos significativos con las secuencias AF421552 y NC_004645 del squash mild leaf curl virus que representan cada una el 0.7 %. Se observaron cinco alineamientos significativos con las DQ875870 y NC_008494 del Desmodium leaf distortion virus que representan cada una el 0.6 %. Seguido de cuatro alineamientos

significativos que se observaron con las secuencias KX691411 y NC_031451 del *Wissadula yellow mosaic virus*, que representan cada una el 0.5 %. El resto de los alineamientos significativos fueron de tres a uno, representado del 0.3 al 0.1 %. Mientras que hubo nueve siRNAs que no alinearon con ninguna secuencia de la base de datos de begomovirus. El 96.4 % de los siRNAs derivados de CSLCuV, hibridaron con al menos una secuencia objetivo de la base de datos.

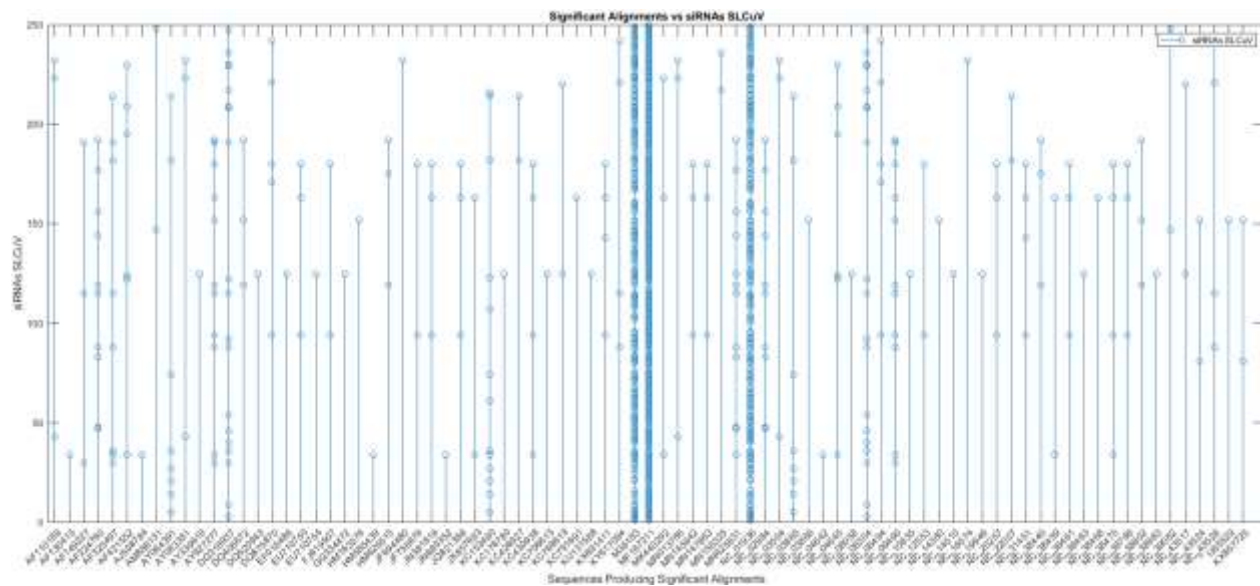


Figura 25. Alineamientos significativos de siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV denominado CSLCuV flanqueando las secuencias asociadas al género *Begomovirus*.

Los siRNAs descritos a continuación se alinearon con 94.7-100 % de identidad por pares de bases (Fig. 26), cabe destacar que hubo cinco siRNAs que mostraron identidad con la mayor cantidad de secuencias de genomas diferentes, 20 cada uno, estos fueron los siRNAs 34, 94, 125, 163 y 180. Seguidos del siRNA 115 que mostró identidad por pares de bases con 14 secuencias de genomas diferentes. Dos siRNAs mostraron identidad con 13 secuencias de genomas diferentes, estos fueron los siRNAs 88 y 152. Seguidos de los siRNAs 119 y 192, que mostraron identidad con 12 secuencias de genomas diferentes. Seis siRNAs mostraron identidad por pares de bases con nueve secuencias de genomas diferentes, estos siRNAs fueron 30, 36, 182, 191, 214 y 232. El siRNA 223 mostró identidad con ocho secuencias de genomas diferentes. Se observó que cuatro siRNAs mostraron identidad por pares de bases con siete secuencias de

genomas diferentes, estos fueron los siRNAs 43, 122, 209 y 230. Mientras que 13 siRNAs mostraron identidad con seis secuencias de genomas diferentes, estos siRNAs fueron el cinco, 14, 21, 27, 47, 48, 74, 83, 144, 156, 177, 217 y 236. Seguidos de 19 siRNAs que mostraron identidad con cinco secuencias de genomas diferentes, los siRNAs tres, nueve, 40, 46, 54, 81, 92, 124, 143, 147, 175, 195, 208, 220, 221, 229, 242, 247 y 248. Se observó que 106 siRNAs mostraron identidad con tres secuencias de genomas diferentes, estos siRNAs fueron uno, dos, cuatro, seis, ocho, 12, 13, 16, 22, 25, 29, 32, 33, 35, 41, 42, 44, 50, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 67, 68, 71, 72, 73, 76, 80, 82, 84, 87, 90, 91, 93, 95, 96, 102, 103, 104, 108, 109, 110, 112, 113, 114, 121, 126, 127, 130, 132, 134, 135, 137, 141, 146, 149, 151, 157, 159, 160, 161, 168, 170, 171, 172, 178, 181, 183, 189, 194, 196, 197, 198, 201, 202, 204, 205, 207, 212, 215, 218, 222, 224, 225, 228, 231, 233, 234, 238, 239, 240, 241, 243, 244, 245 y 249. Once siRNAs mostraron identidad por pares con dos secuencias de genomas diferentes, estos siRNAs fueron 13, 26, 45, 61, 77, 100, 107, 123, 138, 210 y 216. Mientras que los siRNAs que mostraron identidad por pares de bases con únicamente la secuencia de un genoma fueron los siRNAs siete, 10 11, 15, 17, 18, 20, 23, 24, 28, 31, 38, 39, 55, 57, 66, 69, 70, 10, 11, 15, 17, 18, 20, 23, 24, 28, 31, 38, 39, 55, 57, 66, 69, 70, 75, 79, 85, 89, 97, 98, 99, 101, 105, 106, 111, 116, 117, 120, 128, 129, 131, 133, 139, 142, 148, 150, 153, 154, 155, 158, 162, 164, 166, 174, 176, 179, 184, 186, 187, 190, 193, 199, 200, 203, 213, 226, 227, 235, 237, 246 y 250. Por otro lado, se observaron siRNAs que no tuvieron identidad con ninguna secuencia, estos siRNAs fueron el 19, 37, 49, 78, 86, 118, 120, 186 y 219.

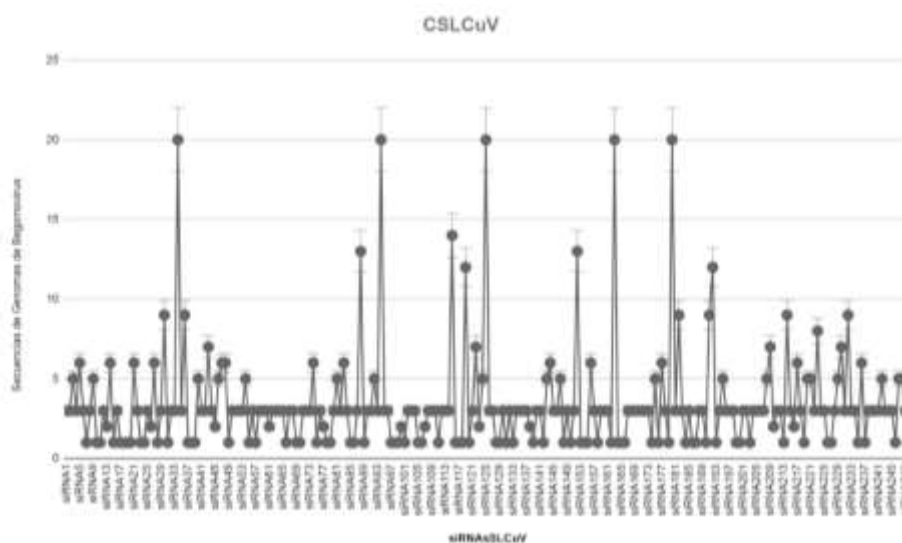


Figura 26. siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV denominado CSLCuV flanqueando secuencias de genomas de begomovirus.

De los 250 siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV denominado CSLCuV, se observó que 241 flanquearon con un total de 84 secuencias que corresponden a 43 especies. Estas secuencias se alinearon utilizando el método ClustalW y se realizó el análisis evolutivo por el método de máxima verosimilitud (Fig. 27). La secuencia con número de acceso GenBank 456789 de la especie *Beet curly top Iran virus*, que corresponde al género *Becurtovirus* de la familia *Geminiviridae*, se utilizó como raíz del árbol.

Se dedujo la historia evolutiva mediante el método de máxima verosimilitud y el modelo de Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993). Se presenta el dendograma con la mayor probabilidad logarítmica (-73651.99). Junto a las ramas se muestra el porcentaje de árboles en los que los taxones asociados se agrupan. Los dendogramas iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron de forma automática aplicando dos algoritmos Neighbor-Join y BioNJ a una matriz de distancias entre pares estimada a través del enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL) y se seleccionó a continuación la topología con un valor de probabilidad logarítmica superior. El dendograma se dibuja a escala, con longitudes de rama medidas en número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó 85 secuencias nucleotídicas. Las posiciones de codones incluidas fueron 1ª + 2ª + 3ª + no codificadas. En el conjunto final de datos había un total de 2967 posiciones. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

En el análisis evolutivo se observó que las secuencias se concentraron en dos grandes grupos; el primero en la parte superior agrupa secuencias que flanquearon la menor cantidad de siRNAs. Mientras que en el grupo inferior se puede ver la secuencia de la que se obtuvo el fragmento propuesto para la dsRNA, en un clúster con otras dos secuencias a las que flanquearon más de 100 siRNAs, estas se marcaron en color verde. En color azul se observan las secuencias aisladas por el grupo de trabajo de Fitopatología de CIBNOR.

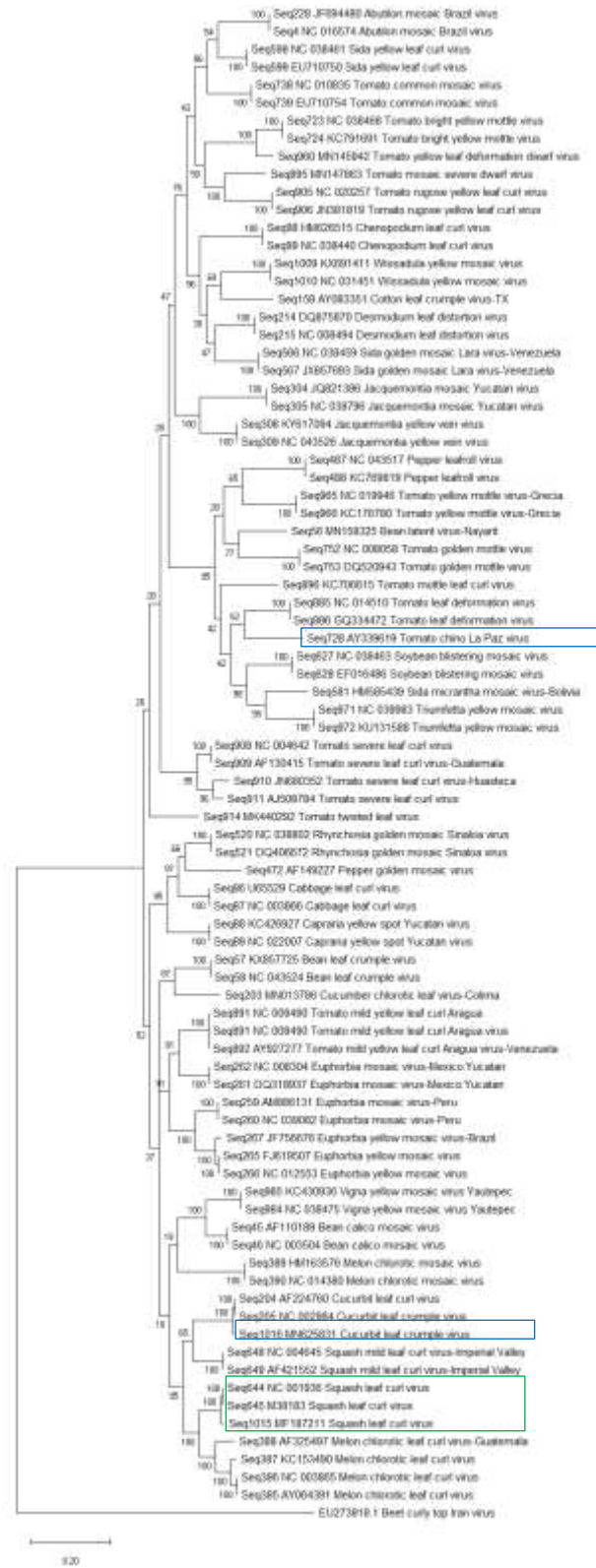


Figura 27. Análisis evolutivo por el método de máxima verosimilitud de 84 secuencias del género *Begomovirus* flanqueadas por siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV denominado CSLCuV. Se observan dos grandes grupos, en la parte superior se agruparon las

secuencias flanqueadas por la menor cantidad de siRNAs. Mientras que en la parte inferior se observan las secuencias flanqueadas por la mayor cantidad de siRNAs, en un clúster se observan tres secuencias marcadas con un cuadro en color verde que fueron flanqueadas por más de 100 siRNAs. En color azul se observan las secuencias aisladas por el grupo de trabajo de Fitopatología de CIBNOR.

8. DISCUSIÓN

Por naturaleza los begomovirus tienden a asociarse entre sus especies e incluso con las de otro género (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2002; Reveles Torres *et al.*, 2012). En el noroeste de México se ha presentado la infección sencilla y asociación de estos patógenos de genoma monopartita y bipartita que afectan a los diferentes cultivos de solanáceas y cucurbitáceas (Holguín-Peña *et al.*, 2006; Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010; Lebsky *et al.*, 2011; Lugo Melchor *et al.*, 2011; Medina-Hernández *et al.*, 2019). Por esa razón, la caracterización molecular de los agentes causales asociados a las infecciones mixtas, particularmente en las hortalizas en BCS es de gran relevancia para el establecimiento de las medidas fitosanitarias que permitan el control de estos patógenos. En este estudio se utilizó la secuenciación masiva que permite una profundidad de secuenciación significativa de los genomas (López De Heredia Larrea, 2016) de los patógenos presentes en las muestras de las plantas infectadas de manera natural, sin dejar de lado los análisis moleculares pertinentes (Rojas *et al.*, 1993; Lapidot *et al.*, 2014). En la caracterización molecular de los agentes causales asociados a la infección begomoviral se encontró la infección mixta de ToChLPV con TYLCV, de TYLCV con SLCuV y TYLCV se encontró en la infección sencilla, en las muestras de plantas de tomate; los aislados de ToChLPV, TYLCV y SLCuV mostraron ligeras modificaciones en sus secuencias de nucleótidos, pero no mostraron cambios en los tamaños y la organización de los ORFs (Holguín-Peña *et al.*, 2006; Cardenas-Conejo *et al.*, 2010; Medina-Hernández *et al.*, 2019). En las muestras de las plantas de chile no se encontraron begomovirus; sin embargo, se confirmó la infección sencilla causada por la especie *Beet curly top virus* del género *Curtovirus*, otro miembro de la familia *Geminiviridae*, que se reporta por primera vez en este cultivo en la Península de Baja California. Los datos indican que la organización de su genoma codifica siete proteínas a diferencia de los aislados reportados que presentan solo cinco o seis genes (Varsani *et al.*, 2014). En México esta especie se ha reportado principalmente en los estados de Aguascalientes y Zacatecas asociado a cultivos de chile (Velásquez-Valle *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Mauricio-Castillo *et al.*, 2017) e igualmente con alta identidad por pares de bases con las reportadas en USA. Por otro lado, en las cucurbitáceas como el melón y la calabaza se confirmó la infección mixta de CuLCrV con SLCuV, mientras que, en las muestras de sandía y pepino, se confirmó la presencia de SLCuV en infección sencilla. Los aislados de CuLCrV

y SLCuV, mostraron ligeras modificaciones en las secuencias de los nucleótidos, pero no mostraron cambios en los tamaños y la organización de los ORFs (Guzman *et al.*, 2000; Lapidot *et al.*, 2014). Sin embargo, los componentes genómicos de CuLCrV tienen 11 nt en la región común que no comparten con las variantes de Arizona y California (Brown *et al.*, 2002; Guzman *et al.*, 2000), pero si con el CuLCrV reportado en Campeche (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2021). Los análisis de este estudio se realizaron con 41 secuencias de genomas completos de begomovirus y una de curtovirus.

8.1 Infección mixta causada por begomovirus en tomate

Las infecciones mixtas ocasionadas por dos o más patógenos en un mismo hospedero, pueden ser potencializadas por la plasticidad de los begomovirus y desencadenar el surgimiento de nuevas enfermedades por eventos de mutación, recombinación y pseudo-recombinación (Seal *et al.*, 2006). En este estudio se determinaron las infecciones mixtas en las muestras de las plantas de tomate con síntomas severos (Fig. 3E) obtenidas en el Valle de Santo Domingo; los análisis por PCR amplificaron los fragmentos esperados y las secuencias obtenidas de dichos fragmentos mostraron la presencia del ToChLPV y TYLCV. Los resultados obtenidos son consistentes con lo reportado por Cárdenas-Conejo *et al.* (2010), quienes documentaron la infección mixta de estos dos begomovirus en las plantas de *C. annuum* en BCS. Otras muestras de tomate dieron positivo a la infección mixta TYLCV con SLCuV, consistente con lo reportado por Lugo Melchor *et al.* (2011) en Sinaloa, quienes observaron la coinfección por estos dos begomovirus. En tanto que en las muestras de las plantas de tomate obtenidas en Todos Santos se documentó la infección sencilla causada por TYLCV. En las infecciones mixtas con los begomovirus se pueden presentar interacciones de sinergismo en las que los síntomas son más severos que los que causa la infección por una sola especie (Rentería-Canett *et al.*, 2011; Sufrin-Ringwald y Lapidot, 2011). En el caso del tomate esta interacción se documentó en donde se observó la mayor severidad de los síntomas en los cultivos del Valle de Santo Domingo en los que se determinó la infección mixta TYLCV/ToChLPV o TYLCV/SLCuV y síntomas menos severos en donde se documentó la infección sencilla en Todos Santos.

La secuenciación masiva ha venido a complementar la tradicional, ya que permite secuenciar en paralelo millones de fragmentos de ADN de múltiples individuos (Schloss, 2008). Con el uso de estas plataformas se obtuvieron los datos que confirmaron, tanto las infecciones sencillas como la mixta en las muestras obtenidas de las plantas de tomate. El genoma de TYLCV se obtuvo de la infección sencilla de las muestras de Todos Santos; este aislado denominado BCS TSANTOS tiene 2781 pb y se observó una mayor identidad por pares de bases del 99.28 % con un aislado de Guasave FJ012358 (Gámez-Jiménez *et al.*, 2009). Los datos del aislado TYLCV, identificado y caracterizado en este trabajo es una variante del aislado de Guasave, son consistentes con los criterios del ICTV que indican que debe clasificarse como perteneciente a la especie con la que comparte ≥ 91 % de identidad de secuencia nt del genoma completo o como perteneciente a la cepa con la que comparte ≥ 94 % de identidad de secuencia del genoma completo (Brown *et al.*, 2015). Por otro lado, los datos obtenidos de las muestras de las plantas de tomate del Valle de Santo Domingo indican que se trata de la infección mixta TYLCV/SLCuV. El genoma de TYLCV el aislado BCS SDT, tiene 2781 pb y se observó que el genoma completo tiene una mayor identidad por pares de bases del 99.64 %, con el aislado TYLCV reportado en Sinaloa EF523478 (Rojas *et al.*, 2007). Por otra parte, los componentes genómicos del SLCuV mostraron que tienen 2639 pb y 2608 pb para ADN-A y ADN-B, respectivamente. Su componente A, el aislado BCS SDTA1, mostró mayor identidad por pares de bases del 99.54 %, con un aislado de Arizona MW588384 (Fontenele *et al.*, 2021). Igualmente, su componente B, el aislado BCS SDTB1, mostró la mayor identidad del 95.43 % con el aislado MW588408, también reportado en Arizona. En cambio el SLCuV previamente reportado en el Estado, aislado de muestras de las plantas de calabaza, que mostró mayor identidad con aislados de SLCuV reportados en Medio Oriente y menor identidad con los de Arizona (Medina-Hernández *et al.*, 2019). En otra muestra de tomate en la que los datos indicaron la infección mixta TYLCV/SLCuV, el TYLCV, aislado BCS SDT3 con 2781 pb, mostró una mayor identidad por pares de bases del 99.32 % con el aislado de Sinaloa EF523478 (Rojas *et al.*, 2007). Mientras que el ADN-A del SLCuV el aislado BCS SDTA2 tiene 2640 pb, el cual presentó mayor identidad por pares de bases del 99.17 % con MW588376 (Fontenele *et al.*, 2021) aislado en Arizona. Su componente B, el aislado BCS SDTB2 que tiene 2608 pb, mostró mayor identidad por pares de bases del 94.58 % con MW558404 aislado en Arizona, seguido de un 94.4 % que se observó con el aislado MF504013 de Pakistán. En la misma muestra se

encontró un segundo componente B del SLCuV, el aislado BCS SDTB3 que tiene 2593 pb, el cual igualmente presentó mayor identidad por pares de bases del 93.23-93.7 % con MW645361 y MW588395, ambos aislados de Arizona. La infección mixta TYLCV/SLCuV se ha documentado en el estado de Sinaloa (Lugo Melchor *et al.*, 2011); sin embargo, aquí se muestran los genomas completos de los dos patógenos y dos componentes B de SLCuV, consistentes con estudios que han documentado que el ADN de SLCuV se incrementa varias veces ante la presencia de otro begomovirus (Sufrin-Ringwald y Lapidot, 2011). Por otro lado, otra versión de infección mixta observada en cultivos de tomate en el Valle de Santo Domingo fue la de ToChLPV/TYLCV, en la cual el genoma de ToChLPV se compone de 2609 pb, es el aislado BCS SDToCh que tiene una identidad por pares de bases del 98.93 % con HM459852, seguido del 96.02 % con AY339619 ambos aislados previamente en BCS (Holguín-Peña *et al.*, 2006; Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010). Mientras que el genoma de TYLCV se conforma de 2781 pb, es el aislado BCS SDT2, el cual mostró que tiene una identidad por pares de bases del 99.57 % con el aislado de Guasave FJ012358 (Gámez-Jiménez *et al.*, 2009). Los datos aportados por este estudio, fortalecen tres aspectos importantes. Primero, la permanencia de estos dos begomovirus en la Península (Cardenas-Conejo *et al.*, 2010), segundo su distribución al interior, ya que el TYLCV y ToChLPV reportados previamente se aislaron de plantas cultivadas al sur de BCS (Holguín-Peña *et al.*, 2006; Cardenas-Conejo *et al.*, 2010; Lebsky *et al.*, 2011), y tercero la ausencia de un componente B del ToChLPV (Holguín-Peña *et al.*, 2006). Por otro lado, los datos de las secuencias obtenidas confirman que pertenecen a los aislados con lo que mostraron mayor identidad por pares de bases del genoma completo, porque son consistentes y cumplen con los criterios del ICTV (Brown *et al.*, 2015).

8.2 Infección sencilla y mixta causada por SLCuV y CuLCrV en cucurbitáceas

Las infecciones causadas por begomovirus en cucurbitáceas han sido ampliamente documentadas (Cohen y Nitzany, 1960; Flock y Mayhew, 1981; Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a). En este estudio se determinó que las muestras de las plantas de *C. sativus* y *C. lanatus* dieron positivo a la infección sencilla por el SLCuV. Igualmente, en las muestras de calabaza se determinó la infección sencilla por SLCuV e infección mixta por SLCuV/CuLCrV. En cambio, en las muestras de plantas de melón únicamente se documentó la infección mixta por SLCuV/CuLCrV;

esta infección mixta parece altamente virulenta al menos en calabaza y melón. Infecciones como esta se han presentado en el sur de los Estados Unidos de América (Flock y Mayhew, 1981; Brown *et al.*, 2002; Hagen *et al.*, 2008).

En la infección sencilla causada por SLCuV en las muestras de las plantas de pepino se observaron sus dos componentes genómicos ADN-A y ADN-B; el ADN-A de 2638 pb mostró la mayor identidad por pares de bases de 99.17 a 99.24 % con aislados SLCuV de Jordania como KM595156, KM595202 y KM595191, la mayor identidad con aislados de Medio Oriente que con los aislados de Arizona o California se han documentado en la Península (Medina-Hernández *et al.*, 2019). Mientras que el componente B de 2608 pb mostró la mayor identidad por pares de bases, el 95.48 % con el aislado MW588408 de Arizona (Fontenele *et al.*, 2021). Por otro lado, los datos obtenidos de las muestras de las plantas de sandía mostraron la infección sencilla causada por SLCuV, del cual se aislaron sus dos componentes genómicos. El componente ADN-A con 2639 pb mostró la mayor identidad por pares de bases del 98.6 al 99 % con los aislados MW588384 y MW588389 de Arizona. Mientras que el componente B mostró la mayor identidad por pares de bases del 97.80 % con el aislado DQ285016 de California. Las infecciones causadas por SLCuV en cucurbitáceas se han documentado desde 1977 en California (Flock, 1981) desde donde se ha distribuido a diferentes regiones, una de ellas el Medio Oriente donde se ha asentado y se sabe que ha causado serias afectaciones a los diferentes cultivos (Antignus *et al.*, 2003; Al-Musa *et al.*, 2008; Farrag *et al.*, 2014).

Por otro lado, las infecciones sencilla y mixta por CuLCrV/SLCuV en cucurbitáceas se han presentado en California de donde estos patógenos se han extendido hacia el este de los Estados Unidos y donde su área de distribución y hospederos se traslapan (Kuo *et al.*, 2007; Akad *et al.*, 2008; Keinath *et al.*, 2018). En la infección mixta determinada en calabaza se observó que CuLCrV presenta sus dos componentes, característicos de los bipartitas del Nuevo Mundo. El ADN-A tiene 2642 pb que corresponde al aislado BCS CP, el cuál mostró una identidad por pares de bases del 98.56 % con MN625831, aislado de las plantas de melón durante la primera fase de esta investigación y con el aislado de Campeche MW273384, mostró una identidad por pares de bases del 98.14 % (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2021). Por su parte, el ADN-B tiene 2610 pb, que corresponde al aislado BCS CpP12, el cual mostró una identidad por pares de bases del 94.75 % con MW380744, aislado previamente en BCS, en la primera fase de

este trabajo; mientras que con AF327559, aislado en Arizona (Brown *et al.*, 2002), mostró una identidad por pares del 93.26 %. El otro begomovirus presente en la infección mixta documentada en plantas de calabaza, es el SLCuV, la evidencia muestra que su ADN-A tiene 2638 pb, que es el aislado denominado BCS CpP, el cual mostró que su mayor identidad por pares de bases oscila de 99.28 al 99.36 % con KM595184, KM595202 y KM595191, todos aislados en Jordania (Lapidot *et al.*, 2014). Por otro lado, el genoma B, tiene la presencia de varios fragmentos de su secuencia, sin embargo, no se obtuvo una con el genoma completo, es decir estaba fragmentado. En estudios anteriores se ha documentado que el elemento de la especificidad de la replicación de begomovirus en el origen de la replicación de CuLCrV-AZ es idéntico a la de SLCuV, lo que sugiere la posibilidad de reordenamiento de los componentes de estas dos especies (Brown *et al.*, 2002). El que se haya ensamblado solo un componente B completo, ante la certeza de que las dos especies están presentes, podría ser evidencia del reordenamiento de sus componentes en infección mixta de manera natural en cultivos de calabaza en BCS. Posiblemente la replicación de estos dos virus sea más eficiente si la maquinaria solo se utiliza para replicar una molécula de ADN-B, cuyos ORFs técnicamente desempeñan la mismas funciones del movimiento inter e intracelular (Brown *et al.*, 2002).

La infección sencilla que se observó en las muestras de las plantas de calabaza infectadas de manera natural en los cultivos de San Juan de los Planes mostró al SLCuV con sus dos componentes genómicos. El ADN-A de 2638 pb fue el aislado CpL10 que presentó la mayor identidad por pares de bases del 98.94 al 99.01 % con los aislados reportados en Jordania KM595184 y KM595191, respectivamente (Lapidot *et al.*, 2014). Mientras que el componente B presentó 2608 pb, que es el aislado denominado BCS CpL11, el cual mostró la mayor identidad por pares de bases del 95.48 al 95.51 %, con los aislados MF504012 y MF504013, ambos reportados en Pakistán. En cambio los aislados de calabaza en el Valle de Santo Domingo mostraron la mayor identidad con aislados de Arizona (Fontenele *et al.*, 2021).

La infección mixta con los begomovirus CuLCrV y SLCuV en muestras de plantas de melón es la evidencia del traslape de los hospederos y del área de distribución de estos dos patógenos, como lo que se ha presentado en el sur de los Estados Unidos desde California hasta Florida y Carolina del Sur (Kuo *et al.*, 2007; Akad *et al.*, 2008; Keinath *et al.*, 2018). En esta infección se observó que el componente A de CuLCrV mostró 2642 pb que es el aislado BCS CMP, el cual

mostró mayor identidad por pares de bases del 98.41 % con el aislado MN625831, reportado en la primera fase de este trabajo, seguido del 98.03 % que se observó con el aislado MW273384 reportado en el estado de Campeche (Rodríguez-Negrete *et al.*, 2021). El ADN-B presentó 2610 pb que corresponden al aislado BCS CMP, el cual mostró una identidad por pares de bases del 94.75 % con el MW380744 de BCS, seguido del 93.26 % que se observó con un aislado de Arizona AF327559 (Brown *et al.*, 2002). Los datos de identidad del ADN-A de CuLCrV, aislados de la calabaza y del melón indican que entre ellos hay una identidad por pares de bases del 99.8 % y del ADN-B la identidad es del 100 %. En la infección mixta de plantas de melón el ADN-A de SLCuV, tiene 2638 pb es el aislado BCS CMPA1 el que mostró una mayor identidad por pares de bases con aislados de Jordania del 99.24 al 99.32 % con KM595184 y KM595191, respectivamente (Lapidot *et al.*, 2014). Con el KM595107 y KM595109, otros aislados de Israel, también mostró una identidad por pares del 99.24 % (Lapidot *et al.*, 2014). El componente B de SLCuV, tiene 2592 pb es el aislado BCS CMPB1, el cual se observó que tiene mayor identidad por pares de bases con aislados reportados en Arizona 92.61 % con MW588396 y 92.96 % con MW645361. Las evidencias muestran que las infecciones mixtas en la naturaleza pueden ser viables, como las encontradas en BCS en las que participan SLCuV/CuLCrV (Brown *et al.*, 2002).

A pesar de que los aislados de CuLCrV de Estados Unidos (AZ, CA) y México (BCS) comparten similitudes biológicas y genómicas, existe una secuencia de 11 pb en la región común que no es compartida por las variantes de Arizona y California, USA. Como han reportado previamente Argüello-Astorga *et al.* (1994), la mayoría de los begomovirus tienen secuencias repetidas asociadas a la replicación (secuencias iterativas/iterones) en la región intergénica. Estas secuencias pueden ser diferentes incluso en especies estrechamente relacionadas. Sin embargo, debido al número, dirección y secuencia de los iterones, pueden cumplir funciones relacionadas con la replicación o la especificidad del hospedero; como la alta eficacia de SLCuV y CuLCrV en el reconocimiento del hospedero y la consiguiente generación de síntomas. De hecho, este reconocimiento podría estar relacionado en que ambos tienen iterones que ayudan a las proteínas a reconocer sitios de unión en la replicación viral (Xu *et al.*, 2019; Fontenele *et al.*, 2021). Así, la alta susceptibilidad y afinidad al hospedero de la infección mixta podría ser el resultado de los iterones presentes en CuLCrV pero no en los otros begomovirus que pertenecen al clado SLCuV. Este resultado implica que la evolución en la infección por ambos

virus ha dado lugar a la aparición de iterones con funciones para interactuar con SLCuV y determinar la unión de alta afinidad a proteínas Rep afines (Xu *et al.*, 2019). Por tanto, el informe de los iterones asociados a la replicación puede explicar que tengan una disposición específica para reconocer diferencialmente virus dentro del mismo clado, ya que se ha observado que la secuencia iterativa TGG(a/t)G ha sido muy estable (Argüello-Astorga *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2019). No obstante, son necesarios más estudios en este sentido.

En la infección sencilla en *C. pepo* por SLCuV determinada en el Valle de Santo Domingo, se observó que las plantas presentaron el mayor grado de severidad a diferencia de lo observado en otras áreas de cultivo, en las que los síntomas fueron menos severos. Este tipo de infección con SLCuV en cultivos de calabaza se ha documentado en diferentes países como los Estados Unidos (Cohen, 1983), Israel (Antignus *et al.*, 2003) y Egipto (Idris *et al.*, 2007), en los que se han observado fuertes daños a pesar de ser una infección sencilla. La evidencia muestra que el ADN-A de SLCuV tiene 2638 pb, que corresponden al aislado BCS SDA1, el cual mostró una mayor identidad por pares de bases el 99.51 % con los aislados MW588376 y MW588379 de Arizona y México, respectivamente (Fontenele *et al.*, 2021). El componente B, tiene 2593 pb es el aislado BCS SDB1 e igualmente mostró mayor identidad por pares de bases con los aislados de Arizona 93.50 y 93.46 %, con MW645361 y MW588395, respectivamente. Otra versión de infección sencilla documentada en el Valle de Santo Domingo fue de acuerdo a las evidencias el SLCuV, cuyos componentes fueron un ADN-A y dos ADN-B. El ADN-A tiene 2639 pb es el aislado BCS SDA3, el que tiene mayor identidad por pares de bases, del 98.64 % con MW588379, MW588374 y MW588373, aislados de México y Arizona (Fontenele *et al.*, 2021). Un componente B tiene 2593 pb, el aislado BCS SDB3, el cual muestra mayor identidad por pares de bases del 93.50 %, con el aislado MW645361 de Arizona. El otro ADN-B documentado tiene 2608 pb, el aislado BCS SDB4, el cual mostró una mayor identidad por pares de bases del 95.23 % con MW588408, aislado igualmente en Arizona (Fontenele *et al.*, 2021). Un caso similar se observó en la infección mixta de TYLCV/SLCuV documentado en este estudio en las muestras de las plantas de tomate, donde de igual manera SLCuV presentó dos ADN-B, uno con 2593 pb y otro de 2608 pb. Sin embargo, a diferencia de las evidencias obtenidas en las plantas de calabaza, el ADN-B de 2593 pb de las muestras de tomate mostró el 93.7 % con el aislado MW645361; en tanto que el ADN-B de 2608 pb mostró una identidad del 94.58 % con

MW558404, ambos aislados igualmente en Arizona. Posiblemente esas pequeñas diferencias en la identidad por pares de bases observadas en sus genomas, se asocien a la especificidad con el hospedero, porque los aislados no presentaron cambios en el tamaño u organización de sus ORFs (Fontenele *et al.*, 2021). Las secuencias determinadas en la infección sencilla y mixta, en cucurbitáceas pertenecen a los aislados con los que mostraron la mayor identidad por pares de bases, porque son consistentes y cumplen con los criterios de la demarcación de especies establecidos por el ICTV (Brown *et al.*, 2015).

8.3 Determinación del papel etiológico de dos begomovirus

La patogénesis como rama de la patología, estudia los acontecimientos desencadenados de la acción de un factor etiológico, que llega a la manifestación de la enfermedad (Uribe, 2018), cuyo origen puede ser biótico o abiótico. Por lo tanto, es necesario conocer el origen de la patología que puede dar lugar a un diagnóstico y tratamiento adecuado. Por ejemplo, para determinar el papel etiológico de los begomovirus SLCuV y CuLCrV en infección sencilla y mixta, se utilizó el equipo Helios Gene Gun System (BioRad, Hercules, CA, USA) o pistola de genes, de acuerdo a lo establecido por el proveedor y por López-López *et al.* (2013). Se observó que las plantas de *N. benthamiana* y *C. pepo* infectadas presentaron los síntomas similares a los documentados en campos de cultivo a cielo abierto (Vargas-Salinas *et al.*, 2020) dos semanas después de la inoculación de los virus (Fig. 3D, E, G). Severas afectaciones como las observadas en el bioensayo se han documentado con estos begomovirus y hospedero en diferentes áreas de cultivo (Cohen, 1983; Brown *et al.*, 2000; Ali-Shtayeh *et al.*, 2014a). Por ejemplo, en la infección sencilla de SLCuV en las plantas de calabaza, los síntomas fueron más severos (Fig. 3D) que los que presentaron las plantas de nicotiana (Fig. 3G) las cuales se mantuvieron hasta las siete semanas que se prolongó el bioensayo. Sin embargo, el 33 % de las plantas de calabaza tras la infección perecieron entre la quinta y séptima semana. Como es sabido, la planta nicotiana es uno de los modelos más utilizados cuando se realizan análisis de virología ya que puede ser infectada por una gran cantidad de virus (Goodin *et al.*, 2008). Las plantas mostraron síntomas de la infección con los dos virus y se observó que cuando se trata de la infección mixta SLCuV y CuLCrV, nicotiana desarrolla hojas cada vez más pequeñas, enrolladas y cloróticas (Fig. 3L), por lo que fue posible diferenciar claramente entre las plantas con infección sencilla y mixta (Fig. 3J,

K, L). La infección sencilla y mixta se detectó mediante fragmentos de ADN-A y ADN-B de SLCuV y de CuLCrV y en ambos casos se utilizaron oligos específicos (Lapidot *et al.*, 2014; Hagen *et al.*, 2008). La identidad de los virus se observó mediante las secuencias que mostraron un porcentaje de identidad nucleotídica del 98.6 % con las secuencias MF187211 y KM595168 del SLCuV de BCS (Medina-Hernández *et al.*, 2019) y otra reportada en Medio Oriente (Lapidot *et al.*, 2014). Por otro lado, los fragmentos del ADN-B mostraron mayor porcentaje de identidad por pares de bases del 89.7 y 89.9 % con la secuencia HM368374 y DQ285018 del SLCuV aislado de cucurbitáceas en el Líbano (Sobh *et al.*, 2012) y en Arizona (Brown *et al.*, 2005). Las evidencias mostraron que la infección in vitro puede ocurrir con ambos virus, los que incluso se ha documentado que pueden reordenar sus componentes (Brown *et al.*, 2002). La infección de CuLCrV se observó mediante un fragmento de la secuencia del ADN-A que mostró una identidad del 99 % con MN625831 de BCS. Por otro lado, en este estudio y los anteriores se ha documentado que los aislados del SLCuV tienen mayor identidad con los aislados reportados en el Medio Oriente (Medina-Hernández *et al.*, 2019). Incluso esto se confirmó en el bioensayo en la infección sencilla por SLCuV mediante sus dos componentes genómicos completos: el ADN-A de 2638 pb y el ADN-B de 2592 pb, con números de acceso GenBank OQ466373 y OQ466374, respectivamente. Se observó que el ADN-A tiene una identidad por pares de bases del 99.43 % con el aislado KM595191 de Jordania y 99.36 % con dos aislados de Israel KM595107 y KM595109 (Lapidot *et al.*, 2014), mientras que con el aislado MF187211 de BCS mostró el 99.24 % de identidad. Sin embargo, los aislados SLCuV del Valle de Santo Domingo determinados en este estudio presentan mayor identidad con los aislados de Arizona, lo que probablemente esté relacionado con los hospederos alternos reportados recientemente (Fontenele *et al.*, 2021). Esto se presentó también en el ADN-B, con una identidad por pares de bases del 93-93.27 % con MW588396, MW645361 y MW588395, todos aislados de Arizona (Fontenele *et al.*, 2021).

8.4 Infección causada por curtovirus en plantas de Chile

Los curtovirus infectan plantas dicotiledóneas y en México se han reportado tanto en infección sencilla como en mixta con los begomovirus (Velásquez-Valle *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011; Reveles Torres *et al.*, 2012). Por esta razón, para determinar la etiología de la enfermedad observada en las plantas de *C. annuum*, se descartó la presencia de begomovirus. Sin embargo,

considerando los reportes previos en otros lugares (Chen *et al.*, 2011) y el alto porcentaje (80 %) de incidencia de los síntomas observados en campo (Fig. 3F), se seleccionaron tres muestras para la secuenciación masiva. De esta forma se observó que las muestras de plantas sintomáticas de Chile presentaban una infección sencilla por un miembro del género *Curtovirus*, el cual se identificó mediante la comparación por pares de bases del genoma completo, de acuerdo a los criterios de la demarcación de especies del ICTV (Varsani *et al.*, 2014). Considerando que el genoma completo de este aislado de BCS mostró una identidad por pares de bases del 98.84 % con un aislado reportado en Texas, identificado con el número de acceso GenBank AY548948 (Baliji *et al.*, 2004), todo indica que se trata de la especie *Beet curly top virus*, cuyo genoma consta de 2925 pb y su secuencia se registró con el número de acceso GenBank OP019706. Se observó que la organización de su genoma codifica siete proteínas (Fig. 6), a diferencia de los aislados reportados que presentan solo cinco o seis genes (Varsani *et al.*, 2014). Se observaron los sitios de corte por dos enzimas de restricción *Bam*HI que presenta dos sitios de corte y *Eco*RI con un sitio de corte, similares a los presentados por su homólogo reportado en Texas, aislado de las muestras de plantas de espinaca (Baliji *et al.*, 2004). Este es el primer reporte en la Península de Baja California de una infección causada por *beet curly top virus*, un *curtovirus*, que afecta plantas de Chile, con alto porcentaje de incidencia. Considerando que en la región se ha documentado la presencia de *begomovirus* que afectan a este hospedero en infección sencilla y mixta (Cardenas-Conejo *et al.*, 2010; Lebsky *et al.*, 2011), es posible que eventualmente se presente infección mixta en la que participen virus de los dos géneros, como las que se han presentado al interior de la República Mexicana (Reveles Torres *et al.*, 2012) que afecten seriamente este cultivo y ocasionen importantes pérdidas económicas.

8.5 Expresión de genes en plantas de *N. benthamiana* protegidas con secuencias homólogas y heterólogas ante una infección sencilla

La expresión génica de las plantas de *N. benthamiana* protegidas con construcciones derivadas de un fragmento de la secuencia del genoma del ToChLPV y del PepGMV, inoculadas posteriormente con el *begomovirus* PepGMV muestra que CIRP (construcción homóloga de la región intergénica de PepGMV) y CIRT (construcción heteróloga de la región intergénica de ToChLPV) contra PepGMV activan componentes clave del mecanismo de silenciamiento génico RNAi en *N. benthamiana*. Los datos de la expresión génica mostraron que la sobreexpresión de

algunos de los componentes clave del mecanismo de RNAi y asociados a la metilación podrían haber sido activados por la dsRNA heteróloga obtenida de ToChLPV. Los genes regulados al alza activados por ambas construcciones participan en vías entrelazadas de la regulación génica y defensa de las plantas que generan y utilizan diferentes tipos de sRNAs (siRNA, miRNA, ta-siRNA, nat-siRNA and hc-siRNA) que participan en la defensa contra el virus, la regulación del desarrollo, respuesta al estrés y activan el silenciamiento transcripcional (Eamens *et al.*, 2008; Nakasugi *et al.*, 2013). Las evidencias mostraron que la activación de mecanismos en respuesta a la infección sencilla por PepGMV en *N. benthamiana* reconocieron las dsRNA generados a partir de CIRP y CIRT y provocaron la sobreexpresión de DICER como DCL2, DCL3 y DCL4 (Fig. 12). Es sabido que DICER corta dsRNA y a partir de esto puede generar siRNAs de diferentes tamaños, incluidos siRNAs primarios y secundarios (Wang *et al.*, 2011). Los siRNAs se ensamblan en el complejo RISC (Li *et al.*, 2017) y el movimiento sistémico entre las células puede ocurrir a través del floema (Qin *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). DCL2 actúa directamente en el control del virus de manera jerárquica, participa en la generación de sRNAs y activa la producción de una segunda serie de siRNAs llamados siRNAs secundarios o transitivos. Además, DCL2, DCL3 y DCL4, participan en el procesamiento de siRNAs endógenos en las plantas, que se clasifican como siRNAs secundarios, mientras que DCL4 también participa en la defensa contra los virus, induciendo la producción de pequeños siRNAs primarios (Yoshikawa *et al.*, 2005; Axtell *et al.*, 2006; Borges y Martienssen, 2015).

Los análisis de microarreglos y RT-qPCR confirmaron que DCL2 y DCL4 fueron activadas por las construcciones homólogas CIRP y heterólogas CIRT. La RDR6 se involucra en la vía que desencadena la biogénesis de RNAi secundario en la señalización de célula a célula y las plantas en las que se ha introducido la RDR6 mutada, han mostrado que son más susceptibles a las infecciones por begomovirus (Qu *et al.*, 2005). Además, un componente asociado con RDR6 es SDE5, que tiene actividad de RNA helicasa y actúa con RDR6 en la generación de dsRNA a partir de dsRNA específico para producir RNA pequeños de interferencia de acción trans (ta-siRNA), que participan en la interferencia del RNA (Hernandez-Pinzon *et al.*, 2007). Ambas construcciones CIRP y CIRT, activaron SGS3 que se sabe interactúa directamente con RDR6 en la vía de producción de pequeños RNA interferentes con acción trans (ta-siRNA) (Xie *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2017). HEN1, es un factor crucial en la biogénesis de siRNAs y miRNAs que metila y

protege contra la uridilación (Movahedi *et al.*, 2018), también activado por CIRP y CIRT. Además un componente como NRPD1A puede mantener el silenciamiento y la transitividad del RNA a través de la metilación del ADN, participando en la producción y amplificación de la señal de sRNAs junto con la RNA polimerasa nuclear D2B (NRPD2B/Pol IV) (Eamens *et al.*, 2008).

Los datos del microarreglo con los del genoma y transcriptoma de *A. thaliana* contra las diferentes versiones del genoma y transcriptoma de *N. benthamiana* resultó en la identificación de genes homólogos a las transcripciones, implicados en la respuesta de defensa, estrés, resistencia sistémica adquirida, e incluso se identificaron algunos genes que participan en cascadas MAPK implicadas en la señalización de las múltiples respuestas de defensa, como la activación del gen de defensa (Ichimura *et al.*, 2002; Meng y Zhang, 2013) Tabla 6 y RNAi Tabla 7. Los resultados indicaron que AGO3 de *A. thaliana* es similar a AGO2 de *N. benthamiana*, AGO1 es homóloga a AGO1a o AGO1-1 de *N. benthamiana* y que AGO9 de *A. thaliana* es homóloga a AGO4b de *N. benthamiana* (Bombarely *et al.*, 2012; Nakasugi *et al.*, 2013; Kourelis *et al.*, 2018). Todos estos componentes fueron activados por la construcción CIRT heteróloga, lo que sugiere que CIRT puede activar el silenciamiento génico transcripcional.

La red de proteínas utilizando STRING mostró las interacciones moleculares entre los genes expresados diferencialmente mediante la protección con las construcciones CIRT (Fig. 11A) y CIRP (Fig. 11B). En ambos se observó la interacción de las proteínas que participan en el RNAi. Como las proteínas involucradas en la biogénesis de diferentes siRNAs primarios, secundarios y componentes centrales que participan en el inicio y mantenimiento de la metilación del ADN dirigida por RNA (RdDM) en *N. benthamiana* y otras dicotiledóneas (Eamens *et al.*, 2008; Nakasugi *et al.*, 2013; Borges y Martienssen, 2015). Ambas construcciones CIRT y CIRP activan PTGS y TGS.

Los resultados de RT-qPCR (Fig. 12) para genes asociados con RNAi mostraron que PPR1 se expresó en las plantas protegidas con construcciones CIRP homólogas y CIRT heterólogas y en los controles con los niveles de expresión más altos en sv. Se sabe que PPR1 participa en las etapas de crecimiento y desarrollo, en la estructura de la planta y que los genomas de las plantas tienen hasta quinientos genes de PPR por genoma, mientras que los genomas no vegetales codifican solo de dos a seis proteínas PPR (Klepikova *et al.*, 2016). Los altos niveles de

la expresión de sv podrían ser normales en las plantas y es posible que hayan sido afectados por el material exógeno en los otros tratamientos. PPR1 pertenece al clado de genes que codifican proteínas PPR, que se ha documentado que desempeñan funciones importantes en la defensa antiviral en las plantas (Wu *et al.*, 2016). Además, PPR1 participa en la cascada de reacciones mediante las cuales el silenciamiento se propaga a través de la vía SGS3 / RDR6 / DCL4 y su transcripción depende de la acción trans siRNAs (tasiRNAs) (Li *et al.*, 2017). Se ha documentado una ruta alternativa de pequeños RNAs llamados ct-siRNA, que derivan de los codificadores de transcripción que funcionan como un sistema regulador para mantener los sistemas de protección controlados y evitar que las células se sobrecarguen por la sobreexpresión de genes extraños (Zhang *et al.*, 2015). Esta ruta apoya el mantenimiento del transcriptoma y enfoca el mecanismo de defensa únicamente en las transcripciones del ADN invasivo (Alvarez *et al.*, 2010). Estos pequeños RNAs y ta-siRNA dependen de las interacciones con RDR6, SGS3, DCL2, DCL4 y AGO1 (Li y Wang, 2018). Los resultados de los análisis de microarreglos y el RT-qPCR fueron congruentes, lo que indica que estas transcripciones se expresaron en las plantas ensayadas cuando se utilizan las construcciones heterólogas derivadas de ToChLPV y homólogas a PepGMV, porque las cargas virales disminuyeron en (95.6 y 99.5%, respectivamente), como fue descrito previamente (Medina-Hernández *et al.*, 2013). Por otro lado, se ha documentado que DCL2 participa en el proceso de siRNAs endógenos de las plantas, se involucra en la defensa contra los virus, y también cumple funciones específicas en la regulación de la expresión y el mantenimiento del genoma (Vazquez y Hohn, 2013), lo que puede explicar sus altos niveles de expresión observados en las plantas de control negativo (sv). Los altos niveles de expresión de AGO1-1 y AGO2 en plantas protegidas con CIRP y con CIRT, indica la activación de RNAi. Además, se ha documentado la participación de NbAGO1 y NbAGO2 en mecanismos de defensa contra los virus (Ghoshal y Sanfaçon, 2014; Kontra *et al.*, 2016; Odokonyero *et al.*, 2017; Paudel *et al.*, 2018).

Los resultados de este estudio proporcionan datos que indican que la construcción homóloga y heteróloga al PepGMV activan los componentes centrales del mecanismo de silenciamiento génico (RNAi). A pesar de que la identidad de secuencia del ADN-A del PepGMV con ToChLPV fue del 52% y la de los fragmentos utilizados para las construcciones fue de aproximadamente el 50% con seis regiones de más de 22nt de ambos virus, con mayor identidad. Se sabe que los

siRNAs tienen la capacidad de suprimir la expresión del gen deseado ante la complementariedad perfecta, sin embargo también se han presentado evidencias que el siRNA podría regular genes con complementariedades parciales e incluso se ha demostrado que secuencias heterólogas también pueden activar el mecanismo de RNAi (Lin *et al.*, 2011; Mubin *et al.*, 2011) Este resultado contribuye en comprender que la protección cruzada con RNAi, podría ser eficaz para controlar estos patógenos, incluso en las infecciones mixtas (Robinson *et al.*, 2014; Yousaf *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Rasool *et al.*, 2016). La importancia de evaluar los dsRNA heterólogos radica en la presencia de las infecciones mixtas en la naturaleza, que pueden dar lugar a estrategias para las enfermedades con fenotipos que son difíciles de diagnosticar y controlar. Sin embargo, la mayoría de las investigaciones hasta la fecha no han comparado las transcripciones entre secuencias homólogas y secuencias heterólogas con el virus desafiado. Dichas comparaciones pueden aumentar la comprensión de las interacciones virus-virus y proporcionar información sobre etiologías desconocidas. Los resultados son consistentes con los estudios que demuestran que cada tipo de dsRNA produce un tipo diferente de RNA pequeño para las diversas vías involucradas en la activación del silenciamiento génico o la metilación del ADN (Matzke y Mosher, 2014). La mayor expresión de algunos factores clave involucrados en las respuestas de TGS y PTGS juegan un papel crítico en el silenciamiento y la regulación epigenética (Ding, 2010; Saze *et al.*, 2012). En este estudio se observó que se activaron diferentes las vías especializadas en la producción y función de las diferentes clases de RNA pequeños (sRNAs) que se requieren para desencadenar y propagar los PTGS y TGS.

8.6 Eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección con los diferentes modelos begomovirales en las infecciones sencilla y mixta *in silico*

Mediante el análisis del fragmento AC1-RI-AV1 (Rojas *et al.*, 1993) de la secuencia del genoma de los begomovirus PepGMV, TYLCV, ToChLPV, CuLCrV y SLCuV, se obtuvieron datos que indican que la identidad por pares de bases de la secuencia del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV con el fragmento de SLCuV y de TYLCV tienen una identidad por pares de bases del 48.1 % y del 52.2 % respectivamente, cercano al 52.8 % de identidad nucleotídica que se observa entre el fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV y de PepGMV, con los que se ha documentado la activación del mecanismo de silenciamiento génico, menor carga viral y síntomas menos severos (Medina-

Hernández *et al.*, 2013). En tanto que los datos del análisis de los fragmentos de TYLCV y de SLCuV con PepGMV muestran que fueron el más bajo 42.9 y el más alto 68.7 %, respectivamente. Por esta razón existe la posibilidad de activar el mecanismo de RNAi, ya que se observa una mayor identidad por pares de bases entre estos fragmentos. Los datos del análisis de la eficiencia del RNAi activado por una secuencia heteróloga en un sistema de protección con diferentes modelos begomovirales en infección sencilla y mixta *in silico*, muestran el éxito en la predicción de siRNAs utilizando la plataforma siPRED (Pan *et al.*, 2011). Del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV, se obtuvieron 238 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva que presentan un rango de inhibición del RNA mensajero diana, que oscila de 70.26 al 94.87 % (Tabla 8), con el fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV, se obtuvieron 209 siRNAs que presentan un rango de inhibición del RNA mensajero diana, que oscila de 70.07 al 94.53 % (Tabla 9). Por otro lado, el fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV, mostró la mayor cantidad, con 363 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva cuyo rango de inhibición oscila entre 70.08 y 94.6 % (Tabla 10), del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV se obtuvieron 225 siRNAs de alta precisión predictiva cuyo rango de inhibición oscila entre el 70.48 y 94.82 % (Tabla 11), mientras que del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV, se obtuvieron 250 siRNAs candidatos de alta precisión predictiva cuyo rango de inhibición oscila entre el 70.11 y 94.32 % (Tabla 12). Esto indica altas posibilidades de activar el RNAi con las diferentes construcciones propuestas (Tenllado y Díaz-Ruiz, 2001), considerando que se ha validado la eficiencia de las construcciones de ToChLPV y de PepGMV (Medina-Hernández *et al.*, 2013). Como se observó en los análisis, muchos de los componentes que activan el silenciamiento por RNAi son activados por ambas construcciones, y en muchos casos CIRT activa componentes que no activa CIRP (Vargas-Salinas *et al.*, 2021). Las evidencias del análisis Blastn local, mediante el uso del Software Blast2Go (Götz *et al.*, 2008), mostraron que los siRNAs obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de los diferentes begomovirus, promueven la activación del RNAi tanto en infección sencilla, como en mixta. Considerando que fueron 1285 el total de siRNAs obtenidos (Pan *et al.*, 2011), y de ellos 1268 hibridaron con al menos una secuencia de la base de datos; la cual estaba conformada por 1012 secuencias que representan las 445 especies reconocidas del género begomovirus (Fiallo-Olivé *et al.*, 2021) y únicamente el 1.3 % de estos no flanqueo con secuencia alguna. Los datos indican que el uso del fragmento, es decir los siRNAs derivados de él (Pan *et al.*, 2011), son eficientes en el control de la infección

sencilla; se documentó que en todos los casos, una gran cantidad de siRNAs flanquean con la secuencia homóloga (de la cual derivan) (Tenllado *et al.*, 2004; Taha *et al.*, 2016). Considerando esta premisa se observó que en el caso de secuencias homólogas una gran cantidad de siRNAs hibridan las secuencias de los genomas en parte del gen Rep, AC4, región intergénica, en el caso de TYLCV también hibridan el gen V2 y en los bipartita hibridan en una pequeña región de CP (Fig. 28). Con lo que se impediría principalmente la repliación de los virus; ya que para su inicio Rep debe unirse a motivos iterados (iterones) ubicados en la región intergénica y realizar un corte en la secuencia conservada (Fontes *et al.*, 1994). Otra función que sería afectada es la unión de Rep al homólogo vegetal de la proteína retinoblastoma (Rb) para regular la progresión del ciclo celular, que altera el entorno de las células terminalmente diferenciadas para proporciona factores del hospedero que apoyan la replicación del ADN viral (Arguello-Astorga *et al.*, 2004).

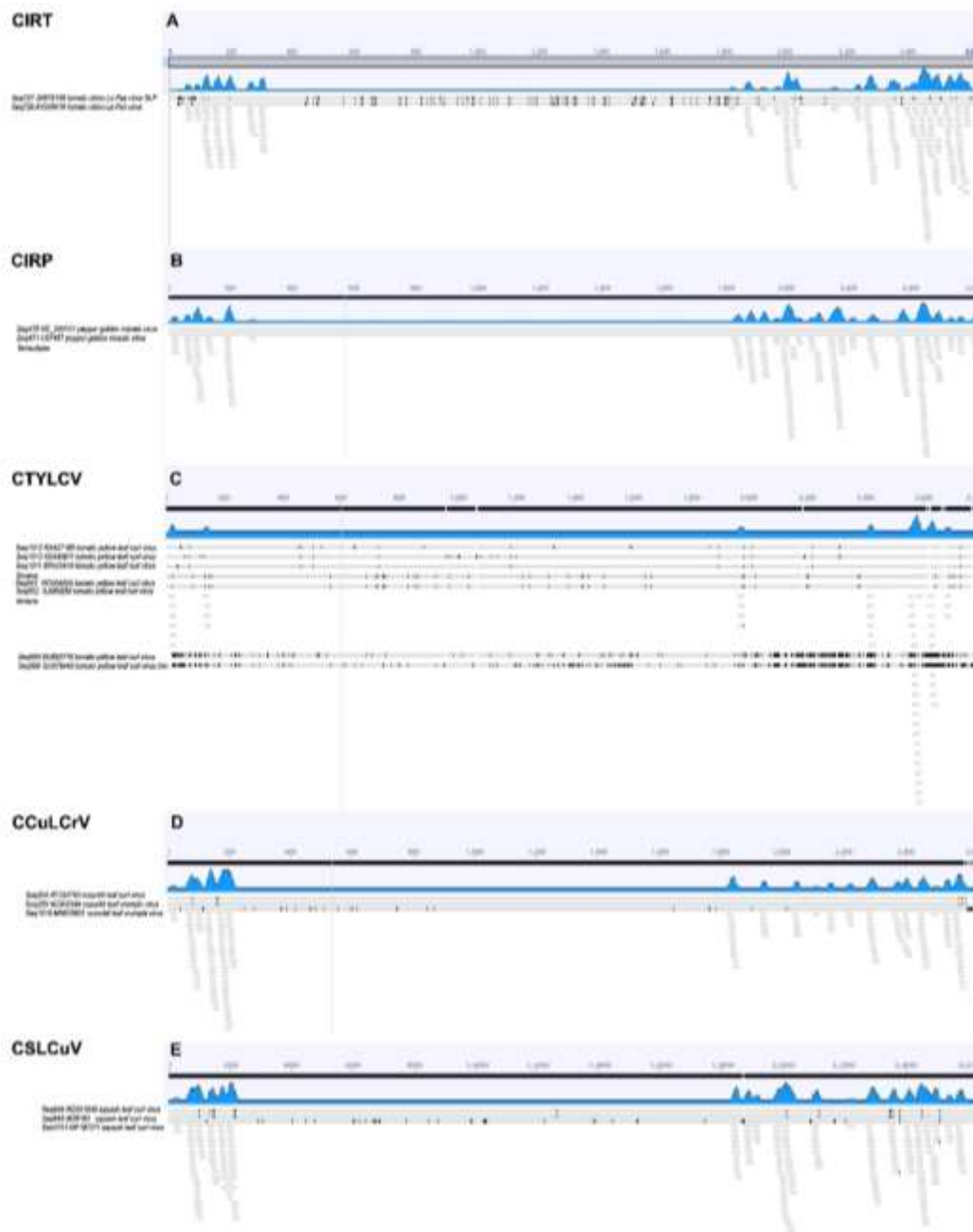


Figura 28. Regiones de genomas de begomovirus donde hibridan los siRNAs. De manera general se observa que los siRNAs reconocen regiones de la proteína Rep, AC4 y la región intergénica. **A.** Se observan las secuencias JN676150 y AY339619 de tomato chino La Paz virus reconocidas por siRNAs derivados de CIRT; **B.** Se presenta las secuencias NC_004101 y U57457 de pepper golden mosaic virus reconocidas por siRNAs derivados de CIRP; **C.** Se observan las secuencias KX427166, KX440611, EF523478, NC004005, AJ489258, EU635776 y GU076442 de tomato yellow leaf curl virus reconocidas por siRNAs derivados de CTYLCV; **D.** Se presentan las secuencias AF224760, NC002984 y MN625831 de cucurbit leaf crumple virus reconocidas por siRNAs derivados de CCuLCrV; **E.** Se observan las secuencias NC001936, M38183 y MF187211 de squash leaf curl virus reconocidas por siRNAs derivados de CSLCuV.

De igual forma en la activación del RNAi en una infección mixta, se observa que una gran cantidad de siRNAs flanquean con diferentes secuencias de los genomas de la misma especie (Fig. 28) de la que derivan (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007); y que también flanquean con secuencias de otras especies, es decir con secuencias heterólogas (Mubin *et al.*, 2011). En este caso los siRNAs hibridan las secuencias de los genomas en parte del gen Rep, AC4, región intergénica, en el caso de los monopartita hibridan el gen V2 y en los bipartita hibridan en una pequeña región de CP, lo que es consistente con las evidencias de disminución de carga viral, síntomas atenuados o menos severos y los componentes de RNAi activados en estudios que preceden estos resultados (Lin *et al.*, 2011; (Medina-Hernández *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2015; Vargas-Salinas *et al.*, 2021).

Las evidencias muestran que de los 238 siRNAs derivados del fragmento de ToChLPV, 237 (que equivalen al 99.5 %) produjeron 904 alineamientos significativos con 142 secuencias de la base de datos (Fig. 29A), todos ellos con alto porcentaje de identidad por pares ante el RNA mensajero diana (Ruiz-Ferrer y Voinnet, 2009), tanto de secuencias homólogas como heterólogas. Por otro lado, de los 209 siRNAs derivados del fragmento de PepGMV, 205 (el 98 %) produjeron 782 alineamientos significativos, con 73 secuencias de la base de datos (Fig. 29B), todos con alto porcentaje de identidad por pares de bases, evidencia de su efectividad ante secuencias homólogas y heterólogas (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007). Lo que también se observó en el análisis evolutivo realizado con las secuencias flanqueadas que muestran dos grandes ramas, una de ellas muestra un clúster donde se ubican las secuencias de PepGMV reportadas y en los otros clados se agrupan otros begomovirus monopartita y bipartita. Las evidencias mostraron la efectividad de la protección con el fragmento de TYLCV del que se obtuvieron 363 siRNAs, el 100 % hibridaron, y produjeron 4384 alineamientos significativos con 314 secuencias de la base de datos (Fig. 29C), tanto con secuencias homólogas como heterólogas (Kunik *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2011; Mubin *et al.*, 2011). Los datos obtenidos con el fragmento de CuLCrV mostraron que de los 225 siRNAs, 222 (el 98.6%) produjeron 1247 alineamientos significativos con 121 secuencias de la base de datos (Fig. 29D), tanto con secuencias homólogas como heterólogas (Chellappan *et al.*, 2004), evidencias que se observan, incluso en los datos del análisis evolutivo donde se presentan agrupadas las secuencias de PepGMV que representan las secuencias homólogas con las que hibridaron más de 150 siRNAs. Por otro lado, las evidencias muestran

que de los 250 siRNAs obtenidos del fragmento de SLCuV, 241 (el 96.4 %) produjeron 852 alineamientos significativos, con 84 secuencias de la base de datos (Fig. 29E), lo que muestra su eficiencia de protección (Taha *et al.*, 2016), tanto con especies cercanas como el melon chlorotic leaf curl virus, miembro del clado del squash, como con monopartitas como TYLCV.

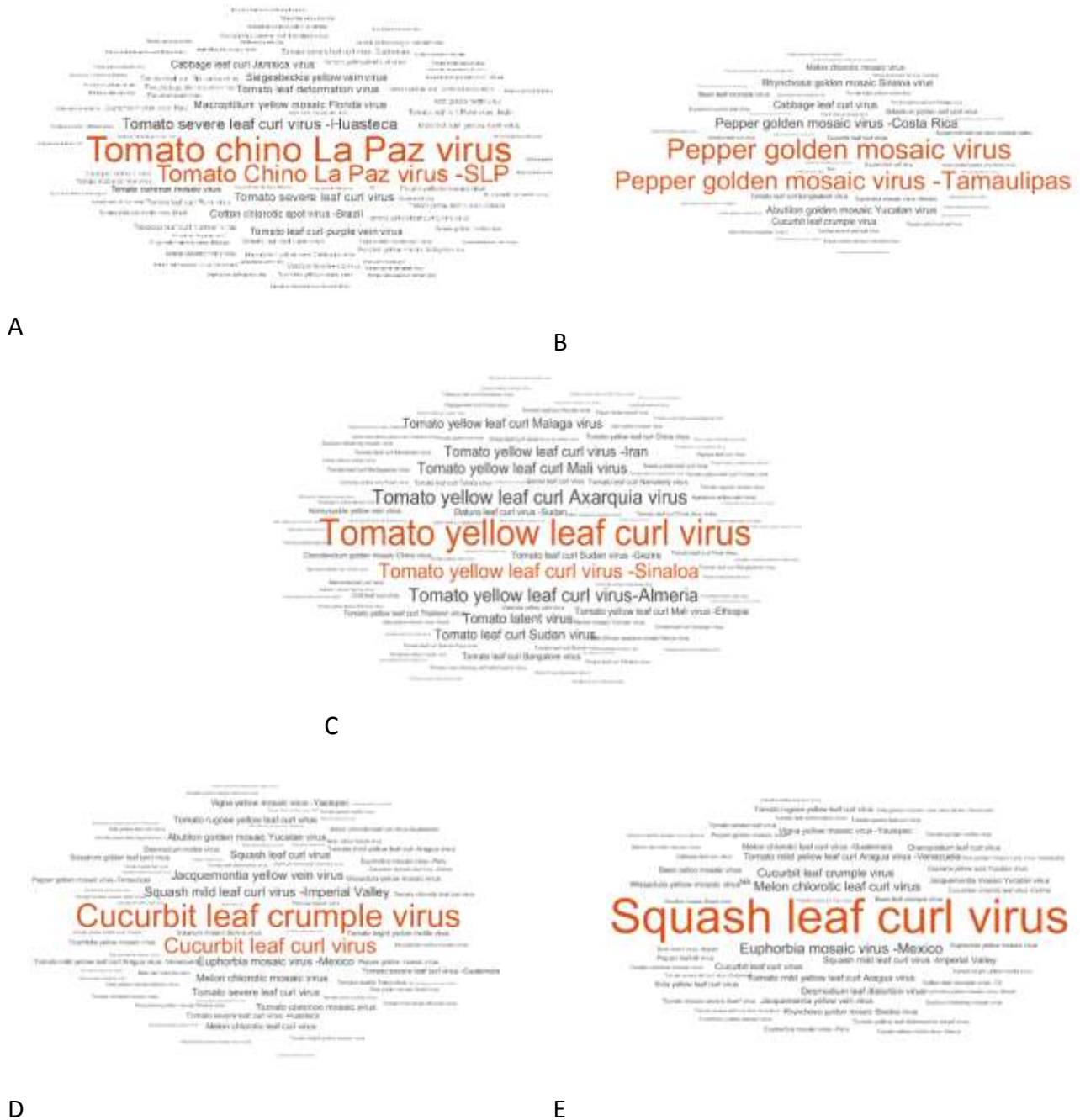


Figura 29. Gráfico de nubes de las especies de begomovirus con las que hibridaron los siRNAs derivados de los fragmentos de ToChLPV, PepGMV, TYLCV, CuLCrV y SLCuV. En A, B, C, D y E, se observa las secuencias (en color naranja) con las que hibridaron la mayor cantidad de siRNAs y las secuencias a las que hibridaron menos (en color gris); igualmente el tamaño de letra está

relacionado de mayor a menor con la cantidad de siRNAs que hibridaron. **A.** Secuencias reconocidas por siRNAs derivados de CIRT; **B.** Secuencias reconocidas por siRNAs derivados de CIRP; **C.** Secuencias reconocidas por siRNAs derivados de CTYLCV; **D.** Secuencias reconocidas por siRNAs derivados de CCuLCrV; **E.** Secuencias reconocidas por siRNAs derivados de CSLCuV.

La importancia de esta investigación radica en la evidencia que permite predecir la eficiencia de siRNAs que activan el mecanismo de silenciamiento génico para el control de varios begomovirus asociados a una enfermedad causada por infecciones sencilla y mixta. Es una alternativa para las enfermedades asociadas a los begomovirus de especies cercanas que han causado serias afectaciones, entre las que se encuentran el complejo de begomovirus que causan la enfermedad del mosaico de yuca, infecciones mixtas causadas por especies que pertenecen al mismo clado o enfermedades causadas por begomovirus monopartita y bipartita. Se observó que es posible utilizar el material genético de un begomovirus y activar el mecanismo de silenciamiento génico en las plantas para protegerlas incluso de otras especies dentro de este género.

9. CONCLUSIONES

- Se presenta la evidencia de que ToChLPV, TYLCV, SLCuV y CuLCrV, pueden encontrarse en las infecciones mixtas de manera natural como TYLCV/ToChLPV, TYLCV/SLCuV o SLCuV/CuLCrV, causando serias afectaciones a los cultivos de BCS. En el cultivo de tomate se determinó enfermedad asociada a la infección mixta TYLCV/SLCuV, y los cultivos de Cucurbitáceas se encuentran infectadas por SLCuV y CuLCrV en infección sencilla y mixta.
- El *Beet curly top virus*, del género *Curtovirus*, se reporta por primera vez en la Península de Baja California, infectando plantas de Chile.
- El sistema de protección con las construcciones CIRP y CIRT es eficiente porque ambas activan los componentes relacionados con el PTGS y TGS.
- El nivel de eficiencia en un sistema de protección que activa el RNAi, en una infección sencilla es mediada por el reconocimiento de las secuencias homólogas y heterólogas en las que se involucran los componentes que participan en diferentes rutas de silenciamiento.
- Mediante las plataformas en línea es factible obtener siRNAs, para realizar análisis de predicción de la activación del RNAi en infecciones sencillas y mixtas.
- Los siRNAs son eficientes en la activación del RNAi en las infecciones sencillas y mixtas. Los datos obtenidos en este estudio muestran con éxito la eficiencia de los siRNAs procedentes de las cinco especies de begomovirus que afectan los cultivos de hortalizas en BCS, para activar el mecanismo de protección ante las infecciones sencilla y mixta, por diferentes especies de begomovirus.

9.1 Perspectivas

- Se recomienda realizar estudios que permitan establecer estrategias de monitoreo continuo tanto de los begomovirus como de curtovirus en cultivos de Chile; hasta ahora se han encontrado por separado, sin embargo, considerando que comparten el área de distribución y los hospederos, es posible que puedan causar infección mixta, lo que conllevaría al incremento de pérdidas en la producción.

- En adición a este estudio es conveniente realizar la detección e identificación de los begomovirus, que afectan los cultivos de hortalizas de manera periódica, con la finalidad de asociar las pérdidas o daños que correspondan a estos patógenos.
- La identificación de los hospederos alternos, cercanos a las áreas de cultivo es importante, con la finalidad de establecer las medidas fitosanitarias correspondientes.
- El material genético de los begomovirus es idóneo para activar el mecanismo de silenciamiento génico y proteger a las plantas de las infecciones sencillas y mixtas. Sin embargo, aún queda por dilucidar una manera más sencilla y económica con la que pueda introducirse este material a las plantas.

10. LITERATURA CITADA

- Akad, F., Webb, S., Nyoike, T.W., Liburd, O.E., Turechek, W., Adkins, S. y Polston, J.E. (2008). Detection of Cucurbit leaf crumple virus in Florida cucurbits. *Plant Disease*, 92(4): 648.
- Al-Musa, A., Anfoka, G., Misbeh, S., Abhary, M. y Ahmad, F.H. (2008). Detection and molecular characterization of Squash leaf curl virus (SLCV) in Jordan. *Journal of Phytopathology*, 156(5): 311–316. doi: 10.1111/j.1439-0434.2007.01389.x.
- Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Hussein, E.Y., Mallah, O.B. y Abu-Zeitoun, S.Y. (2014a). Squash leaf curl virus (SLCV): a serious disease threatening cucurbits production in Palestine. *Virus Genes*, 48(2): 320–328. doi: 10.1007/s11262-013-1012-1.
- Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Mallah, O.B. y Abu-Zeitoun, S.Y. (2014b). Molecular characterization of Watermelon chlorotic stunt virus (WmCSV) from Palestine. *Viruses*, 6(6): 2444–2462. doi: 10.3390/v6062444.
- Allen, E.H.A., Atkinson, S.D., Liao, H., Moore, J.E., Pedrioli, D.M.L., Smith, F.J.D., McLean, W.H.I. y Moore, C.B.T. (2013). Allele-specific siRNA silencing for the common keratin 12 founder mutation in Meesmann epithelial corneal dystrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(1): 494–502.
- Alvarez, M.E., Nota, F. y Cambiagno, D.A. (2010). Epigenetic control of plant immunity. *Molecular Plant Pathology*, 11(4): 563–576. doi: 10.1111/j.1364-3703.2010.00621.x.
- Amin, I., Hussain, K., Akbergenov, R., Yadav, J.S., Qazi, J., Mansoor, S., Hohn, T., Fauquet, C.M. y Bridson, R.W. (2011). Suppressors of RNA silencing encoded by the components of the cotton leaf curl begomovirus-betasatellite complex. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(8): 973–983.
- Antignus, Y., Lachman, O., Pearlsman, M., Omer, S., Yunis, H., Messika, Y., Uko, O. y Koren, A. (2003). Squash leaf curl geminivirus—a new illegal immigrant from the western hemisphere and a threat to cucurbit crops in Israel. *Phytoparasitica*, 31(4): 415.
- Argüello-Astorga, G., Herrera-Estrella, L. y Rivera-Bustamante, R. (1994). Experimental and theoretical definition of geminivirus origin of replication. *Plant Molecular Biology*, 26(2): 553–556.
- Argüello-Astorga, G., Lopez-Ochoa, L., Kong, L.J., Orozco, B.M., Settlege, S.B. y Hanley-Bowdoin, L. (2004). A novel motif in geminivirus replication proteins interacts with the plant retinoblastoma-related protein. *Journal of Virology*, 78(9): 4817–4826.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Argüello-Astorga, G.R., Méndez-Lozano, J. y Rivera-Bustamante, R.F. (2002). First report of Rhynchosia golden mosaic virus (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, Mexico. *Plant Disease*, 86(6): 692. doi: 10.1094/PDIS.2002.86.6.692C.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Diaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Argüello-Astorga, G.R. y Rivera-Bustamante, R.F. (1999). First report of Tomato yellow leaf curl geminivirus in Yucatan, Mexico. *Plant Disease*, 83(12): 1178.
- Axtell, M.J., Jan, C., Rajagopalan, R. y Bartel, D.P. (2006). A two-hit trigger for siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 127(3): 565–577. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.032>.
- Baliji, S., Black, M.C., French, R., Stenger, D.C. y Sunter, G. (2004). Spinach curly top virus: a newly described Curtovirus species from southwest Texas with incongruent gene phylogenies. *Phytopathology*, 94(7): 772–779.
- Bisaro, D.M. (1996). Geminivirus DNA replication. *DNA Replication in Eukaryotic Cells*, 33: 833–854.

- Bombarely, A., Rosli, H.G., Vrebalov, J., Moffett, P., Mueller, L.A. y Martin, G.B. (2012). A draft genome sequence of *Nicotiana benthamiana* to enhance molecular plant-microbe biology research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(12): 1523–1530.
- Borges, F. y Martienssen, R.A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(12): 727–741.
- Briddon, R.W. y Markham, P.G. (2000). Cotton leaf curl virus disease. *Virus Research*, 71(1–2): 151–159.
- Brown, J., Baumann, K. y Idris, A. (2005). Characterization of Squash leaf curl and Squash mild leaf curl viruses: host range and reassortment for four SLCV clade viruses. *Phytopathology*, 95(6).
- Brown, J.K., Guerrero, J.C., Matheron, M., Olsen, M. y Idris, A.M. (2007). Widespread outbreak of Cucurbit yellow stunting disorder virus in melon, squash, and watermelon crops in the Sonoran Desert of Arizona and Sonora, Mexico. *Plant Disease*, 91(6): 773.
- Brown, J.K., Idris, A.M., Alteri, C. y Stenger, D.C. (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): 734–742. doi: 10.1094/PHYTO.2002.92.7.734.
- Brown, J.K., Idris, A.M., Olsen, M.W., Miller, M.E., Isakeit, T. y Anciso, J. (2000). Cucurbit leaf curl virus, a new whitefly transmitted geminivirus in Arizona, Texas, and Mexico. *Plant Disease*, 84(7): 809. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.7.809^a.
- Brown, J.K., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J.C.F., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R.W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V.G., Martin, D.P., Rivera-Bustamante, R., Ueda, S. y Varsani, A. (2015). Revision of begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of Virology*, 160(6): 1593–1619. doi: 10.1007/s00705-015-2398-y.
- Cardenas-Conejo, Y., Arguello-Astorga, G., Poghosyan, A., Hernandez-Gonzalez, J., Lebsky, V., Holguin-Peña, J., Medina-Hernandez, D. y Vega-Peña, S. (2010). Disease notes: First report of Tomato yellow leaf curl virus co-infecting pepper with Tomato chino La Paz virus in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease*, 94(10): 1266. doi: 10.1094/PDIS-06-10-0444.
- Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E. y Rivera-Bustamante, R.F. (2007). Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 97(1): 51–59.
- Chellappan, P., Masona, M.V., Vanitharani, R., Taylor, N.J. y Fauquet, C.M. (2004). Broad spectrum resistance to ssDNA viruses associated with transgene-induced gene silencing in Cassava. *Plant Molecular Biology*, 56(4): 601–611. doi: 10.1007/s11103-004-0147-9.
- Chen, H., Lin, C., Tsai, W., Kenyon, L., Chan, M., Yen, J., Chang, S., de la Peña, R. y Schafleitner, R. (2016). Resistance to viral yellow leaf curl in tomato through RNAi targeting two begomovirus species strains. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 25(2): 199–207. doi: 10.1007/s13562-015-0325-7.
- Chen, L.F., Vivoda, E. y Gilbertson, R.L. (2011). Genetic diversity in curtoviruses: a highly divergent strain of Beet mild curly top virus associated with an outbreak of curly top disease in pepper in Mexico. *Archives of Virology*, 156(4): 547–555.
- Cohen, S. (1983). Purification, serology, and vector relationships of Squash leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus. *Phytopathology* 73:1669.
- Cohen, S. y Nitzany, F.E. (1966). Transmission and host range of the Tomato yellow leaf curl

- virus. *Phytopathology*, 56(10).
- Cohen, S. y Nitzany, F.E. (1960). A whitefly transmitted virus of cucurbits in Israel. *Phytopathologia Mediterranea*, 1(1): 44–46. Disponible en: <http://www.jstor.org/stable/42683838>.
- Coil, D., Jospin, G. y Darling, A.E. (2015). A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, 31(4): 587–589.
- Conesa, A. y Götz, S. (2008). Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M. y Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18): 3674–3676.
- Czosnek, H., Ber, R., Antignus, Y., Cohen, S., Navot, N. y Zamir, D. (1988). Isolation of Tomato yellow leaf curl virus, a geminivirus. *Phytopathology*, 78(5): 508–512.
- De Barro, P.J., Liu, S.S., Boykin, L.M. y Dinsdale, A.B. (2011). Bemisia tabaci: a statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56: 1–19.
- Ding, S.W. (2010). RNA-based antiviral immunity. *Nature Reviews Immunology*, 10: 632. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nri2824>.
- Dong, Z., Han, M.H. y Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29): 9970–9975.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. En: *Molecular techniques in taxonomy* springer, pp 283–293.
- Dueñas, F., Martínez, Y., Moya, C. y Álvarez, M. (2006). Evaluación de genotipos de Lycopersicon esculentum Mill. Frente al virus del encrespamiento amarillo de la hoja del tomate (TYLCV). *Cultivos Tropicales*, 27(3): 63–68.
- Duffus, J. y Flock, R. (1982). Whitefly-transmitted disease complex of the desert southwest. *California Agriculture*, 36(11): 4–7.
- Eamens, A., Vaistij, F.E. y Jones, L. (2008). NRPD1a and NRPD1b are required to maintain post-transcriptional RNA silencing and RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 55(4): 596–606. doi: 10.1111/j.1365-3113.2008.03525.x.
- Farrag, A.A., El-Attar, A.K., El-Banna, O.H.M., Al, I. y Mazyad, H.M. (2014). Molecular and biological characterization of Squash leaf curl virus (SLCV) affecting common beans in Egypt. *Egyptian Journal of virology*, 11(2): 14–27.
- Fiallo-Olivé, E., Lett, J.M., Martin, D.P., Roumagnac, P., Varsani, A., Zerbini, F.M., Navas-Castillo, J. y Consortium, I.R. (2021). ICTV virus taxonomy profile: geminiviridae 2021. *The Journal of General Virology*, 102(12).
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. y Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806–811.
- Flock, R.A. y Mayhew, D.E. (1981). Squash leaf curl, a new disease of cucurbits in California. *Plant Disease*, 65(1): 75. doi: 10.1094/pd-65-75.
- Fonsah, E.G., Chen, Y., Diffie, S., Srinivansan, R. y Riley, D. (2019). Economic productivity and profitability analysis for whiteflies and Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) management options. *Journal of Food Distribution Research*, 50(856-2019-3203): 123–131.
- Fontenele, R.S., Bhaskara, A., Cobb, I.N., Majure, L.C., Salywon, A.M., Avalos-Calleros, J.A.,

- Argüello-Astorga, G.R., Schmidlin, K., Roumagnac, P. y Ribeiro, S.G. (2021). Identification of the begomoviruses Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus in various plant samples in North America. *Viruses*, 13(5): 810.
- Fontes, E.P., Gladfelter, H.J., Schaffer, R.L., Petty, I.T. y Hanley-Bowdoin, L. (1994). Geminivirus replication origins have a modular organization. *The Plant Cell*, 6(3): 405–416.
- Franceschini, A., Szklarczyk, D., Frankild, S., Kuhn, M., Simonovic, M., Roth, A., Lin, J., Minguez, P., Bork, P. y Von Mering, C. (2012). STRING v9. 1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. *Nucleic Acids Research*, 41(D1): D808–D815.
- Gómez-Jiménez, C., Romero-Romero, J.L., Santos-Cervantes, M.E., Leyva-Lopez, N.E. y Mendez-Lozano, J. (2009). Tomatillo (*Physalis ixocarpa*) as a natural new host for Tomato yellow leaf curl virus in Sinaloa, Mexico. *Plant Disease*, 93(5): 545.
- García-Arenal, F. y Zerbini, F.M. (2019). Life on the Edge: Geminiviruses at the interface between crops and wild plant hosts. *Annual Review of Virology*, 6.
- García-Brunton, J., Pérez-Tornero, O., Cos-Terrer, J.E., Ruíz-García, L. y Sánchez-López, E. (2018). Actas de Horticultura N° 80. Comun Técnicas Soc Española Ciencias Hortícolas.
- Ghoshal, B. y Sanfaçon, H. (2014). Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with Tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology*, 456–457: 188–197. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.03.026>.
- Gonzalez-Alegre, P. (2007). Therapeutic RNA interference for neurodegenerative diseases: From promise to progress. *Pharmacology & Therapeutics*, 114(1): 34–55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.01.003>.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A. y Lommel, S.A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: its history and future as a model for plant–pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(8): 1015–1026.
- Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Williams, T.D., Nagaraj, S.H., Nueda, M.J., Robles, M., Talón, M., Dopazo, J. y Conesa, A. (2008). High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research*, 36(10): 3420–3435.
- Guzman, P., Sudarshana, M.R., Seo, Y.S., Rojas, M.R., Natwick, E., Turini, T., Mayberry, K. y Gilbertson, R.L. (2000). A new bipartite Geminivirus (Begomovirus) causing leaf curl and crumpling in cucurbits in the Imperial Valley of California. *Plant Disease*, 84(4): 488. doi: 10.1094/PDIS.2000.84.4.488C.
- Hagen, C., Rojas, M.R., Sudarshana, M.R., Xoconostle-Cazares, B., Natwick, E.T., Turini, T.A. y Gilbertson, R.L. (2008). Biology and molecular characterization of Cucurbit leaf crumple virus, an emergent cucurbit-infecting Begomovirus in the Imperial Valley of California. *Plant Disease*, 92(5): 781–793. doi: 10.1094/PDIS-92-5-0781.
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E.R., Robertson, D. y Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11): 777–788. doi: 10.1038/nrmicro3117.
- Hernandez-Pinzon, I., Yelina, N.E., Schwach, F., Studholme, D.J., Baulcombe, D. y Dalmay, T. (2007). SDE5, the putative homologue of a human mRNA export factor, is required for transgene silencing and accumulation of trans-acting endogenous siRNA. *The Plant Journal*, 50(1): 140–148.
- Holen, T. (2006). Efficient prediction of siRNAs with siRNARules 1.0: an open-source JAVA approach to siRNA algorithms. *Rna*, 12(9): 1620–1625.

- Holguín-Peña, R.J., Arguello-Astorga, G.R., Brown, J.K. y Rivera-Bustamante, R.F. (2006). A new strain of Tomato chino La Paz virus associated with a leaf curl disease of tomato in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease*, 90(7): 973–973. doi: 10.1094/pd-90-0973b.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H. y Wilson, C. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7(7): 301–308.
- Idris, A., Al-Saleh, M., Piatek, M.J., Al-Shahwan, I., Ali, S. y Brown, J.K. (2014). Viral metagenomics: analysis of begomoviruses by illumina high-throughput sequencing. *Viruses*. doi: 10.3390/v6031219.
- Idris, A.M., Guerrero, J.C. y Brown, J.K. (2007). Two distinct isolates of Tomato yellow leaf curl virus threaten tomato production in Arizona and Sonora, Mexico. *Plant disease*, 91(7): 910.
- Illumina Inc. (2016). Nextera® XT library prep reference guide. Illumina 1–28.
- Isakeit, T., Idris, A.M., Sunter, G., Black, M.C. y Brown, J.K. (2007). Tomato yellow leaf curl virus in tomato in Texas, originating from transplant facilities. *Plant Disease*, 91(4): 466.
- Johne, R., Müller, H., Rector, A., Van Ranst, M. y Stevens, H. (2009). Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends in Microbiology*, 17(5): 205–211.
- Jones, R.A.C. (2020). Disease pandemics and major epidemics arising from new encounters between indigenous viruses and introduced crops. *Viruses*, 12(12): 1388.
- Keinath, A.P., Ling, K.S., Adkins, S., Hasegawa, D.K., Simmons, A.M., Hoak, S., Mellinger, H.C. y Kousik, C.S. (2018). First report of Cucurbit leaf crumple virus infecting three cucurbit crops in South Carolina. *Plant Health Progress*, 19(4): 322–323.
- Khan, A.J., Al-Saady, N.A., Al-Mahruki, M.S., Al-Oufi, M. y Al-Subhi, A.M. (2007). Molecular characterization of begomovirus infecting sweet pepper in Oman. *Indian Journal of Biotechnology*, 6(1): 45–51.
- Kim, H., Shimura, H. y Masuta, C. (2019). Advancing toward commercial application of RNA silencing-based strategies to protect plants from viral diseases. *Journal of General Plant Pathology*, : 1–8.
- Klepikova, A.V., Kasianov, A.S., Gerasimov, E.S., Logacheva, M.D. y Penin, A.A. (2016). A high resolution map of the Arabidopsis thaliana developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. *The Plant Journal*, 88(6): 1058–1070.
- Kontra, L., Csorba, T., Tavazza, M., Lucioli, A., Tavazza, R., Moxon, S., Tisza, V., Medzihradzsky, A., Turina, M. y Burgyán, J. (2016). Distinct effects of p19 RNA silencing suppressor on small RNA mediated pathways in plants. *PLoS pathogens*, 12(10): e1005935.
- Kotakis, C., Vrettos, N., Daskalaki, M.G., Kotzabasis, K. y Kalantidis, K. (2011). DCL3 and DCL4 are likely involved in the light intensity - RNA silencing cross talk in Nicotiana benthamiana. *Plant Signaling & Behavior*, 6(8): 1180–1182. doi: 10.4161/psb.6.8.15689.
- Kourelis, J., Kaschani, F., Grosse-Holz, F.M., Homma, F., Kaiser, M. y van der Hoorn, RAL. (2018). Re-annotated Nicotiana benthamiana gene models for enhanced proteomics and reverse genetics. *BioRxiv*, : 373506.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Niyaz, C. y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol*. doi: 10.1093/molbev/msy096.
- Kunik, T., Salomon, R., Zamir, D., Navot, N., Zeidan, M., Michelson, I., Gafni, Y. y Czosnek, H. (1994). Transgenic tomato plants expressing the Tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus. *Bio/Technology*, 12(5): 500–504.
- Kuo, Y.W., Rojas, M.R., Gilbertson, R.L. y Wintermantel, W.M. (2007). First report of Cucurbit

- yellow stunting disorder virus in California and Arizona, in association with Cucurbit leaf crumple virus and Squash leaf curl virus. *Plant Disease*, 91(3): 330. doi: 10.1094/PDIS-91-3-0330B.
- Landeo-Ríos, Y., Navas-Castillo, J., Moriones, E. y Cañizares, M.C. (2017). Supresión viral del silenciamiento por RNA en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(2): 181–198. doi: 10.35196/rfm.2017.2.181-197.
- Lapidot, M. (2002). Screening common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance to Tomato yellow leaf curl virus. *Plant Disease*, 86(4): 429–432.
- Lapidot, M., Friedmann, M., Pilowsky, M., Ben-Joseph, R. y Cohen, S. (2001). Effect of host plant resistance to Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) on virus acquisition and transmission by its whitefly vector. *Phytopathology*, 91(12): 1209–1213.
- Lapidot, M., Gelbart, D., Gal-On, A., Sela, N., Anfoka, G., Ahmed, F.H., Abou-Jawada, Y., Sobh, H., Mazyad, H., Aboul-Ata, A.A.E., El-Attar, A.K., Ali-Shtayeh, M.S., Jamous, R.M., Polston, J.E. y Duffy, S. (2014). Frequent migration of introduced cucurbit-infecting begomoviruses among Middle Eastern countries. *Virology Journal*, 11(1): 181. doi: 10.1186/1743-422X-11-181.
- Lazarowitz, S.G. (1991). Molecular characterization of two bipartite geminiviruses disease : role of viral replication and movement functions causing squash leaf curl in determining host range. *Virology*, 180(1): 70–80. doi: 10.1016/0042-6822(91)90010-9.
- Lazarowitz, S.G. y Beachy, R.N. (1999). Viral movement proteins as probes for intracellular and intercellular trafficking in plants. *The Plant Cell*, 11(4): 535–548.
- Lazarowitz, S.G. y Shepherd, R.J. (1992). Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11(4): 327–349.
- Lebsky, V., Hernandez-Gonzalez, J., Arguello-Astorga, G., Cardenas-Conejo, Y., Poghosyan, A., Bertaccini, A. y Maini, S. (2011). Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico. *Bulletin of Insectology*, 64(Suppl): S55–S56
- Legg, J.P., Owor, B., Sseruwagi, P. y Ndunguru, J. (2006). Cassava mosaic virus disease in East and Central Africa: epidemiology and management of a regional pandemic. *Advances in Virus Research*, 67: 355–418.
- Li, D., Liu, C.M., Luo, R., Sadakane, K. y Lam, T.W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10): 1674–1676.
- Li, F. y Wang, A. (2018). RNA decay is an antiviral defense in plants that is counteracted by viral RNA silencing suppressors. *PLoS Pathogens*, 14(8): e1007228.
- Li, F., Wang, Y. y Zhou, X. (2017). SGS3 cooperates with RDR6 in triggering geminivirus-induced gene silencing and in suppressing geminivirus infection in *Nicotiana benthamiana*. *Viruses*, 9(9): 247.
- Lin, C.Y., Ku, H.M., Tsai, W.S., Green, S.K. y Jan, F.J. (2011). Resistance to a DNA and a RNA virus in transgenic plants by using a single chimeric transgene construct. *Transgenic Research*, 20(2): 261–270. doi: 10.1007/s11248-010-9412-7.
- Liu, D., Shi, L., Han, C., Yu, J., Li, D. y Zhang, Y. (2012). Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLoS One*, 7(9): e46451.
- Livak, K.J. y Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4): 402–408.

- Lohse, M., Bolger, A.M., Nagel, A., Fernie, A.R., Lunn, J.E., Stitt, M. y Usadel, B. (2012). R obi NA: A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Research*, 40(W1): W622–W627.
- López-López, K., Mora, D.M.R. y Vaca, J.C.V. (2013). Optimización de las condiciones de inoculación por biobalística de un begomovirus en tomate y tabaco. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2): 8–17.
- López De Heredia Larrea, U. (2016). Las técnicas de secuenciación masiva en el estudio de la diversidad biológica. *Munibe Ciencias Naturales*, 64: 7–31.
- Lozano, G., Trenado, H.P., Fiallo-Olivé, E., Chirinos, D., Geraud-Pouey, F., Briddon, R.W. y Navas-Castillo, J. (2016). Characterization of non-coding DNA satellites associated with sweepoviruses (genus Begomovirus, Geminiviridae)—definition of a distinct class of begomovirus-associated satellites. *Frontiers in Microbiology*, 7: 162.
- Lugo Melchor, O.Y., Guzmán Uriarte, R., García Estrada, R.S. y León Félix, J. (2011). Geminivirus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en tomate, en el valle agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(2): 109–118.
- Madden, T. (2003). The BLAST sequence analysis tool. NCBI Handb.
- Mardis, E.R. (2008). Next-generation DNA sequencing methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9(1): 387–402.
- Matzke, M.A. y Mosher, R.A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, 15: 394 Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrg3683>.
- Mauricio-Castillo, J.A., Reveles-Torres, L.R., Mena-Covarrubias, J., Argüello-Astorga, G.R., Creamer, R., Franco-Bañuelos, A. y Salas-Muñoz, S. (2017). First report of Beet curly top virus-PeYD associated with a new disease in chile pepper plants in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease*, 101(3): 513.
- McGlashan, D., Polston, J.E. y Bois, D. (1994). Tomato yellow leaf curl geminivirus in Jamaica. *Plant Disease*, 78(12).
- Medina-Hernández, D., Caamal-Chan, M.G., Vargas-Salinas, M., Loera-Muro, A., Barraza, A. y Holguín-Peña, R.J. (2019). Molecular characterization and phylogenetic analysis of a Squash leaf curl virus isolate from Baja California Sur, Mexico. *PeerJ*, 7. doi: 10.7717/peerj.6774.
- Medina-Hernández, D., Rivera-Bustamante, R., Tenllado, F. y Holguín-Peña, R. (2013). Effects and effectiveness of two RNAi constructs for resistance to Pepper golden mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* plants. *Viruses*, 5(12): 2931–2945.
- Mendez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C.M. y Rivera-Bustamante, R.F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 93(3): 270–277.
- Meng, X. y Zhang, S. (2013). MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology*, 51: 245–266.
- Morales, F.J. (2011). Interaction between *Bemisia tabaci*, begomoviruses, and plant species in Latin America and the Caribbean. En: The whitefly, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) interaction with Geminivirus-infected host plants Springer, pp 15–49.
- Movahedi, A., Zhang, J., Sun, W., Kadkhodaei, S., Mohammadi, K., Almasizadehyaghuti, A., Yin, T. y Zhuge, Q. (2018). Plant small RNAs: definition, classification and response against stresses. *Biologia*, 73(3): 285–294. doi: 10.2478/s11756-018-0034-5.
- Mubin, M., Hussain, M., Briddon, R.W. y Mansoor, S. (2011). Selection of target sequences as

- well as sequence identity determine the outcome of RNAi approach for resistance against cotton leaf curl geminivirus complex. *Virology journal*, 8(1): 122.
- Naito, Y., Yoshimura, J., Morishita, S. y Ui-Tei, K. (2009). siDirect 2.0: updated software for designing functional siRNA with reduced seed-dependent off-target effect. *BMC Bioinformatics*, 10(1): 1–8.
- Nakasugi, K., Crowhurst, R.N., Bally, J., Wood, C.C., Hellens, R.P. y Waterhouse, P.M. (2013). De novo transcriptome sequence assembly and analysis of RNA silencing genes of *Nicotiana benthamiana*. *PLoS One*, 8(3): e59534. doi: 10.1371/journal.pone.0059534.
- Napoli, C., Lemieux, C. y Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell*, 2(4): 279–289.
- Noris, E., Accotto, G.P., Tavazza, R., Brunetti, A., Crespi, S. y Tavazza, M. (1996). Resistance to tomato yellow leaf curl Geminivirus in *Nicotiana benthamiana* plants transformed with a truncated viral C1 gene. *Virology*, 224(1): 130–138.
- Odokonyero, D., Mendoza, M.R., Moffett, P. y Scholthof, H.B. (2017). Tobacco rattle virus (TRV)-mediated silencing of *Nicotiana benthamiana* ARGONAUTES (NbAGOs) reveals new antiviral candidates and dominant effects of TRV-NbAGO1. *Phytopathology*, 107(8): 977–987. doi: 10.1094/PHYTO-02-17-0049-R.
- Pan, W.J., Chen, C.W. y Chu, Y.W. (2011). siPRED: predicting siRNA efficacy using various characteristic methods. *PLoS One*, 6(11): e27602.
- Paudel, D.B., Ghoshal, B., Jossey, S., Ludman, M., Fatyol, K. y Sanfaçon, H. (2018). Expression and antiviral function of ARGONAUTE 2 in *Nicotiana benthamiana* plants infected with two isolates of tomato ringspot virus with varying degrees of virulence. *Virology*, 524: 127–139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.08.016>.
- Peng, Y., Leung, H.C.M., Yiu, S.M. y Chin, F.Y.L. (2012). IDBA-UD: a de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. *Bioinformatics*, 28(11): 1420–1428.
- Polston, J.E. y Anderson, P.K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Disease*, 81(12): 1358–1369.
- Qin, C., Li, B., Fan, Y., Zhang, X., Yu, Z., Ryabov, E., Zhao, M., Wang, H., Shi, N., Zhang, P., Jackson, S., Tör, M., Cheng, Q., Liu, Y., Gallusci, P. y Hong, Y. (2017). Roles of dicer-like proteins 2 and 4 in intra- and intercellular antiviral silencing. *Plant Physiology*, 174(2): 1067. doi: 10.1104/pp.17.00475.
- Qu, F., Ye, X., Hou, G., Sato, S., Clemente, T.E. y Morris, T.J. (2005). RDR6 has a broad-spectrum but temperature-dependent antiviral defense role in; *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Virology*, 79(24): 15209. doi: 10.1128/JVI.79.24.15209-15217.2005.
- Quiñones, M.L., Vega, A., Martínez, Y. y Rodríguez, E. (2007). Estrategias de ingeniería genética para la obtención de plantas transgénicas resistentes a Geminivirus. Experiencia del Censa. *Revista de Protección Vegetal*, 22(2): 69–79.
- Raja, P., Wolf, J.N. y Bisaro, D.M. (2010). RNA silencing directed against geminiviruses: post-transcriptional and epigenetic components. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1799(3–4): 337–351.
- Ramesh, S.V., Chouhan, B.S. y Ramteke, R. (2017). Molecular detection of begomovirus (family: Geminiviridae) infecting glycine max (L.) Merr. and associated weed *Vigna trilobata*. *Journal of Crop and Weed*, 13(2): 64–67.

- Rasool, G., Yousaf, S., Amin, I., Mansoor, S. y Saeed, M. (2016). Transient expression of synthetic coat protein gene of Cotton leaf curl Burewala virus in tobacco (*Nicotiana benthamiana*). *Journal of Agricultural Research*, 54(1): 21–34.
- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R. y Rivera-Bustamante, R.F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal*, 8(1): 1–14.
- Reveles Torres, L.R., Velásquez Valle, R., Mauricio Castillo, J.A. y Salas Muñoz, S. (2012). Detección de infecciones mixtas causadas por Begomovirus y Curtovirus en plantas de Chile para secado en San Luis Potosí, México. (Spanish). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30(2): 155–160 Disponible en: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=fua&AN=96239397&lang=es&site=ehost-live>.
- Robinson, K.E., Worrall, E.A. y Mitter, N. (2014). Double stranded RNA expression and its topical application for non-transgenic resistance to plant viruses. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23(3): 231–237.
- Rodríguez-Negrete, E.A., Jordan-Ramírez, R., Leyva-López, N.E. y Méndez-Lozano, J. (2021). Cucurbit leaf crumple virus associated to watermelon disease in Campeche state, Mexico. *Plant Disease*, 105(4): 1235.
- Rojas, A., Kvarnheden, A., Marcenaro, D. y Valkonen, J.P.T. (2005). Sequence characterization of Tomato leaf curl Sinaloa virus and Tomato severe leaf curl virus: phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Archives of Virology*, 150(7): 1281–1299.
- Rojas, M.R., Gilbertson, R.L. y Maxwell, D.P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Disease*, 77(4): 340–347.
- Rojas, M.R., Kon, T., Natwick, E.T., Polston, J.E., Akad, F. y Gilbertson, R.L. (2007). First report of Tomato yellow leaf curl virus associated with tomato yellow leaf curl disease in California. *Plant Disease*, 91(8): 1056.
- Ruiz-Ferrer, V. y Voinnet, O. (2009). Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annual Review of Plant Biology*, 60: 485–510.
- Salma, A. (2006). Las cucurbitáceas. Importancia económica, bioquímica y medicinal. Universidad Nacional de Colombia. ISBN: 9587751647
- Sanford, J.C. y Johnston, S.A. (1985). The concept of parasite-derived resistance—deriving resistance genes from the parasite’s own genome. *Journal of Theoretical Biology*, 113(2): 395–405.
- Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T. y Nishimura, T. (2012). DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant and Cell Physiology*, 53(5): 766–784.
- Schaffer, A.A. y Paris, H.S. (2003). Melons, squashes, and gourds. En: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Academic Press, Oxford, 3817–3826.
- Schloss, J.A. (2008). How to get genomes at one ten-thousandth the cost. *Nature Biotechnology*, 26(10): 1113–1115.
- Seal, S.E., VandenBosch, F. y Jeger, M.J. (2006). Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(1): 23–46.
- Sharma, V.K., Basu, S. y Chakraborty, S. (2015). RNAi mediated broad-spectrum transgenic

- resistance in *Nicotiana benthamiana* to chilli-infecting begomoviruses. *Plant Cell Reports*, 34(8): 1389–1399.
- Shepherd, D.N., Martin, D.P., Van der Walt, E., Dent, K., Varsani, A. y Rybicki, E.P. (2010). Maize streak virus: an old and complex 'emerging' pathogen. *Molecular Plant Pathology*, 11(1): 1–12.
- SIAP. En: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. [consulta: 10 febrero 2023].
- Simpson, J.T. y Durbin, R. (2012). Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures. *Genome Research*, 22(3): 549–556.
- Sobh, H., Samsatly, J., Jawhari, M., Najjar, C., Haidar, A. y Abou-Jawdah, Y. (2012). First report of Squash leaf curl virus in cucurbits in Lebanon. *Plant Disease*, 96(8): 1231–1231. doi: 10.1094/PDIS-04-12-0365-PDN.
- Stenger, D.C., Duffus, J.E. y Villalon, B. (1990). Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Pathogenesis*, 14: 18.
- Sufrin-Ringwald, T. y Lapidot, M. (2011). Characterization of a synergistic interaction between two cucurbit-infecting begomoviruses: Squash leaf curl virus and Watermelon chlorotic stunt virus. *Phytopathology*, 101(2): 281–289. doi: 10.1094/PHYTO-06-10-0159
- Szklarczyk, D., Morris, J.H., Cook, H., Kuhn, M., Wyder, S., Simonovic, M., Santos, A., Doncheva, N.T., Roth, A., Bork, P., Jensen, L.J. y von Mering, C. (2016). The STRING database in 2017: quality-controlled protein–protein association networks, made broadly accessible. *Nucleic Acids Research*, 45(D1): D362–D368. doi: 10.1093/nar/gkw937.
- Taha, O., Farouk, I., Abdallah, A. y Abdallah, N.A. (2016). Use of posttranscription gene silencing in squash to induce resistance against the Egyptian isolate of the Squash leaf curl virus. *International Journal of Genomics*, 2016.
- Tamura, K. y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3): 512–526.
- Tamura, K., Stecher, G. y Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7): 3022–3027.
- Tenllado, F. y Díaz-Ruíz, J.R. (2001). Double-stranded RNA-mediated interference with plant virus infection. *Journal of Virology*, 75(24): 12288–12297.
- Tenllado, F., Llave, C. y Díaz-Ruíz, J.R. (2004). RNA interference as a new biotechnological tool for the control of virus diseases in plants. *Virus Research*, 102(1): 85–96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.01.019>.
- Tritt, A., Eisen, J.A., Facciotti, M.T. y Darling, A.E. (2012). An integrated pipeline for de novo assembly of microbial genomes. *PLoS ONE*, 7(9). doi: 10.1371/journal.pone.0042304.
- Uribe, R. (2018). Fisiopatología. La ciencia del porque y el como. Elsevier Health Sciences. ISBN: 9788490229347.
- van der Vlugt, R.A.A., Ruiter, R.K. y Goldbach, R. (1992). Evidence for sense RNA-mediated protection to PVY N in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Molecular Biology*, 20(4): 631–639.
- Van Dijk, E.L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y. y Thermes, C. (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics*, 30(9): 418–426.
- Vargas-Salinas, M., Medina-Hernández, D., Aranda-López, O., Hernández-Barrera, R. y Holguín-Peña, R.J. (2020). Occurrence and geographic distribution of Squash leaf curl virus in the Baja California Peninsula, Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 42(1): 107–115. doi:

10.1080/07060661.2019.1631215.

- Vargas-Salinas, M., Medina-Hernández, D., Arcos-Ortega, G.F., Luis-Villaseñor, I.E. y Holguín-Peña, R.J. (2021). RNAi activation with homologous and heterologous sequences that induce resistance against the begomovirus Pepper golden mosaic virus (PepGMV). *3 Biotech*, 11(3). doi: 10.1007/s13205-021-02653-7.
- Varma, A. y Malathi, V.G. (2003). Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142(2): 145–164. doi: 10.1111/j.1744-7348.2003.tb00240.x.
- Varsani, A., Martin, D.P., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Murilo Zerbini, F. y Brown, J.K. (2014). Revisiting the classification of curtoviruses based on genome-wide pairwise identity. *Archives of Virology*, 159(7): 1873–1882. doi: 10.1007/s00705-014-1982-x.
- Varsani, A., Martin, D.P., Randles, J.W., Vetten, H.J., Thomas, J.E., Fiallo-Olivé, E., Navas-Castillo, J., Lett, J.M., Zerbini, F.M. y Roumagnac, P. (2021). Taxonomy update for the family Alphasatellitidae: new subfamily, genera, and species. *Archives of virology*, 166(12): 3503–3511.
- Vazquez, F. y Hohn, T. (2013). Biogenesis and biological activity of secondary siRNAs in plants. *Scientifica*, 2013.
- Velásquez-Valle, R., Medina-Aguilar, M.M. y Creamer, R. (2008). First report of Beet mild curly top virus infection of chile pepper in north-central Mexico. *Plant Disease*, 92(4): 650.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L.R. y Reveles-Hernández, M. (2013). Manejo de las principales enfermedades del chile para secado en el norte centro de México. *Centro de Investigación Regional Norte Centro*, 50: 65 Disponible en: <http://zacatecas.inifap.gob.mx/publicaciones/EnfChilS.pdf>.
- Wang, M.B. y Metzlaff, M. (2005). RNA silencing and antiviral defense in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2): 216–222.
- Wang, M. y Jin, H. (2017). Spray-induced gene silencing: a powerful innovative strategy for crop protection. *Trends in Microbiology*, 25(1): 4–6.
- Wang, X.B., Jovel, J., Udornporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.X., Gascioli, V., Vaucheret, H. y Ding, S.W. (2011). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 23(4): 1625–1638. doi: 10.1105/tpc.110.082305.
- Wu, C., Li, X., Guo, S. y Wong, S.M. (2016). Analyses of RNA-seq and sRNA-seq data reveal a complex network of anti-viral defense in TCV-infected *Arabidopsis thaliana*. *Scientific Reports*, 6: 36007.
- Wu, W.Q., Fan, H.Y., Jiang, N., Wang, Y., Zhang, Z.Y., Zhang, Y.L., Wang, X.B., Li, D.W., Yu, J.L. y Han, C.G. (2014). Infection of Beet necrotic yellow vein virus with RNA4-encoded P31 specifically up-regulates pathogenesis-related protein 10 in *Nicotiana benthamiana*. *Virology Journal*, 11(1): 118.
- Wyatt, S.D. y Brown, J.K. (1996). Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86(12): 1288–1293.
- Xie, M., Ren, G., Costa-Nunes, P., Pontes, O. y Yu, B. (2012). A subgroup of SGS3-like proteins act redundantly in RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 40(10): 4422–4431.
- Xu, X., Qian, Y., Wang, Y., Li, Z. y Zhou, X. (2019). Iterons homologous to helper geminiviruses are essential for efficient replication of betasatellites. *Journal of Virology*, 93(5): e01532-18.

- Yang, Y., Sherwood, T.A., Patte, C.P., Hiebert, E. y Polston, J.E. (2004). Use of Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) Rep gene sequences to engineer TYLCV resistance in tomato. *Phytopathology*, 94(5): 490–496.
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M.Y. y Poethig, R.S. (2005). A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & development*, 19(18): 2164–2175.
- Yousaf, S., Rasool, G., Amin, I., Mansoor, S. y Saeed, M. (2015). Evaluation of the resistance against begomoviruses imparted by the single-stranded DNA binding protein VirE2. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 52: 887–893.
- Zamir, D., Ekstein-Michelson, I., Zakay, Y., Navot, N., Zeidan, M., Sarfatti, M., Eshed, Y., Harel, E., Pleban, T. y Van-Oss, H. (1994). Mapping and introgression of a Tomato yellow leaf curl virus tolerance gene, Ty-1. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(2): 141–146.
- Zerbini, F.M., Briddon, R.W., Idris, A., Martin, D.P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A. y Consortium, I.R. (2017). ICTV virus taxonomy profile: Geminiviridae. *Journal of General Virology*, 98(2): 131–133. Disponible en: <http://jgv.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000738>.
- Zhang, X., Lai, T., Zhang, P., Zhang, X., Yuan, C., Jin, Z., Li, H., Yu, Z., Qin, C., Tör, M., Ma, P., Cheng, Q. y Hong, Y. (2019). Mini review: revisiting mobile RNA silencing in plants. *Plant Science*, 278: 113–117. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.10.025>.
- Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong, X., Xu, Y., Zhu, P., Shen, Y., Wu, H., Ji, Y. y Wen, X. (2015). Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in Arabidopsis. *Science*, 348(6230): 120–123.
- Zhou, X. (2013). Advances in understanding begomovirus satellites. *Annual Review of Phytopathology*, 51(1): 357–381. doi: 10.1146/annurev-phyto-082712-102234.

11. ANEXOS

ANEXO A: Extracción de ADN (Método CTAB)

Reactivos:

Buffer CTAB 2X: 10 g CTAB, 50 mL 1 M Tris HCl, pH8 (75 mM), 20 mL 0.05 M EDTA, pH 8.0 (100 mM), 140 mL NaCl (5 M) y 290 mL H₂O.

Buffer TE, pH 8.0: 2.5 mL 1 M Tris HCl, (10 mM), 0.5 mL 0.5 M EDTA, (1 mM) y 250 mL H₂O.

25:24:1 Fenol: Cloroformo: Alcohol Isoamílico. (Sigma)

24:1 Cloroformo: Alcohol Isoamílico. (Sigma)

Acetato de Amonio 7.5 M (-20°C). (Sigma)

CTAB. (Sigma)

0.5 M EDTA, pH 8.0. (GibcoBRL)

Etanol

NaCl. (Sigma)

2 β-mercaptoetanol. (BioRad, Hercules, CA, USA)

10 mg/mL RNAsa A. (Roche)

Isopropanol (-20°C). (EM Science)

1 M Tris HCl pH 8.0 (Sigma)

Proteinasas K. (Roche)

Procedimiento:

1. Colocar 50 mg de tejido vegetal en un mortero y pulverizar con ayuda de nitrógeno líquido. Transferir a un tubo Eppendorf. Añadir 500 µL de Buffer CTAB, 10 µL de mercaptoetanol 1.5 µL de proteinasas K.

2. Agitar e incubar en baño María a 55 °C por 60 minutos.

3. Añadir 1.5 µL RNAsa, agitar e incubar a 37 °C por 15 minutos.

4. Añadir 500 µL de cloroformo alcohol isoamílico.

5. Centrifugar a 16,000 g por 7 minutos.

6. Transferir la fase acuosa o sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo y añadir 0.08 vol. de acetato de amonio a 7.5 M y 0.58 vol. de isopropanol a -20 °C, agitar e incubar a -20 °C toda la noche.
7. Centrifugar 3 minutos a 16,000 g, descartar el sobrenadante, lavar la pastilla con 700 µL de etanol al 70 %.
8. Centrifugar 1 minuto a 16,000 g, descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet por 15 minutos.
9. Re suspender la pastilla en 100 µL de TE, PH 8.0 ó H₂O libre de nucleasas y almacenar a -20 °C.

ANEXO B: Reacción de PCR (detección de begomovirus)

Las reacciones de PCR, para detección de begomovirus en ADN de tejido de plantas infectadas, se realizaron en 25 µL de volumen conteniendo: 1.5 mM MgCl₂, 1X PCR Buffer, 0.2 µM de cada primer 0.2 mM dNTP mix, 2U/rxn Taq ADN Polimerasa y 1 µL del templado de ADN.

Las condiciones de amplificación para el caso de la amplificación de genomas completos fueron de un periodo inicial de desnaturalización de 2 minutos a 94 °C, seguido por 35 ciclos, comprendidos por una fase de desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, una fase de alineamiento (según el cebador °C) durante 50 segundos y una fase de elongación a 72 °C durante 1 minuto por cada kb. Por último, un periodo final de elongación a 72 °C durante 10 minutos.

ANEXO C: Construcciones homólogas, heterólogas

Las construcciones utilizadas pertenecen al laboratorio de fitopatología del CIBNOR, se denominan, CIRP (construcción derivada de la región intergénica del PepGMV) y CIRT (Construcción de la región intergénica del ToChLPV), expresan una horquilla de intrón que comprende 146 nt del extremo 5' del gen AV1, 326 nt de la región intergénica (RI) completa y 714 nt del extremo 5' del gen AC1, el segmento AC1-RI-AV1 comprende 1186 nt y contienen secuencias invertidas de la AC1-RI-AV1 de cada virus, e incluyen un intrón que tienen una región espaciadora de la enzima *Xba* I, que permite confirmar la presencia de los segmentos en sentido y antisentido. El Bioensayo consistió en cuatro tratamientos, 1. CIRP, plantas agroinfiltradas con

CIRP, 2. CIRT, plantas agroinfiltradas con CIRT, 3. Control positivo, plantas agroinfiltradas con el vector vacío (pH7GWIWG2 II), estos tratamientos, cuatro días después de la infiltración fueron inoculadas con PepGMV. 4. Control negativo, plantas agroinfiltradas con el vector vacío y sin virus (Medina-Hernández *et al.*, 2013). El diseño de las construcciones utiliza la tecnología Gateway. Utiliza el vector de expresión de RNAi con secuencia de intrón como espaciador para la expresión en planta utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. La recombinación es específica porque ocurre en los sitios de unión (attachment-attB) de la bacteria y atado del fago (attP), esto depende de enzimas especializadas que reconocen dichas secuencias que integra y cataliza cortes dentro o cerca para su posterior escisión para así generar productos recombinantes. Se sabe que el método es eficiente debido a la presencia del gen CCDB que evita el crecimiento del fago que contiene los sitios attR2 y attR1.

Estas construcciones inician a partir de un fragmento amplificado por los primers degenerados de (Rojas *et al.*, 1993), con los que se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1100 pares de bases y se agregan secuencias nucleotídicas de los adaptadores: attB1 sentido directo: 5'-AA AAA GCA GGC TNN-GSP-3' 18-25 nt y attB2 reverso 5'-A GAA AGC TGG GTN-GSP-3' 18-25 nt. Posteriormente se liga al vector de entrada pDONOR 201 con la ayuda de la enzima clonasa BP. Ya que el fragmento está en el vector se transforma en *Escherichia coli* DH5 α . Mediante PCR se busca la colonia positiva que contenga el fragmento de interés (AC1-IR-AV1). Se resiembró y purifica para obtener el plásmido pDONOR 201 con la secuencia de interés de cada virus. Este plásmido se liga al vector de expresión pHGWIWG2 (II), con la enzima clonasa LR. Después se transforma en *E. coli* DH5 ∞ . Y se verifica que el vector de expresión contenga la secuencia de interés en sentido y antisentido. Para conocer la orientación correcta de la secuencia AC1-IR-AV1 que forma la horquilla (hairpin) dentro del vector se utiliza la enzima *Xba* I.

ANEXO D: Números de acceso de las secuencias que conformaron la base de datos de 445 especies reconocidas del género *Begomovirus* por el ICTV en su actualización de octubre, del 2020 y secuencias reportadas en la Península de Baja California.

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus	ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq1	KC430935.1	<i>Abutilon golden mosaic Yucatan virus</i>	Seq22	NC_004090.1	<i>Ageratum yellow vein China virus</i>
Seq2	NC_038438.1	<i>Abutilon golden mosaic Yucatan virus</i>	Seq23	AB050781.1	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
Seq3	HM585445.1	<i>Abutilon mosaic Bolivia virus</i>	Seq24	KC172826.1	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
Seq4	NC_016574.1	<i>Abutilon mosaic Brazil virus</i>	Seq25	AB100305.1	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
Seq5	NC_001928.2	<i>Abutilon mosaic virus</i>	Seq26	JN809816.1	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
Seq6	HE616777.1	<i>African cassava mosaic Burkina Faso virus</i>	Seq27	JQ804985.1	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
Seq7	J02057.1	<i>African cassava mosaic virus</i>	Seq28	EU487045.2	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
Seq8	NC_001467.1	<i>African cassava mosaic virus</i>	Seq29	AB306314.1	<i>Ageratum yellow vein virus - Ishigaki</i>
Seq9	AJ437618.1	<i>Ageratum enation virus</i>	Seq30	AF307861.1	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
Seq10	FN543099.1	<i>Ageratum enation virus</i>	Seq31	JN809820.1	<i>Ageratum yellow vein virus</i>
Seq11	NC_003434.1	<i>Ageratum enation virus</i>	Seq32	EF602306.1	<i>Allamanda leaf curl virus</i>
Seq12	HM149260.3	<i>Ageratum enation virus</i>	Seq33	NC_010947.1	<i>Allamanda leaf curl virus</i>
Seq13	MG917697.1	<i>Ageratum leaf curl Sichuan virus</i>	Seq34	KC202818.1	<i>Allamanda leaf mottle distortion virus</i>
Seq14	AJ851005.1	<i>Ageratum leaf curl virus</i>	Seq35	NC_024009.1	<i>Allamanda leaf mottle distortion virus</i>
Seq15	NC_006384.1	<i>Ageratum leaf curl virus</i>	Seq36	AJ965540.1	<i>Alternanthera yellow vein virus</i>
Seq16	DQ866132.1	<i>Ageratum yellow vein Hualian virus-Taiwan</i>	Seq37	NC_007211.1	<i>Alternanthera yellow vein virus</i>
Seq17	NC_038913.1	<i>Ageratum yellow vein Hualian virus-Taiwan</i>	Seq38	EF544604.1	<i>Alternanthera yellow vein virus</i>
Seq18	DQ866124.1	<i>Ageratum yellow vein Hualian virus-Taiwan</i>	Seq39	EF544602.1	<i>Alternanthera yellow vein virus</i>
Seq19	AF314144.1	<i>Ageratum yellow vein Sri Lanka virus</i>	Seq40	KM359406.2	<i>Andrographis yellow vein leaf curl virus</i>
Seq20	NC_002981.1	<i>Ageratum yellow vein Sri Lanka virus</i>	Seq41	NC_028262.1	<i>Andrographis yellow vein leaf curl virus</i>
Seq21	AJ495813.1	<i>Ageratum yellow vein China virus</i>	Seq42	KP663485.1	<i>Asystasia mosaic</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq43	NC_026514.1	<i>Madagascar virus</i> <i>Asystasia mosaic</i> <i>Madagascar virus</i>
Seq44	MN414067.1	<i>Bean bushy stunt</i> <i>virus</i>
Seq45	AF110189.1	<i>Bean calico mosaic</i> <i>virus</i>
Seq46	NC_003504.1	<i>Bean calico mosaic</i> <i>virus</i>
Seq47	JN848770.1	<i>Bean chlorosis virus</i>
Seq48	NC_019569.1	<i>Bean chlorosis virus -</i> <i>Venezuela</i>
Seq49	M88179.1	<i>Bean dwarf mosaic</i> <i>virus</i>
Seq50	NC_001931.1	<i>Bean dwarf mosaic</i> <i>virus</i>
Seq51	M88686.1	<i>Bean golden mosaic</i> <i>virus - Brazil</i>
Seq52	NC_004042.1	<i>Bean golden mosaic</i> <i>virus</i>
Seq53	JN419006.1	<i>Bean golden mosaic</i> <i>virus</i>
Seq54	L01635.1	<i>Bean golden yellow</i> <i>mosaic virus -</i> <i>Dominican Republic</i>
Seq55	NC_038791.1	<i>Bean golden yellow</i> <i>mosaic virus -</i> <i>Dominican Republic</i>
Seq56	MN158325.1	<i>Bean latent virus -</i> <i>Nayarit</i>
Seq57	KX857725.1	<i>Bean leaf crumple</i> <i>virus</i>
Seq58	NC_043524.1	<i>Bean leaf crumple</i> <i>virus</i>
Seq59	JN848772.1	<i>Bean white chlorosis</i> <i>mosaic virus -</i> <i>Venezuela</i>
Seq60	NC_022005.1	<i>Bean white chlorosis</i> <i>mosaic virus -</i> <i>Venezuela</i>
Seq61	FJ944023.1	<i>Bean yellow mosaic</i> <i>Mexico virus</i>
Seq62	NC_015487.1	<i>Bean yellow mosaic</i> <i>Mexico virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq63	FJ589571.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>Bhubhaneswar virus</i>
Seq64	NC_012041.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>Bhubhaneswar virus</i>
Seq65	FJ561298.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>Haryana virus</i>
Seq66	NC_043513.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>Haryana virus</i>
Seq67	FJ515747.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>Delhi virus</i>
Seq68	NC_011919.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>Delhi virus</i>
Seq69	AF241479.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>mosaic virus -</i> <i>Madurai</i>
Seq70	NC_003418.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>mosaic virus</i>
Seq71	EU589392.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>mosaic virus</i>
Seq72	AJ002451.1	<i>Okra yellow vein</i> <i>mosaic virus</i>
Seq73	FJ179372.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>mosaic virus</i>
Seq74	FJ176235.1	<i>Bhendi yellow vein</i> <i>mosaic virus - India</i>
Seq75	MH481856.1	<i>Bitter gourd yellow</i> <i>mosaic virus</i>
Seq76	EU710756.1	<i>Blainvillea yellow</i> <i>spot virus</i>
Seq77	NC_010837.1	<i>Blainvillea yellow</i> <i>spot virus</i>
Seq79	JX827487.1	<i>Blechum interveinal</i> <i>chlorosis virus</i>
Seq80	NC_019035.1	<i>Blechum interveinal</i> <i>chlorosis virus</i>
Seq81	KF446659.1	<i>Blechum yellow vein</i> <i>virus</i>
Seq82	EF121755.1	<i>Boerhavia yellow</i> <i>spot virus -Yucatan</i>
Seq83	NC_038439.1	<i>Boerhavia yellow</i> <i>spot virus -Yucatan</i>
Seq84	DQ178608.1	<i>Cabbage leaf curl</i> <i>Jamaica virus</i>
Seq85	NC_038792.1	<i>Cabbage leaf curl</i> <i>Jamaica virus</i>
Seq86	U65529.2	<i>Cabbage leaf curl</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq87	NC_003866.1	<i>virus</i> <i>Cabbage leaf curl virus</i>
Seq88	KC426927.1	<i>Capraria yellow spot Yucatan virus</i>
Seq89	NC_022007.1	<i>Capraria yellow spot Yucatan virus</i>
Seq90	HE617299.1	<i>Cassava mosaic Madagascar virus</i>
Seq91	NC_017004.1	<i>Cassava mosaic Madagascar virus</i>
Seq92	LK028570.1	<i>Catharanthus yellow mosaic virus</i>
Seq93	NC_025964.1	<i>Catharanthus yellow mosaic virus</i>
Seq94	JN419002.1	<i>Centrosema yellow spot virus</i>
Seq95	NC_016998.1	<i>Centrosema yellow spot virus</i>
Seq96	AJ223191.1	<i>Chayote yellow mosaic virus</i>
Seq97	NC_004618.1	<i>Chayote yellow mosaic virus</i>
Seq98	HM626515.1	<i>Chenopodium leaf curl virus</i>
Seq99	NC_038440.1	<i>Chenopodium leaf curl virus</i>
Seq100	KM880103.1	<i>Chilli leaf curl Ahmedabad virus - India</i>
Seq101	NC_028046.1	<i>Chilli leaf curl Ahmedabad virus - India</i>
Seq102	HM992939.1	<i>Chilli leaf curl virus - India</i>
Seq103	KJ957157.1	<i>Chilli leaf curl Gonda virus</i>
Seq104	FM877858.1	<i>Chilli leaf curl India virus</i>
Seq105	HM007106.1	<i>Chilli leaf curl Kanpur virus - India</i>
Seq106	NC_038875.1	<i>Chilli leaf curl India virus</i>
Seq107	NC_038441.1	<i>Chilli leaf curl Kanpur virus - India</i>
Seq108	JN555601.1	<i>Chilli leaf curl Sri</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq109	HM007121.1	<i>Lanka virus</i> <i>Chilli Leaf curl Vellanad virus - India</i>
Seq110	NC_038442.1	<i>Chilli Leaf curl Vellanad virus - India</i>
Seq111	AF336806.1	<i>Chilli leaf curl virus</i>
Seq112	NC_004628.1	<i>Chilli leaf curl virus</i>
Seq113	GU136803.1	<i>Chilli leaf curl virus - India</i>
Seq114	AJ875159.1	<i>Tomato leaf curl Joydebpur virus</i>
Seq115	DQ673859.1	<i>Chilli leaf curl virus</i>
Seq116	FJ345402.1	<i>Chilli leaf curl virus</i>
Seq117	DQ116878.1	<i>Pepper leaf curl Pakistan virus</i>
Seq118	HM357461.3	<i>Chino del tomate Amazonas virus</i>
Seq119	NC_038443.1	<i>Chino del tomate Amazonas virus</i>
Seq120	AF101476.1	<i>Chino del tomate virus</i>
Seq121	NC_003830.1	<i>Chino del tomate virus</i>
Seq122	AY751753.2	<i>Okra mottle Mexico virus</i>
Seq123	DQ347945.1	<i>Chino del tomate virus - Sinaloa</i>
Seq124	HQ396465.1	<i>Cleome golden mosaic virus</i>
Seq125	NC_015397.1	<i>Cleome golden mosaic virus</i>
Seq126	JF694461.1	<i>Cleome leaf crumple virus</i>
Seq127	NC_016578.1	<i>Cleome leaf crumple virus</i>
Seq128	DQ641692.1	<i>Clerodendrum golden mosaic virus</i>
Seq129	NC_010713.1	<i>Clerodendrum golden mosaic virus</i>
Seq130	EF408037.1	<i>Clerodendron yellow mosaic virus</i>
Seq131	NC_009451.1	<i>Clerodendron yellow mosaic virus</i>
Seq132	FJ011668.1	<i>Clerodendrum golden</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq133	NC_011346.1	<i>mosaic China virus Clerodendrum golden mosaic China virus</i>
Seq134	FN396962.1	<i>Clerodendrum golden mosaic China virus</i>
Seq135	FN396966.1	<i>Clerodendrum golden mosaic Jiangsu virus</i>
Seq136	NC_038876.1	<i>Clerodendrum golden mosaic Jiangsu virus</i>
Seq137	KT966771.1	<i>Cnidoscopus mosaic leaf deformation virus</i>
Seq138	NC_038982.1	<i>Cnidoscopus mosaic leaf deformation virus</i>
Seq139	KM244719.1	<i>Coccinia mosaic Tamil Nadu virus</i>
Seq140	NC_024810.1	<i>Coccinia mosaic Tamil Nadu virus</i>
Seq141	KX011473.1	<i>Common bean mottle virus</i>
Seq142	NC_038988.1	<i>Common bean mottle virus</i>
Seq143	KX011477.1	<i>Common bean severe mosaic virus</i>
Seq144	DQ641688.1	<i>Corchorus golden mosaic virus</i>
Seq145	NC_009644.1	<i>Corchorus golden mosaic virus</i>
Seq146	FJ463902.1	<i>Corchorus golden mosaic virus - India</i>
Seq147	DQ875868.1	<i>Corchorus yellow spot virus</i>
Seq148	NC_008492.1	<i>Corchorus yellow spot virus</i>
Seq149	MF773912.1	<i>Corchorus yellow vein virus -Cuba</i>
Seq150	KC223600.1	<i>Corchorus yellow vein mosaic virus</i>
Seq151	NC_020473.1	<i>Corchorus yellow vein mosaic virus</i>
Seq152	AY727903.1	<i>Corchorus yellow vein Vietnam virus</i>
Seq153	NC_006358.1	<i>Corchorus yellow vein virus</i>
Seq154	KF358470.1	<i>Cotton chlorotic spot</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq155	NC_038794.1	<i>virus -Brazil Cotton chlorotic spot virus -Brazil</i>
Seq156	AF480940.1	<i>Cotton leaf crumple virus - Mexico</i>
Seq157	NC_004580.1	<i>Cotton leaf crumple virus</i>
Seq158	AY083351.1	<i>Cotton leaf crumple virus - TX</i>
Seq159	AJ002455.1	<i>Cotton leaf curl Alabad virus - Pakistan</i>
Seq160	NC_004582.1	<i>Cotton leaf curl Alabad virus</i>
Seq161	GU112081.1	<i>Cotton leaf curl Allahabad virus - India</i>
Seq162	GU112004.1	<i>Cotton leaf curl Allahabad virus - India</i>
Seq163	FJ210467.1	<i>Cotton leaf curl Alabad virus</i>
Seq164	EU384575.1	<i>Cotton leaf curl Alabad virus</i>
Seq165	AY705380.1	<i>Cotton leaf curl Bangalore virus</i>
Seq166	NC_007290.1	<i>Cotton leaf curl Bangalore virus</i>
Seq167	LC080677.1	<i>Malachra yellow mosaic virus</i>
Seq168	NC_039003.1	<i>Malachra yellow mosaic virus</i>
Seq169	AF260241.1	<i>Cotton leaf curl Gezira virus</i>
Seq170	NC_038444.1	<i>Cotton leaf curl Gezira virus</i>
Seq171	FN554540.1	<i>Cotton leaf curl Gezira virus-</i>
Seq172	AJ542539.1	<i>Hollyhock leaf crumple virus -Cairo</i>
Seq173	FM210276.1	<i>Cotton leaf curl Gezira virus - Cameroon</i>
Seq174	AF155064.2	<i>Cotton leaf curl Gezira virus</i>
Seq175	AF014881.1	<i>Cotton leaf curl</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq176	FM164726.1	<i>Gezira virus</i> <i>Okra leaf curl virus</i> - Cameroon
Seq177	AM701757.1	<i>Bean leaf curl</i> <i>Madagascar virus</i>
Seq178	EU024120.1	<i>Okra leaf curl Mali</i> <i>virus</i>
Seq179	EU432373.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Gezira virus</i>
Seq180	FJ868828.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Gezira virus</i>
Seq181	AJ002449.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Kokhran virus</i> - Pakistan
Seq182	NC_004583.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Kokhran virus</i>
Seq183	AM421522.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Burewala virus</i> - India
Seq184	HF549182.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Burewala virus</i>
Seq185	GU385879.2	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Kokhran virus</i>
Seq186	FN552001.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Shadadpur virus</i>
Seq187	EU365613.1	<i>Gossypium darwinii</i> <i>symptomless virus</i>
Seq188	NC_011804.1	<i>Gossypium darwinii</i> <i>symptomless virus</i>
Seq189	AJ002447.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Multan virus</i> - Pakistan
Seq190	JN807763.2	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Multan virus</i>
Seq191	AJ132430.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Multan virus</i>
Seq192	EU365616.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Multan virus</i>
Seq193	AF363011.1	<i>Cotton leaf curl</i> <i>Multan virus</i>
Seq194	KU683748.1	<i>Cotton yellow mosaic</i> <i>virus</i>
Seq195	MH469731.1	<i>Cowpea bright yellow</i> <i>mosaic virus</i>
Seq196	AF029217.1	<i>Cowpea golden</i> <i>mosaic virus</i> - Nigeria
Seq197	NC_038445.1	<i>Cowpea golden</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq198	EF165536.1	<i>mosaic virus</i> - Nigeria
Seq199	NC_008794.1	<i>Crassocephalum</i> <i>yellow vein virus</i>
Seq200	KX156613.1	<i>Crassocephalum</i> <i>yellow vein virus</i>
Seq201	AJ507777.1	<i>Croton golden mosaic</i> <i>virus</i> -Florida
Seq202	NC_004300.1	<i>Croton yellow vein</i> <i>mosaic virus</i>
Seq203	MN013786.1	<i>Cucumber chlorotic</i> <i>leaf virus</i> -Colima
Seq204	AF224760.2	<i>Cucurbit leaf curl</i> <i>virus</i>
Seq205	NC_002984.1	<i>Cucurbit leaf crumple</i> <i>virus</i>
Seq206	JN848775.1	<i>Dalechampia</i> <i>chlorotic mosaic virus</i> -Venezuela
Seq207	NC_018716.1	<i>Dalechampia</i> <i>chlorotic mosaic virus</i> -Venezuela
Seq208	MF402918.1	<i>Datura leaf curl virus</i> -Sudan
Seq209	NC_043531.1	<i>Datura leaf curl virus</i> -Sudan
Seq210	JN848773.1	<i>Datura leaf distortion</i> <i>virus</i> -Venezuela
Seq211	NC_018717.1	<i>Datura leaf distortion</i> <i>virus</i> -Venezuela
Seq212	KT878829.1	<i>Deinbollia mosaic</i> <i>virus</i>
Seq213	NC_029804.1	<i>Deinbollia mosaic</i> <i>virus</i>
Seq214	DQ875870.1	<i>Desmodium leaf</i> <i>distortion virus</i>
Seq215	NC_008494.1	<i>Desmodium leaf</i> <i>distortion virus</i>
Seq216	KY294725.1	<i>Desmodium mottle</i> <i>virus</i>
Seq217	NC_039001.1	<i>Desmodium mottle</i> <i>virus</i>
Seq218	AJ549960.1	<i>Dicliptera yellow</i> <i>mottle virus</i>
Seq219	AF139168.1	<i>Dicliptera yellow</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq220	NC_003856.1	<i>mottle virus</i> <i>Dicliptera</i> yellow <i>mottle virus</i>
Seq221	AY271891.1	<i>Hyacinth bean yellow</i> <i>mosaic Bangladesh</i> <i>virus</i>
Seq222	KT948069.1	<i>Duranta leaf curl</i> <i>virus</i>
Seq223	NC_038980.1	<i>Duranta leaf curl</i> <i>virus</i>
Seq224	AF112354.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic Cameroon</i> <i>virus</i>
Seq225	NC_004625.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic Cameroon</i> <i>virus</i>
Seq226	AJ717572.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic Kenya virus</i>
Seq227	NC_015045.1	<i>Abutilon mosaic</i> <i>Bolivia virus</i>
Seq228	JF694480.1	<i>Abutilon mosaic</i> <i>Brazil virus</i>
Seq229	NC_011583.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic Kenya virus</i>
Seq230	AJ006460.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic Malawi virus</i>
Seq231	NC_038877.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic Malawi virus</i>
Seq232	AF126806.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic virus -</i> <i>Uganda</i>
Seq233	NC_004674.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic virus</i>
Seq234	AJ717542.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic virus</i>
Seq235	JX473582.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic virus</i>
Seq236	AY795983.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic virus</i>
Seq237	AF422174.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic Zanzibar virus</i>
Seq238	NC_004655.1	<i>East African cassava</i> <i>mosaic Zanzibar virus</i>
Seq239	KT390456.1	<i>Eclipta yellow vein</i> <i>virus</i>
Seq240	MH035670.1	<i>Emilia yellow vein</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq241	KY373213.1	<i>Fujian virus</i> <i>Emilia sonchifolia</i> <i>yellow vein Thailand</i> <i>virus</i>
Seq242	NC_035473.1	<i>Emilia sonchifolia</i> <i>yellow vein Thailand</i> <i>virus</i>
Seq243	EU377539.1	<i>Emilia yellow vein</i> <i>virus</i>
Seq244	NC_010307.1	<i>Emilia yellow vein</i> <i>virus</i>
Seq245	DQ641698.1	<i>Erectites yellow</i> <i>mosaic virus</i>
Seq246	NC_009549.1	<i>Erectites yellow</i> <i>mosaic virus</i>
Seq247	AJ438937.1	<i>Eupatorium yellow</i> <i>vein virus</i>
Seq248	NC_038879.1	<i>Eupatorium yellow</i> <i>vein virus</i>
Seq249	AB007990.1	<i>Eupatorium yellow</i> <i>vein virus</i>
Seq250	NC_003556.1	<i>Eupatorium yellow</i> <i>vein virus</i>
Seq251	AJ438936.1	<i>Eupatorium yellow</i> <i>vein virus</i>
Seq252	AB079766.1	<i>Eupatorium yellow</i> <i>vein virus</i>
Seq253	AB300463.1	<i>Eupatorium yellow</i> <i>vein virus</i>
Seq254	AB433979.1	<i>Eupatorium yellow</i> <i>vein virus - Japan</i>
Seq255	AM411424.1	<i>Euphorbia leaf curl</i> <i>Guangxi virus</i>
Seq256	NC_038881.1	<i>Euphorbia leaf curl</i> <i>Guangxi virus</i>
Seq257	AJ558121.1	<i>Euphorbia leaf curl</i> <i>virus</i>
Seq258	NC_005319.1	<i>Euphorbia leaf curl</i> <i>virus</i>
Seq259	AM886131.1	<i>Euphorbia mosaic</i> <i>virus -Peru</i>
Seq260	NC_039082.1	<i>Euphorbia mosaic</i> <i>virus -Peru</i>
Seq261	DQ318937.1	<i>Euphorbia mosaic</i> <i>virus - Mexico</i>
Seq262	NC_008304.1	<i>Euphorbia mosaic</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq263	KT159766.1	<i>virus - Mexico Euphorbia yellow leaf curl virus</i>
Seq264	NC_038976.1	<i>Euphorbia yellow leaf curl virus</i>
Seq265	FJ619507.1	<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>
Seq266	NC_012553.1	<i>Euphorbia yellow mosaic virus</i>
Seq267	JF756676.1	<i>Euphorbia yellow mosaic virus -Brazil</i>
Seq268	JQ866297.1	<i>French bean leaf curl virus</i>
Seq269	NC_018090.1	<i>French bean leaf curl virus</i>
Seq270	KF429251.1	<i>Hedyotis uncinella yellow mosaic virus</i>
Seq271	NC_038448.1	<i>Hedyotis uncinella yellow mosaic virus</i>
Seq272	KC898543.1	<i>Hemidesmus yellow mosaic virus</i>
Seq273	NC_022073.1	<i>Hemidesmus yellow mosaic virus</i>
Seq274	MK558061.1	<i>Hibiscus golden mosaic virus</i>
Seq275	MF140451.1	<i>Hibiscus vein enation virus</i>
Seq276	FR772082.1	<i>Hollyhock leaf curl virus -Pakistan</i>
Seq277	NC_038884.1	<i>Hollyhock leaf curl virus</i>
Seq278	JQ911766.1	<i>Hollyhock yellow vein mosaic virus</i>
Seq279	MG373552.1	<i>Hollyhock yellow vein virus</i>
Seq280	AJ542540.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq281	NC_005807.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq282	JX416174.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus - Australia</i>
Seq283	AB178945.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq284	AB079765.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq285	AB287441.1	<i>Honeysuckle yellow</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq286	AB287440.1	<i>vein virus Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq287	AB287439.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq288	AB182261.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq289	HM164545.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq290	AB178946.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq291	AB055009.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq292	AB236325.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus - Japan</i>
Seq293	AB079689.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq294	FJ434943.1	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq295	HM164547.2	<i>Honeysuckle yellow vein virus</i>
Seq296	AJ627904.1	<i>Horsegram yellow mosaic virus</i>
Seq297	NC_005635.1	<i>Horsegram yellow mosaic virus</i>
Seq298	KX156609.1	<i>Hybanthus yellow mosaic virus -Florida</i>
Seq299	Z24758.1	<i>Indian cassava mosaic virus</i>
Seq300	NC_001932.1	<i>Indian cassava mosaic virus</i>
Seq301	JF496657.1	<i>Indian cassava mosaic virus</i>
Seq302	GQ924760.1	<i>Indian cassava mosaic virus</i>
Seq303	AJ575819.1	<i>Indian cassava mosaic virus</i>
Seq304	JQ821386.1	<i>Jacquemontia mosaic Yucatan virus</i>
Seq305	NC_038796.1	<i>Jacquemontia mosaic Yucatan virus</i>
Seq306	KF661331.1	<i>Jacquemontia yellow mosaic virus - Venezuela</i>
Seq307	NC_038960.1	<i>Jacquemontia yellow mosaic virus -</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq308	KY617094.1	Venezuela <i>Jacquemontia</i> yellow vein virus
Seq309	NC_043526.1	<i>Jacquemontia</i> yellow vein virus
Seq310	KM411359.1	<i>Jatropha</i> leaf curl Gujarat virus
Seq311	NC_038962.1	<i>Jatropha</i> leaf curl Gujarat virus
Seq312	EU798996.1	<i>Jatropha</i> leaf curl virus
Seq313	NC_011268.1	<i>Jatropha</i> leaf curl virus
Seq314	GU451249.1	<i>Jatropha</i> leaf curl virus
Seq315	JN698954.3	<i>Jatropha</i> leaf yellow mosaic Katarniaghat virus
Seq316	NC_038956.1	<i>Jatropha</i> leaf yellow mosaic Katarniaghat virus
Seq317	HM230683.1	<i>Jatropha</i> mosaic India virus
Seq318	NC_038449.1	<i>Jatropha</i> mosaic India virus
Seq319	JX025358.1	<i>Jatropha</i> mosaic Nigerian virus
Seq320	NC_019034.1	<i>Jatropha</i> mosaic Nigerian virus
Seq321	KF723258.1	<i>Jatropha</i> mosaic virus -Jamaica
Seq322	NC_024012.1	<i>Jatropha</i> mosaic virus - Jamaica
Seq323	FJ177030.2	<i>Jatropha</i> yellow mosaic virus
Seq324	NC_011309.2	<i>Jatropha</i> yellow mosaic virus
Seq325	DQ641690.1	<i>Kudzu</i> mosaic virus
Seq326	NC_009645.1	<i>Kudzu</i> mosaic virus
Seq327	JQ429791.1	<i>Leonurus</i> mosaic virus
Seq328	NC_038450.1	<i>Leonurus</i> mosaic virus
Seq329	DQ641701.1	<i>Lindernia anagallis</i> yellow vein virus

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq330	NC_009550.1	<i>Lindernia anagallis</i> yellow vein virus
Seq331	LC091538.1	<i>Lisianthus enation</i> leaf curl virus
Seq332	NC_031466.1	<i>Lisianthus enation</i> leaf curl virus
Seq333	DQ641699.1	<i>Ludwigia</i> yellow vein Vietnam virus
Seq334	NC_038451.1	<i>Ludwigia</i> yellow vein Vietnam virus
Seq335	AJ965539.2	<i>Ludwigia</i> yellow vein virus
Seq336	NC_007210.2	<i>Ludwigia</i> yellow vein virus
Seq337	AF509739.1	<i>Loofa</i> yellow mosaic virus
Seq338	NC_004824.1	<i>Loofa</i> yellow mosaic virus
Seq339	KT582302.1	<i>Lycianthes</i> yellow mosaic virus
Seq340	NC_038978.1	<i>Lycianthes</i> yellow mosaic virus
Seq341	KX691400.1	<i>Macroptilium</i> bright mosaic virus
Seq342	NC_031452.1	<i>Macroptilium</i> bright mosaic virus
Seq343	KX691396.1	<i>Macroptilium</i> common mosaic virus
Seq344	NC_031448.1	<i>Macroptilium</i> common mosaic virus
Seq345	EU158096.1	<i>Macroptilium</i> golden mosaic virus - Jamaica
Seq346	NC_010952.1	<i>Macroptilium</i> golden mosaic virus - Jamaica
Seq347	AY044133.1	<i>Macroptilium</i> mosaic Puerto Rico virus
Seq348	NC_004097.1	<i>Macroptilium</i> mosaic Puerto Rico virus
Seq349	AY044135.1	<i>Macroptilium</i> yellow mosaic Florida virus
Seq350	NC_004099.1	<i>Macroptilium</i> yellow mosaic Florida virus
Seq351	EF585290.1	<i>Macroptilium</i> yellow mosaic virus

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq352	NC_010647.1	<i>Macroptilium yellow mosaic virus</i>
Seq353	AJ344452.1	<i>Macroptilium yellow mosaic virus - Cuba</i>
Seq354	JN419013.1	<i>Macroptilium yellow spot virus</i>
Seq355	NC_016999.1	<i>Macroptilium yellow spot virus</i>
Seq356	JN419021.1	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
Seq357	KU058856.1	<i>Malvastrum bright yellow mosaic virus</i>
Seq358	NC_017000.1	<i>Macroptilium yellow vein virus</i>
Seq359	NC_031458.1	<i>Malvastrum bright yellow mosaic virus</i>
Seq360	KC577540.1	<i>Malvastrum leaf curl Philippines virus</i>
Seq361	NC_021245.1	<i>Malvastrum leaf curl Philippines virus</i>
Seq362	AJ971263.1	<i>Malvastrum leaf curl virus</i>
Seq363	NC_007724.1	<i>Malvastrum leaf curl virus</i>
Seq364	FJ600483.1	<i>Malvastrum yellow mosaic Helshire virus</i>
Seq365	NC_038452.1	<i>Malvastrum yellow mosaic Helshire virus</i>
Seq366	FJ601917.2	<i>Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus</i>
Seq367	NC_038798.1	<i>Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus</i>
Seq368	AM236755.1	<i>Malvastrum yellow mosaic virus</i>
Seq369	NC_008559.1	<i>Malvastrum yellow mosaic virus</i>
Seq370	KP188831.1	<i>Malvastrum yellow vein Cambodia virus</i>
Seq371	NC_026763.1	<i>Malvastrum yellow vein Cambodia virus</i>
Seq372	FN552749.1	<i>Malvastrum yellow vein Honghe virus</i>
Seq373	NC_030749.1	<i>Malvastrum yellow vein Honghe virus</i>
Seq374	MF683828.1	<i>Malvastrum yellow vein Lahore virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq375	AJ457824.1	<i>Malvastrum yellow vein virus</i>
Seq376	NC_004634.1	<i>Malvastrum yellow vein virus</i>
Seq377	FN386459.1	<i>Malvastrum yellow vein Baoshan virus</i>
Seq378	FN806779.1	<i>Malvastrum yellow vein Baoshan virus</i>
Seq379	AJ786711.1	<i>Malvastrum yellow vein Yunnan virus</i>
Seq380	NC_006631.1	<i>Malvastrum yellow vein Yunnan virus</i>
Seq381	KT201151.1	<i>Melochia mosaic virus -Brazil</i>
Seq382	NC_028140.1	<i>Melochia mosaic virus</i>
Seq383	KT201153.1	<i>Melochia yellow mosaic virus -Brazil</i>
Seq384	NC_028142.1	<i>Melochia yellow mosaic virus</i>
Seq385	AY064391.1	<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i>
Seq386	NC_003865.1	<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i>
Seq387	KC153490.1	<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i>
Seq388	AF325497.1	<i>Melon chlorotic leaf curl virus-Guatemala</i>
Seq389	HM163576.1	<i>Melon chlorotic mosaic virus</i>
Seq390	NC_014380.1	<i>Melon chlorotic mosaic virus</i>
Seq391	MH665365.2	<i>Melon yellow mosaic virus</i>
Seq392	FJ944021.1	<i>Merremia mosaic Puerto Rico virus</i>
Seq393	NC_015490.1	<i>Merremia mosaic Puerto Rico virus</i>
Seq394	AF068636.2	<i>Merremia mosaic virus</i>
Seq395	NC_007965.1	<i>Merremia mosaic virus</i>
Seq396	EU360303.1	<i>Mesta yellow vein mosaic Bahraich virus -India</i>
Seq397	NC_010818.1	<i>Mesta yellow vein</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq398	AY508991.1	<i>mosaic Bahraich virus -India</i>
Seq399	DQ641695.1	<i>Merremia mosaic virus</i>
Seq400	NC_009546.1	<i>Mimosa yellow leaf curl virus</i>
Seq401	LK054801.1	<i>Mirabilis leaf curl virus</i>
Seq402	NC_024491.1	<i>Mirabilis leaf curl virus</i>
Seq403	AF126406.1	<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i>
Seq404	NC_004608.1	<i>Mungbean yellow mosaic India virus</i>
Seq405	X15983.2	<i>Abutilon mosaic virus</i>
Seq406	D14703.1	<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>
Seq407	NC_001983.1	<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>
Seq408	MN313661.1	<i>Ocimum golden mosaic virus -Uganda</i>
Seq409	MN313669.1	<i>Ocimum mosaic virus</i>
Seq410	MN313667.1	<i>Ocimum yellow vein virus -Uganda</i>
Seq411	GU111998.1	<i>Okra enation leaf curl virus-India</i>
Seq412	NC_014894.1	<i>Okra enation leaf curl virus-India</i>
Seq413	HE862273.1	<i>Okra leaf curl Oman virus</i>
Seq414	NC_028985.1	<i>Okra leaf curl Oman virus</i>
Seq415	EU914817.1	<i>Okra mottle virus - Brazil</i>
Seq416	NC_011181.1	<i>Okra mottle virus - Brazil</i>
Seq417	DQ875879.1	<i>Okra yellow crinkle virus</i>
Seq418	NC_008377.1	<i>Okra yellow crinkle virus</i>
Seq419	FM210275.1	<i>Okra yellow crinkle virus -Cameroon</i>
Seq420	HE793424.1	<i>Okra yellow crinkle</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq421	DQ022611.1	<i>virus</i> <i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>
Seq422	NC_014066.1	<i>Okra yellow mosaic Mexico virus</i>
Seq423	KM887907.1	<i>Oxalis yellow vein virus</i>
Seq424	NC_026253.1	<i>Oxalis yellow vein virus</i>
Seq425	HM140367.1	<i>Papaya leaf crumple virus - India</i>
Seq426	NC_014707.1	<i>Papaya leaf crumple virus - India</i>
Seq427	AJ558124.1	<i>Papaya leaf curl China virus</i>
Seq428	NC_005321.1	<i>Papaya leaf curl China virus</i>
Seq429	AJ558125.1	<i>Papaya leaf curl China virus</i>
Seq430	FN256261.2	<i>Papaya leaf curl China virus</i>
Seq431	FN297834.1	<i>Papaya leaf curl China virus</i>
Seq432	AJ558117.1	<i>Papaya leaf curl China virus</i>
Seq433	GQ373254.1	<i>Papaya leaf curl China virus</i>
Seq434	AJ558122.1	<i>Papaya leaf curl Guandong virus</i>
Seq435	NC_005844.1	<i>Papaya leaf curl Guandong virus</i>
Seq436	Y15934.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq437	NC_004147.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq438	JN817517.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq439	JN135233.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq440	JQ954859.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq441	KF307208.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq442	FJ593629.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq443	FN678906.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq444	AJ436992.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq445	FN543112.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq446	FM955601.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq447	JQ407224.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq448	JN807765.2	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq449	HM143914.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq450	DQ629102.1	<i>Papaya leaf curl virus</i>
Seq451	MH988457.1	<i>Papaya severe leaf curl virus</i>
Seq452	MH988458.1	<i>Papaya severe leaf curl virus</i>
Seq453	MK087124.1	<i>Passion fruit leaf curl virus</i>
Seq454	MH807204.1	<i>Papaya yellow leaf curl virus</i>
Seq455	KT899302.1	<i>Passionfruit leaf distortion virus</i> - Colombia
Seq456	NC_031764.1	<i>Passionfruit leaf distortion virus</i>
Seq457	FJ972767.1	<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i>
Seq458	NC_012786.1	<i>Passionfruit severe leaf distortion virus</i>
Seq459	KT948785.1	<i>Pavonia mosaic virus</i>
Seq460	NC_038981.1	<i>Pavonia mosaic virus</i>
Seq461	KT948787.1	<i>Pavonia yellow mosaic virus</i>
Seq462	NC_029105.1	<i>Pavonia yellow mosaic virus</i>
Seq463	NC_033554.1	<i>Pea leaf distortion virus</i>
Seq464	KY001635.1	<i>Pea leaf distortion virus</i>
Seq465	NC_012118.1	<i>Pedilanthus leaf curl virus</i> - Pakistan
Seq466	AM712436.1	<i>Pedilanthus leaf curl virus</i> - Pakistan
Seq467	DQ116884.1	<i>Pedilanthus leaf curl virus</i>
Seq468	AM948961.1	<i>Pedilanthus leaf curl virus</i>
Seq469	MN518737.1	<i>Pepper blistering leaf virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq470	NC_004101.1	<i>Pepper golden mosaic virus</i>
Seq471	U57457.1	<i>Pepper golden mosaic virus</i> - Tamaulipas
Seq472	AF149227.1	<i>Pepper golden mosaic virus</i>
Seq473	JQ743486.1	<i>Pepper golden mosaic virus</i> -Costa Rica
Seq474	NC_001359.1	<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>
Seq475	X70418.1	<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>
Seq476	NC_004192.1	<i>Pepper leaf curl Bangladesh virus</i>
Seq477	AF314531.1	<i>Pepper leaf curl Bangladesh virus</i>
Seq478	AM404179.1	<i>Pepper leaf curl Lahore Virus</i> - Pakistan
Seq479	HM007096.1	<i>Pepper leaf curl Bangladesh virus</i>
Seq480	DQ116881.1	<i>Pepper leaf curl Bangladesh virus</i>
Seq481	JN135234.2	<i>Pepper leaf curl Lahore virus</i>
Seq482	NC_000882.1	<i>Pepper leaf curl virus</i>
Seq483	AF134484.2	<i>Pepper leaf curl virus</i>
Seq484	AF414287.1	<i>Pepper leaf curl virus</i> -Malaysia
Seq485	NC_010618.1	<i>Pepper leaf curl Yunnan virus</i>
Seq486	EU585781.1	<i>Pepper leaf curl Yunnan virus</i>
Seq487	NC_043517.1	<i>Pepper leafroll virus</i>
Seq488	KC769819.1	<i>Pepper leafroll virus</i>
Seq489	LC387327.1	<i>Pepper yellow leaf curl Aceh virus</i>
Seq490	NC_008283.1	<i>Pepper yellow leaf curl Indonesia virus</i>
Seq491	AB267834.1	<i>Pepper yellow leaf curl Indonesia virus</i>
Seq492	KT809345.1	<i>Pepper yellow leaf</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq493	KX943290.1	<i>curl Indonesia virus 2</i> <i>Pepper yellow leaf</i> <i>curl Thailand virus</i>
Seq494	NC_020236.1	<i>Pepper yellow leaf</i> <i>curl virus</i>
Seq495	KC149938.1	<i>Pepper yellow leaf</i> <i>curl virus</i>
Seq496	NC_005347.1	<i>Pepper yellow vein</i> <i>Mali virus</i>
Seq497	AY502935.1	<i>Pepper yellow vein</i> <i>Mali virus</i>
Seq498	NC_037068.1	<i>Polygala garcinii</i> <i>virus</i>
Seq499	MG001959.1	<i>Polygala garcinii</i> <i>virus</i>
Seq500	NC_002048.1	<i>Potato yellow mosaic</i> <i>Panama virus</i>
Seq501	Y15034.1	<i>Potato yellow mosaic</i> <i>Panama virus</i>
Seq502	NC_001934.1	<i>Potato yellow mosaic</i> <i>virus</i>
Seq503	D00940.1	<i>Potato yellow mosaic</i> <i>virus -Venezuela</i>
Seq504	AF039031.1	<i>Potato yellow mosaic</i> <i>virus</i>
Seq505	EU518935.1	<i>Potato yellow mosaic</i> <i>virus</i>
Seq506	AY965897.1	<i>Potato yellow mosaic</i> <i>virus</i>
Seq507	NC_023849.1	<i>Pouzolzia golden</i> <i>mosaic virus</i>
Seq508	JX183732.1	<i>Pouzolzia golden</i> <i>mosaic virus</i>
Seq509	NC_038453.1	<i>Pouzolzia mosaic</i> <i>Guangdong virus</i>
Seq510	KF414123.1	<i>Pouzolzia mosaic</i> <i>Guangdong virus</i>
Seq511	KF927128.2	<i>Pouzolzia golden</i> <i>mosaic virus</i>
Seq512	NC_038454.1	<i>Premna leaf curl virus</i>
Seq513	JQ793786.1	<i>Premna leaf curl virus</i>
Seq514	NC_010946.1	<i>Pumpkin yellow</i> <i>mosaic Malaysia</i> <i>virus</i>
Seq515	EF197941.1	<i>Pumpkin yellow</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
		<i>mosaic Malaysia</i> <i>virus</i>
Seq516	NC_030699.1	<i>Ramie mosaic</i> <i>Yunnan virus</i>
Seq517	KU522485.1	<i>Ramie mosaic</i> <i>Yunnan virus</i>
Seq518	NC_038800.1	<i>Rhynchosia golden</i> <i>mosaic Havana virus</i>
Seq519	HM236368.1	<i>Rhynchosia golden</i> <i>mosaic Havana virus</i>
Seq520	NC_038802.1	<i>Rhynchosia golden</i> <i>mosaic Sinaloa virus</i>
Seq521	DQ406672.1	<i>Rhynchosia golden</i> <i>mosaic Sinaloa virus</i>
Seq522	NC_037306.1	<i>Rhynchosia golden</i> <i>mosaic virus</i>
Seq523	DQ347950.1	<i>Rhynchosia golden</i> <i>mosaic virus</i>
Seq524	AF408199.1	<i>Rhynchosia golden</i> <i>mosaic virus -</i> <i>Chiapas</i>
Seq525	EU339936.1	<i>Rhynchosia golden</i> <i>mosaic virus</i>
Seq526	NC_015488.1	<i>Rhynchosai mild</i> <i>mosaic virus</i>
Seq527	FJ944019.1	<i>Rhynchosai mild</i> <i>mosaic virus</i>
Seq528	NC_038805.1	<i>Rhynchosia rugose</i> <i>golden mosaic virus -</i> <i>Cuba</i>
Seq529	HM236370.1	<i>Rhynchosia rugose</i> <i>golden mosaic virus -</i> <i>Cuba</i>
Seq530	NC_014902.1	<i>Rhynchosia yellow</i> <i>mosaic India virus</i>
Seq531	HM777508.1	<i>Rhynchosia yellow</i> <i>mosaic India virus</i>
Seq532	NC_038885.1	<i>Rhynchosia yellow</i> <i>mosaic virus</i>
Seq533	AM999981.1	<i>Rhynchosia yellow</i> <i>mosaic virus</i>
Seq534	NC_024687.1	<i>Rose leaf curl virus</i>
Seq535	KJ739692.1	<i>Rose leaf curl virus</i>
Seq536	NC_038455.1	<i>Sauropus leaf curl</i> <i>virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq537	JN809819.1	<i>Sauropus leaf curl virus</i>
Seq538	NC_006995.1	<i>Senecio yellow mosaic virus</i>
Seq539	AJ876550.1	<i>Senecio yellow mosaic virus</i>
Seq540	NC_030748.1	<i>Senna leaf curl virus</i>
Seq541	KU852742.1	<i>Senna leaf curl virus</i>
Seq542	NC_031456.1	<i>Sida angular mosaic virus</i>
Seq543	KX691407.1	<i>Sida angular mosaic virus</i>
Seq544	NC_038991.1	<i>Sida bright yellow mosaic virus</i>
Seq545	KX348184.1	<i>Sida bright yellow mosaic virus</i>
Seq546	MN013784.1	<i>Sida chlorotic leaf virus</i>
Seq547	NC_038990.1	<i>Sida chlorotic mottle virus</i>
Seq548	KX348183.1	<i>Sida chlorotic mottle virus</i>
Seq549	NC_031455.1	<i>Sida chlorotic vein virus</i>
Seq550	KX691402.1	<i>Sida chlorotic vein virus</i>
Seq551	NC_038456.1	<i>Sida ciliaris golden mosaic virus - Venezuela</i>
Seq552	JX857691.1	<i>Sida ciliaris golden mosaic virus - Venezuela</i>
Seq553	NC_038457.1	<i>Sida common mosaic virus</i>
Seq554	EU710751.1	<i>Sida common mosaic virus</i>
Seq555	NC_038458.1	<i>Sida golden mosaic Braco virus - Jamaica</i>
Seq556	JX162595.1	<i>Sida golden mosaic Braco virus - Jamaica</i>
Seq557	NC_038887.1	<i>Sida golden mosaic Brazil virus</i>
Seq558	FN436001.1	<i>Sida golden mosaic Brazil virus</i>
Seq559	NC_014794.1	<i>Sida golden mosaic</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
		<i>Buckup virus - Jamaica</i>
Seq560	HQ008338.1	<i>Sida golden mosaic Buckup virus - Jamaica</i>
Seq561	NC_004657.1	<i>Sida golden mosaic Costa Rica virus</i>
Seq562	X99550.1	<i>Sida golden mosaic Costa Rica virus</i>
Seq563	NC_014446.1	<i>Sida golden mosaic Florida virus</i>
Seq564	HM003779.1	<i>Sida golden mosaic Florida virus</i>
Seq565	U77963.1	<i>Sida golden mosaic Florida virus</i>
Seq566	NC_038459.1	<i>Sida golden mosaic Lara virus -Venezuela</i>
Seq567	JX857693.1	<i>Sida golden mosaic Lara virus -Venezuela</i>
Seq568	NC_002046.1	<i>Sida golden mosaic virus</i>
Seq569	AF049336.1	<i>Sida golden mosaic virus</i>
Seq570	NC_014130.1	<i>Sida golden mottle virus</i>
Seq571	GU997691.1	<i>Sida golden mottle virus</i>
Seq572	NC_038992.1	<i>Sida golden yellow spot virus</i>
Seq573	KX348185.1	<i>Sida golden yellow spot virus</i>
Seq574	NC_038460.1	<i>Sida golden yellow vein virus</i>
Seq575	U77964.1	<i>Sida golden yellow vein virus</i>
Seq576	MN746033.1	<i>Sida interveinal bright yellow virus</i>
Seq577	NC_007638.1	<i>Sida leaf curl virus</i>
Seq578	AM050730.1	<i>Sida leaf curl virus</i>
Seq579	NC_005330.1	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>
Seq580	AJ557451.1	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>
Seq581	HM585439.1	<i>Sida micrantha mosaic virus - Bolivia</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq582	JX415187.1	<i>Sida micrantha mosaic virus</i>
Seq583	NC_016573.1	<i>Sida mosaic Alagoas virus</i>
Seq584	JF694471.1	<i>Sida mosaic Alagoas virus</i>
Seq585	NC_015046.1	<i>Sida mosaic Bolivia virus 1</i>
Seq586	HM585441.1	<i>Sida mosaic Bolivia virus 1</i>
Seq587	NC_015043.1	<i>Sida mosaic Bolivia virus 2</i>
Seq588	HM585443.1	<i>Sida mosaic Bolivia virus 2</i>
Seq589	NC_008059.1	<i>Sida mosaic Sinaloa virus</i>
Seq590	DQ520944.1	<i>Sida mosaic Sinaloa virus</i>
Seq591	NC_020256.1	<i>Sida mottle Alagoas virus</i>
Seq592	JX871385.1	<i>Sida mottle Alagoas virus</i>
Seq593	AJ557450.1	<i>Sida mottle virus</i>
Seq594	AY090555.1	<i>Sida mottle virus - Brazil</i>
Seq595	NC_020254.1	<i>Sida yellow blotch virus</i>
Seq596	JX871380.1	<i>Sida yellow blotch virus</i>
Seq597	MF163258.1	<i>Sida yellow golden mosaic virus</i>
Seq598	NC_038461.1	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>
Seq599	EU710750.1	<i>Sida yellow leaf curl virus</i>
Seq600	NC_020255.1	<i>Sida yellow mosaic Alagoas virus</i>
Seq601	JX871383.1	<i>Sida yellow mosaic Alagoas virus</i>
Seq602	NC_017987.1	<i>Sida yellow mosaic China virus</i>
Seq603	AM048837.1	<i>Sida yellow mosaic China virus</i>
Seq604	NC_004639.1	<i>Sida yellow mosaic virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq605	AY090558.1	<i>Sida yellow mosaic virus -Brazil</i>
Seq606	NC_008779.1	<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>
Seq607	DQ875872.1	<i>Sida yellow mosaic Yucatan virus</i>
Seq608	NC_016082.1	<i>Sida yellow mottle virus - Cuba</i>
Seq609	JN411687.1	<i>Sida yellow mottle virus - Cuba</i>
Seq610	NC_020253.1	<i>Sida yellow net virus</i>
Seq611	JX871376.1	<i>Sida yellow net virus</i>
Seq612	NC_009547.1	<i>Sida yellow vein Vietnam virus</i>
Seq613	DQ641696.1	<i>Sida yellow vein Vietnam virus</i>
Seq614	NC_004661.1	<i>Sida yellow vein virus</i>
Seq615	Y11099.1	<i>Sida yellow vein virus</i>
Seq616	NC_038462.1	<i>Sidastrum golden leaf spot virus</i>
Seq617	HM357458.2	<i>Sidastrum golden leaf spot virus</i>
Seq618	NC_008317.1	<i>Siegesbeckia yellow vein Guangxi virus</i>
Seq619	AM238692.1	<i>Siegesbeckia yellow vein Guangxi virus</i>
Seq620	NC_008236.1	<i>Siegesbeckia yellow vein virus</i>
Seq621	AM183224.1	<i>Siegesbeckia yellow vein virus</i>
Seq623	NC_024304.1	<i>Solanum mosaic Bolivia virus</i>
Seq624	HM585435.1	<i>Solanum mosaic Bolivia virus</i>
Seq625	NC_003803.1	<i>South African cassava mosaic virus</i>
Seq626	AF155806.1	<i>South African cassava mosaic virus</i>
Seq627	NC_038463.1	<i>Soybean blistering mosaic virus</i>
Seq628	EF016486.1	<i>Soybean blistering mosaic virus</i>
Seq629	NC_014141.1	<i>Soybean chlorotic blotch virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq630	GQ472985.1	<i>Soybean chlorotic blotch virus</i>
Seq631	NC_014140.1	<i>Soybean mild mottle virus</i>
Seq632	GQ472984.1	<i>Soybean mild mottle virus</i>
Seq633	NC_009545.1	<i>Spilanthus yellow vein virus</i>
Seq634	DQ641694.1	<i>Spilanthus yellow vein virus</i>
Seq635	NC_023023.1	<i>Spinach yellow vein Sikar virus</i>
Seq636	KF660223.1	<i>Spinach yellow vein Sikar virus</i>
Seq637	NC_007339.1	<i>Squash leaf curl China virus</i>
Seq638	AF509743.1	<i>Squash leaf curl China virus</i>
Seq639	EU487031.1	<i>Squash leaf curl China virus</i>
Seq640	AM286794.1	<i>Squash leaf curl China virus</i>
Seq641	EU543562.1	<i>Squash leaf curl China virus</i>
Seq642	NC_005845.1	<i>Squash leaf curl Philippines virus</i>
Seq643	AB085793.1	<i>Squash leaf curl Philippines virus</i>
Seq644	NC_001936.1	<i>Squash leaf curl virus</i>
Seq645	M38183.1	<i>Squash leaf curl virus</i>
Seq646	NC_004651.1	<i>Squash leaf curl Yunnan virus</i>
Seq647	AJ420319.1	<i>Squash leaf curl Yunnan virus</i>
Seq648	NC_004645.1	<i>Squash mild leaf curl virus - Imperial Valley</i>
Seq649	AF421552.1	<i>Squash mild leaf curl virus - Imperial Valley</i>
Seq650	NC_003861.1	<i>Sri Lankan cassava mosaic virus</i>
Seq651	AJ314737.1	<i>Sri Lankan cassava mosaic virus</i>
Seq652	AJ579307.1	<i>Sri Lankan cassava mosaic virus</i>
Seq653	NC_004091.1	<i>Stachytarpheta leaf</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
		<i>curl virus</i>
Seq654	AJ495814.1	<i>Stachytarpheta leaf curl virus</i>
Seq655	NC_013019.1	<i>Sunn hemp leaf distortion virus</i>
Seq656	FJ455449.1	<i>Sunn hemp leaf distortion virus</i>
Seq657	NC_043433.1	<i>Sweet potato golden vein Korea virus</i>
Seq658	KT992056.1	<i>Sweet potato golden vein Korea virus</i>
Seq659	NC_013465.1	<i>Sweet potato leaf curl Canary virus</i>
Seq660	FJ529203.1	<i>Sweet potato leaf curl Canary virus</i>
Seq661	NC_038464.1	<i>Sweet potato leaf curl China virus</i>
Seq662	DQ512731.1	<i>Sweet potato leaf curl China virus</i>
Seq663	NC_004640.1	<i>Sweet potato leaf curl Georgia virus</i>
Seq664	AF326775.1	<i>Sweet potato leaf curl Georgia virus</i>
Seq665	NC_024693.1	<i>Sweet potato leaf curl Guangxi virus</i>
Seq666	KJ476510.2	<i>Sweet potato leaf curl Guangxi virus</i>
Seq667	NC_021719.1	<i>Sweet potato leaf curl Henan virus</i>
Seq668	KC907406.1	<i>Sweet potato leaf curl Henan virus</i>
Seq669	MH577011.1	<i>Sweet potato leaf curl Hubei virus</i>
Seq670	NC_025681.1	<i>Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus</i>
Seq671	HQ393477.1	<i>Sweet potato leaf curl Sao Paulo virus</i>
Seq672	KU323597.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq673	NC_038465.1	<i>Sweet potato leaf curl Sichuan virus 1</i>
Seq674	KC488316.1	<i>Sweet potato leaf curl Sichuan virus 1</i>
Seq675	NC_022586.1	<i>Sweet potato leaf curl Sichuan virus 2</i>
Seq676	KF156759.1	<i>Sweet potato leaf</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq677	NC_015317.1	<i>curl Sichuan virus 2</i> <i>Sweet potato leaf curl South Carolina virus</i>
Seq678	HQ333144.1	<i>Sweet potato leaf curl South Carolina virus</i>
Seq679	NC_004650.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq680	AF104036.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq681	EU253456.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq682	AJ132548.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq683	FJ969829.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq684	FJ515898.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq685	AJ586885.2	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq686	AB433786.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq687	FJ969830.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq688	HQ393456.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq689	DQ644562.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq690	HQ393447.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq691	HQ393473.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq692	HQ333138.1	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>
Seq693	EF456744.2	<i>Sweet potato leaf curl virus - Spain</i>
Seq694	NC_038466.1	<i>Sweet potato mosaic virus - Brazil</i>
Seq695	FJ969831.1	<i>Sweet potato mosaic virus - Brazil</i>
Seq696	NC_038994.1	<i>Synedrella yellow vein clearing virus</i>
Seq697	KX363443.1	<i>Synedrella yellow vein clearing virus</i>
Seq698	NC_030403.1	<i>Telfairia golden</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
		<i>mosaic virus - Cameroon</i>
Seq699	KT454832.1	<i>Telfairia golden mosaic virus - Cameroon</i>
Seq700	NC_003722.1	<i>Tobacco curly shoot virus</i>
Seq701	AJ457986.1	<i>Tobacco curly shoot virus</i>
Seq702	NC_038888.1	<i>Tobacco leaf curl Comoros virus</i>
Seq703	AM701760.1	<i>Tobacco leaf curl Comoros virus</i>
Seq704	NC_035887.1	<i>Tobacco leaf curl Cuba virus</i>
Seq705	KX011471.1	<i>Tobacco leaf curl Cuba virus</i>
Seq706	MH514011.1	<i>Tobacco leaf curl Dominican Republic virus</i>
Seq707	NC_014596.1	<i>Tobacco leaf curl Pusa virus</i>
Seq708	HQ180391.1	<i>Tobacco leaf curl Pusa virus</i>
Seq709	NC_009553.1	<i>Tobacco leaf curl Thailand virus</i>
Seq710	DQ871221.1	<i>Tobacco leaf curl Thailand virus</i>
Seq711	NC_004356.1	<i>Tobacco leaf curl Yunnan virus</i>
Seq712	AJ512761.1	<i>Tobacco leaf curl Yunnan virus</i>
Seq713	NC_002817.1	<i>Tobacco leaf curl Zimbabwe virus</i>
Seq714	AF350330.1	<i>Tobacco leaf curl Zimbabwe virus</i>
Seq715	NC_038890.1	<i>Tobacco leaf rugose virus</i>
Seq716	AJ488768.2	<i>Tobacco leaf rugose virus</i>
Seq717	NC_038893.1	<i>Tobacco mottle leaf curl virus</i>
Seq718	FM160943.1	<i>Tobacco mottle leaf curl virus</i>
Seq719	NC_015627.1	<i>Tobacco yellow crinkle virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq720	FJ213931.1	<i>Tobacco yellow crinkle virus</i>
Seq721	NC_038467.1	<i>Tomato bright yellow mosaic virus</i>
Seq722	KC791690.1	<i>Tomato bright yellow mosaic virus</i>
Seq723	NC_038468.1	<i>Tomato bright yellow mottle virus</i>
Seq724	KC791691.1	<i>Tomato bright yellow mottle virus</i>
Seq725	NC_005843.1	<i>Tomato chino La Paz virus</i>
Seq726	AY339618.1	<i>Tomato chino La Paz virus</i>
Seq727	JN676150.1	<i>Tomato Chino La Paz virus - SLP</i>
Seq728	AY339619.1	<i>Tomato chino La Paz virus</i>
Seq729	MK558058.1	<i>Tomato chlorotic leaf curl virus</i>
Seq730	NC_015962.1	<i>Tomato chlorotic leaf distortion virus - Venezuela</i>
Seq731	HQ201952.1	<i>Tomato chlorotic leaf distortion virus - Venezuela</i>
Seq732	NC_038965.1	<i>Tomato chlorotic mottle Guyane virus</i>
Seq733	KR263181.1	<i>Tomato chlorotic mottle Guyane virus</i>
Seq734	NC_003664.1	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>
Seq735	AF490004.1	<i>Tomato chlorotic mottle virus - Brazil</i>
Seq736	KC706561.1	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>
Seq737	AY090557.1	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>
Seq738	NC_010835.1	<i>Tomato common mosaic virus</i>
Seq739	EU710754.1	<i>Tomato common mosaic virus</i>
Seq740	NC_004675.1	<i>Tomato curly stunt virus</i>
Seq741	AF261885.2	<i>Tomato curly stunt virus - South Africa</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq742	NC_016580.1	<i>Tomato dwarf leaf virus</i>
Seq743	JN564749.1	<i>Tomato dwarf leaf virus</i>
Seq744	NC_026761.1	<i>Tomato enation leaf curl virus</i>
Seq745	KP195260.1	<i>Tomato enation leaf curl virus</i>
Seq746	NC_043122.1	<i>Tomato golden leaf distortion virus</i>
Seq747	HM357456.2	<i>Tomato golden leaf distortion virus</i>
Seq748	NC_021579.1	<i>Tomato golden leaf spot virus</i>
Seq749	KC626021.1	<i>Tomato golden leaf spot virus</i>
Seq750	NC_001507.1	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
Seq751	K02029.1	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
Seq752	NC_008058.1	<i>Tomato golden mottle virus</i>
Seq753	DQ520943.1	<i>Tomato golden mottle virus</i>
Seq754	NC_038807.1	<i>Tomato golden vein virus</i>
Seq755	JF803254.1	<i>Tomato golden vein virus</i>
Seq756	NC_038469.1	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>
Seq757	JF803252.1	<i>Tomato interveinal chlorosis virus</i>
Seq758	NC_038963.1	<i>Tomato latent virus</i>
Seq759	KM926624.1	<i>Tomato latent virus</i>
Seq760	NC_038894.1	<i>Tomato leaf curl Anjouan virus</i>
Seq761	AM701758.1	<i>Tomato leaf curl Anjouan virus</i>
Seq762	NC_009030.1	<i>Tomato leaf curl Arusha virus</i>
Seq763	EF194760.1	<i>Tomato leaf curl Arusha virus</i>
Seq764	NC_003891.1	<i>Tomato leaf curl Bangalore virus</i>
Seq765	Z48182.1	<i>Tomato leaf curl</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq766	KF663698.1	<i>Bangalore virus</i> <i>Tomato leaf curl</i>
Seq767	AF295401.1	<i>Bangalore virus</i> <i>Tomato leaf curl</i>
Seq768	AF165098.1	<i>Bangalore virus</i> <i>Tomato leaf curl</i>
Seq769	DQ852623.2	<i>Bangalore virus</i> <i>Tomato leaf curl</i> <i>Bangalore virus -</i> <i>India</i>
Seq770	NC_004614.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Bangladesh virus</i>
Seq771	AF188481.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Bangladesh virus</i>
Seq772	NC_033779.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Burkina Faso virus</i>
Seq773	KX853168.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Burkina Faso virus</i>
Seq774	NC_010439.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Cebu virus</i>
Seq775	EU487042.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Cebu virus</i>
Seq776	NC_005320.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>China virus</i>
Seq777	AJ558118.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>China virus</i>
Seq778	JF681158.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>China virus</i>
Seq779	AJ558119.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>China virus</i>
Seq780	AJ704603.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>China virus</i>
Seq781	NC_006876.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Comoros virus</i>
Seq782	AJ865340.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Comoros virus</i>
Seq783	AM701761.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Comoros virus</i>
Seq784	NC_038896.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Diana virus</i>
Seq785	AM701765.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Diana virus</i>
Seq786	NC_010313.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Ghana virus</i>
Seq787	EU350585.1	<i>Tomato leaf curl virus</i> <i>Ghana virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq788	FR873228.1	<i>Tomato leaf curl virus</i> <i>Ghana virus</i>
Seq789	NC_008373.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Guangdong virus</i>
Seq790	AY602165.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Guangdong virus</i>
Seq791	NC_008329.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Guangxi virus</i>
Seq792	AM236784.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Guangxi virus</i>
Seq793	NC_004558.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Gujarat virus</i>
Seq794	AY190290.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Gujarat virus</i>
Seq795	KF150142.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Hainan virus</i>
Seq796	NC_015124.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Hanoi virus</i>
Seq797	HQ162270.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Hanoi virus - Vietnam</i>
Seq798	NC_010791.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Hsinchu virus</i>
Seq799	EU596959.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Hsinchu virus</i>
Seq800	NC_005842.1	<i>Tomato leaf curl Iran</i> <i>virus</i>
Seq801	AY297924.1	<i>Tomato leaf curl Iran</i> <i>virus</i>
Seq802	AB236323.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Japan virus</i>
Seq803	NC_005031.1	<i>Tomato leaf curl Java</i> <i>virus</i>
Seq804	AB100304.1	<i>Tomato leaf curl Java</i> <i>virus</i>
Seq805	AB162141.1	<i>Tomato leaf curl Java</i> <i>virus</i>
Seq806	HM991146.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Joydebpur virus</i>
Seq807	NC_003897.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Karnataka virus</i>
Seq808	U38239.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Karnataka virus</i>
Seq809	KF551578.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Karnataka virus 2</i>
Seq810	KF551585.1	<i>Tomato leaf curl</i> <i>Karnataka virus 3</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq811	NC_011135.1	<i>Tomato leaf curl Kerala virus</i>
Seq812	EU910141.1	<i>Tomato leaf curl Kerala virus</i>
Seq813	MT045996.1	<i>Tomato leaf curl Kunene virus</i>
Seq814	NC_004613.1	<i>Tomato leaf curl Laos virus</i>
Seq815	AF195782.1	<i>Tomato leaf curl Laos virus</i>
Seq816	NC_023312.1	<i>Tomato leaf curl Liwa virus</i>
Seq817	HF912280.1	<i>Tomato leaf curl Liwa virus</i>
Seq818	NC_006874.1	<i>Tomato leaf curl Madagascar virus</i>
Seq819	AJ865338.1	<i>Tomato leaf curl Madagascar virus</i>
Seq820	AJ865339.1	<i>Tomato leaf curl Madagascar virus</i>
Seq821	MH410152.1	<i>Tomato leaf curl Mahe virus</i>
Seq822	NC_004648.1	<i>Tomato leaf curl Malaysia virus</i>
Seq823	AF327436.1	<i>Tomato leaf curl Malaysia virus</i>
Seq824	NC_005348.1	<i>Tomato leaf curl Mali virus</i>
Seq825	AY502936.1	<i>Tomato leaf curl Mali virus</i>
Seq826	NC_010440.1	<i>Tomato leaf curl Mindanao virus</i>
Seq827	EU487046.1	<i>Tomato leaf curl Mindanao virus</i>
Seq828	NC_038897.1	<i>Tomato leaf curl Moheli virus</i>
Seq829	AM701763.1	<i>Tomato leaf curl Moheli virus</i>
Seq830	NC_038899.1	<i>Tomato leaf curl Namakely virus</i>
Seq831	AM701764.1	<i>Tomato leaf curl Namakely virus</i>
Seq832	NC_004611.1	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>
Seq833	U15015.2	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq834	NC_038470.1	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus 2</i>
Seq835	JQ897969.1	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus 2</i>
Seq836	NC_038471.1	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus 4</i>
Seq837	KF551592.1	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus 4</i>
Seq838	EF450316.1	<i>Tomato leaf curl New Delhi virus 5</i>
Seq839	NC_012206.1	<i>Tomato leaf curl Nigeria virus</i>
Seq840	FJ685621.1	<i>Tomato leaf curl Nigeria virus</i>
Seq841	NC_010840.1	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i>
Seq842	AM884015.2	<i>Tomato leaf curl Palampur virus</i>
Seq843	NC_012492.1	<i>Tomato leaf curl Patna virus</i>
Seq844	EU862323.1	<i>Tomato leaf curl Patna virus</i>
Seq845	NC_005032.1	<i>Tomato leaf curl Philippines virus</i>
Seq846	AB050597.1	<i>Tomato leaf curl Philippines virus</i>
Seq847	AB377113.1	<i>Tomato leaf curl Philippines virus</i>
Seq848	AB307731.1	<i>Tomato leaf curl Philippines virus</i>
Seq849	NC_008517.1	<i>Tomato leaf curl Pune virus</i>
Seq850	AY754814.1	<i>Tomato leaf curl Pune virus - India</i>
Seq851	NC_035481.1	<i>Tomato leaf curl purple vein virus</i>
Seq852	KY196216.1	<i>Tomato leaf curl purple vein virus</i>
Seq853	NC_038472.1	<i>Tomato leaf curl Rajasthan virus - India</i>
Seq854	DQ339117.1	<i>Tomato leaf curl Rajasthan virus - India</i>
Seq855	NC_009031.1	<i>Tomato leaf curl Seychelles virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq856	AM491778.1	<i>Tomato leaf curl Seychelles virus</i>
Seq857	NC_009606.1	<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>
Seq858	AJ608286.1	<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>
Seq859	NC_004647.1	<i>Tomato leaf curl Sri Lanka virus</i>
Seq860	AF274349.1	<i>Tomato leaf curl Sri Lanka virus</i>
Seq861	NC_005855.1	<i>Tomato leaf curl Sudan virus</i>
Seq862	AY044137.1	<i>Tomato leaf curl Sudan virus</i>
Seq863	KC763630.1	<i>Tomato leaf curl Sudan virus</i>
Seq864	AY044139.1	<i>Tomato leaf curl Sudan virus</i>
Seq865	EF110891.1	<i>Tomato leaf curl Sudan virus</i>
Seq866	NC_013413.1	<i>Tomato leaf curl Sulawesi virus</i>
Seq867	FJ237617.1	<i>Tomato leaf curl Sulawesi virus</i>
Seq868	NC_003898.1	<i>Tomato leaf curl Taiwan virus</i>
Seq869	U88692.1	<i>Tomato leaf curl virus - Taiwan</i>
Seq870	JQ867093.1	<i>Tomato leaf curl Taiwan virus</i>
Seq871	GU723730.1	<i>Tomato leaf curl Taiwan virus</i>
Seq872	DQ866128.1	<i>Tomato leaf curl Taiwan virus</i>
Seq873	DQ519575.1	<i>Tomato leaf curl Tanzania virus</i>
Seq874	NC_038901.1	<i>Tomato leaf curl Toliara virus</i>
Seq875	AM701768.1	<i>Tomato leaf curl Toliara virus</i>
Seq876	NC_038473.1	<i>Tomato leaf curl Uganda virus</i>
Seq877	DQ127170.1	<i>Tomato leaf curl Uganda virus</i>
Seq878	NC_004153.1	<i>Tomato leaf curl Vietnam virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq879	AF264063.1	<i>Tomato leaf curl Vietnam virus</i>
Seq880	S53251.1	<i>Tomato leaf curl virus</i>
Seq881	AF084006.1	<i>Tomato leaf curl virus</i>
Seq882	DQ629101.2	<i>Tomato leaf curl virus</i>
Seq883	FJ514798.1	<i>Tomato leaf curl virus</i>
Seq884	AY754812.1	<i>Tomato leaf curl virus</i>
Seq885	NC_014510.2	<i>Tomato leaf deformation virus</i>
Seq886	GQ334472.2	<i>Tomato leaf deformation virus</i>
Seq887	NC_038474.1	<i>Tomato leaf distortion virus</i>
Seq888	EU710749.1	<i>Tomato leaf distortion virus</i>
Seq889	NC_010833.1	<i>Tomato mild mosaic virus</i>
Seq890	EU710752.1	<i>Tomato mild mosaic virus</i>
Seq891	NC_009490.1	<i>Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus</i>
Seq892	AY927277.1	<i>Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus - Venezuela</i>
Seq893	NC_003867.1	<i>Tomato mosaic Havana virus</i>
Seq894	Y14874.1	<i>Tomato mosaic Havana virus</i>
Seq895	MN147863.1	<i>Tomato mosaic severe dwarf virus</i>
Seq896	KC706615.1	<i>Tomato mottle leaf curl virus</i>
Seq897	NC_001828.1	<i>Tomato mottle Taino virus</i>
Seq898	AF012300.1	<i>Tomato mottle Taino virus</i>
Seq899	NC_001938.1	<i>Tomato mottle virus</i>
Seq900	L14460.1	<i>Tomato mottle virus - Florida</i>
Seq901	NC_025265.1	<i>Tomato mottle wrinkle virus</i>
Seq902	JQ714137.2	<i>Tomato mottle wrinkle virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq903	NC_002555.1	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>
Seq904	AF291705.1	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>
Seq905	NC_020257.1	<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>
Seq906	JN381819.1	<i>Tomato rugose yellow leaf curl virus</i>
Seq907	KP195267.1	<i>Tomato severe leaf curl Kalakada virus</i>
Seq908	NC_004642.1	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>
Seq909	AF130415.2	<i>Tomato severe leaf curl virus - Guatemala</i>
Seq910	JN680352.1	<i>Tomato severe leaf curl virus - Huasteca</i>
Seq911	AJ508784.1	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>
Seq912	NC_009607.1	<i>Tomato severe rugose virus</i>
Seq913	DQ207749.1	<i>Tomato severe rugose virus</i>
Seq914	MK440292.1	<i>Tomato twisted leaf virus</i>
Seq915	MK423208.1	<i>Tomato vein clearing leaf deformation virus</i>
Seq916	KY449275.1	<i>Tomato wrinkled mosaic virus</i>
Seq917	NC_011024.1	<i>Tomato yellow leaf curl Axarquia virus</i>
Seq918	EU734831.1	<i>Tomato yellow leaf curl Axarquia virus</i>
Seq919	NC_004044.1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
Seq920	AF311734.1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
Seq921	AJ319675.1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
Seq922	AJ457985.1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
Seq923	AM980509.1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
Seq924	DQ256460.1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq925	AJ319674.1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
Seq926	EF011559.1	<i>Tomato yellow leaf curl China virus</i>
Seq927	NC_008374.1	<i>Tomato yellow leaf curl Guangdong virus</i>
Seq928	AY602166.1	<i>Tomato yellow leaf curl Guangdong virus</i>
Seq929	NC_008267.1	<i>Tomato yellow leaf curl Indonesia virus</i>
Seq930	AF189018.4	<i>Tomato yellow leaf curl Indonesia virus</i>
Seq931	NC_005812.1	<i>Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus</i>
Seq932	AF511529.1	<i>Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus -Thailand</i>
Seq933	NC_004569.1	<i>Tomato yellow leaf curl Malaga virus</i>
Seq934	AF271234.1	<i>Tomato yellow leaf curl Malaga virus</i>
Seq935	NC_027215.1	<i>Tomato yellow leaf curl Mali virus</i>
Seq936	LM651400.1	<i>Tomato yellow leaf curl Mali virus</i>
Seq937	DQ358913.1	<i>Tomato yellow leaf curl Mali virus - Ethiopia</i>
Seq938	AY502934.1	<i>Tomato yellow leaf curl Mali virus</i>
Seq939	NC_003828.1	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>
Seq940	X61153.1	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>
Seq941	NC_029995.1	<i>Tomato yellow leaf curl Shuangbai virus</i>
Seq942	KT962229.1	<i>Tomato yellow leaf curl Shuangbai virus</i>
Seq943	NC_000869.1	<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i>
Seq944	AF141922.1	<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i>
Seq945	AY514630.1	<i>Tomato yellow leaf curl Thailand virus</i>
Seq946	AJ495812.1	<i>Tomato yellow leaf</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq947	AF206674.1	<i>curl Thailand virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq948	AY514632.1	<i>curl Thailand virus-</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq949	NC_009548.1	<i>curl Thailand virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq950	DQ641697.1	<i>curl Vietnam virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq951	NC_004005.1	<i>curl Vietnam virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq952	AJ489258.1	<i>curl virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq953	GU076454.1	<i>curl virus - Almeria</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq954	AJ132711.1	<i>curl virus - Iran</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq955	EU635776.1	<i>curl virus - Iran</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq956	GU076442.1	<i>curl virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq957	X76319.1	<i>curl virus - Iran</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq958	NC_021341.1	<i>curl virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq959	KC686705.1	<i>curl Yunnan virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq960	MN145942.1	<i>curl Yunnan virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq961	NC_011348.1	<i>deformation dwarf</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq962	FJ174698.1	<i>virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq963	NC_005852.2	<i>distortion virus</i> <i>Tomato yellow leaf</i>
Seq964	AY508993.2	<i>distortion virus</i> <i>Tomato yellow</i>
Seq965	NC_019946.1	<i>margin leaf curl virus</i> <i>Tomato yellow</i>
Seq966	KC176780.1	<i>margin leaf curl virus</i> <i>Tomato yellow</i>
Seq967	NC_007726.1	<i>mottle virus -Grecia</i> <i>Tomato yellow</i>
Seq968	DQ336350.1	<i>mottle virus -Grecia</i> <i>Tomato yellow spot</i>
		<i>virus</i> <i>Tomato yellow spot</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq969	NC_010949.1	<i>Tomato yellow vein</i> <i>streak virus</i>
Seq970	EF417915.1	<i>Tomato yellow vein</i> <i>streak virus</i>
Seq971	NC_038983.1	<i>Triumfetta yellow</i> <i>mosaic virus</i>
Seq972	KU131588.1	<i>Triumfetta yellow</i> <i>mosaic virus</i>
Seq973	NC_038985.1	<i>Velvet bean golden</i> <i>mosaic virus</i>
Seq974	NC_013414.1	<i>Velvet bean severe</i> <i>mosaic virus</i>
Seq975	KU569583.1	<i>Velvet bean golden</i> <i>mosaic virus</i>
Seq976	FN543425.1	<i>Velvet bean severe</i> <i>mosaic virus</i>
Seq977	KX156611.1	<i>Verbena mottle virus</i> <i>-Florida</i>
Seq978	NC_032118.1	<i>Vernonia crinkle virus</i>
Seq979	KX831132.1	<i>Vernonia crinkle virus</i>
Seq980	NC_043514.1	<i>Vernonia yellow vein</i> <i>Fujian virus</i>
Seq981	JF265670.1	<i>Vernonia yellow vein</i> <i>Fujian virus</i>
Seq982	NC_007730.2	<i>Vernonia yellow vein</i> <i>virus</i>
Seq983	AM182232.2	<i>Vernonia yellow vein</i> <i>virus</i>
Seq984	NC_038475.1	<i>Vigna yellow mosaic</i> <i>virus -Yautepec</i>
Seq985	KC430936.1	<i>Vigna yellow mosaic</i> <i>virus -Yautepec</i>
Seq986	NC_028124.1	<i>Vinca leaf curl virus</i>
Seq987	KR612272.1	<i>Vinca leaf curl virus</i>
Seq988	NC_003708.1	<i>Watermelon</i> <i>chlorotic stunt virus</i>
Seq989	AJ012081.1	<i>Watermelon</i> <i>chlorotic stunt virus</i>
Seq990	NC_016575.1	<i>West African</i> <i>Asystasia virus 1</i>
Seq991	JF694484.1	<i>West African</i> <i>Asystasia virus 1</i>
Seq992	NC_038476.1	<i>West African</i> <i>Asystasia virus 2</i>

ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus	ID	No. Acceso GenBank	Begomovirus
Seq993	JF694486.1	<i>West African Asystasia virus 2</i>	Seq1005	NC_038972.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 7</i>
Seq994	KT444609.1	<i>West African Asystasia virus 3</i>	Seq1006	KT099156.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 7</i>
Seq995	NC_038967.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 1</i>	Seq1007	NC_010948.1	<i>Wissadula golden mosaic virus</i>
Seq996	KT099124.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 1</i>	Seq1008	DQ395343.2	<i>Wissadula golden mosaic virus</i>
Seq997	NC_038968.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 2</i>	Seq1009	KX691411.1	<i>Wissadula golden mosaic virus</i>
Seq998	KT099125.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 2</i>	Seq1010	NC_031451.1	<i>Wissadula golden mosaic virus</i>
Seq999	NC_038969.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 3</i>	Seq1011	EF523478.1	<i>Tomato yellow leaf curl virus -Sinaloa</i>
Seq1000	KT099127.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 3</i>	Seq1012	KX427166.1	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
Seq1001	NC_038970.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 4</i>	Seq1013	KX440611.1	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
Seq1002	KT099128.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 4</i>	Seq1014	MF187211.1	<i>Squash leaf curl virus</i>
Seq1003	NC_038971.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 6</i>	Seq1015	MN625831.1	<i>Cucurbit leaf crumple virus</i>
Seq1004	KT099139.1	<i>Whitefly-associated begomovirus 6</i>			

ANEXO E: Se presenta los siRNAs del 51 al 238, que continúan de la Tabla 8. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de ToChLPV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
51	UUUCUAACAUACCCACACU	AGUGUGGGUAUGUUAGAAA	645 - 663	88.14
52	AAUUUGAGGAUCGACUAAC	GUUAGUCGAUCCUCAAAUU	1082 - 1100	88.02
53	UUUUGAAGAGAGCUCAAUU	AAUUGAGCUCUCUUCAAAA	734 - 752	88.01
54	UAUAUUUACAAAAAUGCCC	GGGCAUUUUUGUAAAUAUA	703 - 721	87.91
55	UUUACAAAAAUGCCCUUAG	CUAAGGGCAUUUUUGUAAA	699 - 717	87.91
56	AACGACAAUUUAUAGACC	GGUCUAUAAAUUUGUCGUU	983 - 1001	87.63
57	ACUAUAUUUACAAAAAUGC	GCAUUUUUGUAAAUAUAGU	705 - 723	87.47
58	AAUUGCAAGAGAAUUGCAC	GUGCAAUUCUCUUGCAAUU	553 - 571	87.06
59	AACUAGGUCAACACAUUUC	GAAUUGUGUUGACCUAGUU	445 - 463	87
60	AAUUGACUACACACUCGU	ACGAGUGUGUAGUCUAAUU	934 - 952	86.96
61	UUUUUUUCUAACAUACCCA	UGGGUAUGUUAGAAAAUAA	649 - 667	86.74
62	AUCCGGUAAUAUUUAJACGG	CCGUAAUAAUUUACCGGAU	840 - 858	86.52
63	UUUUCAGUAUCACAACUG	CAGGUUGUGAUACUGAAAA	211 - 229	86.51
64	UUUUUGAAGAGAGCUCAAU	AUUGAGCUCUCUUCAAAA	735 - 753	86.37

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
65	AAAGAGUUUCUUUUUCAGU	ACUGAAAAAGAAACUCUUU	222 - 240	86.37
66	UGUUCUUUAACCAAGGAAG	CUUCCUUGGUUAAAGAACA	627 - 645	86.18
67	UAGGUCAACACAUUCCAU	AUGGAAAUGUGUUGACCUA	442 - 460	86.15
68	AAAAGUUUAUUUAAAUUC	GAAUUUAUAAUAAACUUUU	674 - 692	86.06
69	UUUCCAAUCUCUCCUUCA	UGAAGGAAGAGAUUGGAAA	138 - 156	85.97
70	UUCUUUUUCAGUAUCACAA	UUGUGAUACUGAAAAAGAA	215 - 233	85.95
71	AAUUCUAAAAAUUUUUUC	GAAAAUAAUUUUUAGAAUU	660 - 678	85.93
72	AAUAUAUCAAAAUUGCAAG	CUUGCAAUUUUGAUUAUUU	563 - 581	85.89
73	UAGUAUAAUCAUCGAGGGU	ACCCUCGAUGAUUAUACUA	40 - 58	85.78
74	UAGAGCAACUAUUACGGUU	AACCGUAUAGUUGCUCUA	602 - 620	85.7
75	AUUGAAAGUUCUAUAGGAC	GUCCUAUAGAACUUUCAU	797 - 815	85.51
76	UAUAAAUUCUAAAAUUUAU	AUAAUUUUUAGAAUUUAUA	664 - 682	85.31
77	CUAUUUUACAAAAUGCC	GGCAUUUUUGUAAAUAUAG	704 - 722	85.27
78	UCGAAGGCAAAUUCAAAAC	GUUUUGAAUUUGCCUUCGA	497 - 515	85.26
79	UUACAAAAUGCCCUUAGU	ACUAAGGGCAUUUUUGUAA	698 - 716	85.18
80	AUGAUUAAUUUGGUAGGGG	CCCCUACCAAAUAUCAU	86 - 104	85.14
81	AUUUUCAAAUCUAUAUAU	AUAUAUAGAUUUUGAAAAU	1017 - 1035	84.97
82	AAAGUUCUAUAGGACCUUC	GAAGGUCCUAUAGAACUUU	793 - 811	84.95
83	AAAAAAUAUAUCAAAAUUG	CAAUUUUGAUUAUUUUUUU	567 - 585	84.94
84	AAAUAAGGACCCAGUAUAC	GUUAUCUGGGUCCUUAUUU	768 - 786	84.81
85	UAAAAAAUAUAUCAAAAUU	AAUUUUGAUUAUUUUUUUA	568 - 586	84.78
86	AUGGAGAUACAAUCGAAUG	CAUUCGAUUGUAUCUCCAU	368 - 386	84.7
87	UAUUAAAGAGAAGCUCCCA	UGGGAGCUUCUCUUUAAUA	241 - 259	84.68
88	AUUGGCUAACUUUAUCCAG	CUGGAUAAAGUUAGCCAAU	909 - 927	84.58
89	AAAAGAGUUUCUUUUUCAG	CUGAAAAAGAAACUCUUUU	223 - 241	84.51
90	AUUCUAAAAUUUAUUUUUCU	AGAAAAUAAUUUUUAGAAU	659 - 677	84.49
91	UUUAUAGACCACAAAACAA	UUGUUUUUGUGGUCUAUAAA	974 - 992	84.42
92	UAUUUAUAAAUUCUAAAAU	AUUUUUAGAAUUUAUAAUA	667 - 685	84.3
93	UAAAAAUUAUUUUCUAACA	UGUUAGAAAAUAAUUUUUA	655 - 673	84.25
94	UAUACCCAUAUCCUAGAG	CUCUAAGGAAUUGGGUAUA	754 - 772	84.2
95	CUUUUUCAGUAUCACAACC	GGUUGUGAUACUGAAAAAG	213 - 231	84.08
96	UUCCAAAAAAGUUUAUUUAU	AUAUAUAAACUUUUUUGGAA	680 - 698	84.04
97	AUACCCAUAUCCUAGAGU	ACUCUAAGGAAUUGGGUAU	753 - 771	83.96
98	AAAGUUUAUUUAUAAAUUCU	AGAAUUUAUAAUAAACUUU	673 - 691	83.63
99	UACCCAUAUCCUAGAGUU	AACUCUAAGGAAUUGGGUA	752 - 770	83.56
100	UUAAGAGAAGCUCCCAA	UUUGGGAGCUUCUCUUUAA	239 - 257	83.46
101	AAUUCAAAACGCAAAAUUG	CAAUUUUGCGUUUUGAAUU	488 - 506	83.41
102	UCAAAACGCAAAAUUGCCG	CGGCAAUUUUGCGUUUUGA	485 - 503	83.25
103	UGAUUAUUUUUGGUAGGGU	ACCCCUACCAAAUAUCA	85 - 103	83.08
104	UGAUGAUUAUUUUGGUAGG	CCUACCAAAUAUCAUCA	88 - 106	83.05
105	UAUAGGACCUUCUAGUAUA	UAUACUAGAAGGUCCUAUA	786 - 804	83.04
106	AUUUUCUAACAUACCCACA	UGUGGGUAUGUUAGAAAAU	647 - 665	82.85
107	UAUAAUAAGGACCCAGUA	UACUGGGUCCUUAUUUAUA	771 - 789	82.77
108	ACGAAAUUCCAGAAUUGG	CCAAUUCUGGAAAUUCGU	881 - 899	82.58
109	AUAAAUAAGGACCCAGUAU	AUACUGGGUCCUUAUUUAU	770 - 788	82.56

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
110	UUAUAAAUUCUAAAAUUA	UAAUUUUUAGAAUUUAUAA	665 - 683	82.52
111	UGUAAUAAUAGACUACA	UGUAGUCUAAUUUAUAAACA	941 - 959	82.47
112	AUAAAAAUUAUCAAAAAU	AUUUUGAUUAUUUUUUUAU	569 - 587	82.37
113	CUUAUCAAAUUUACGGCCC	GGGCCGUAAAUUUGAUAAAG	1120 - 1138	82.32
114	AAAUUGCCGAUUCUUCGAC	GUCGAAGAAUCGGCAAUUU	475 - 493	82.3
115	ACACUGUUCUUUAACCAAG	CUUGGUUAAAGAACAGUGU	631 - 649	82.13
116	AGAGUUUUUGAAGAGAGCU	AGCUCUCUUCAAAACUCU	739 - 757	82.1
117	UACAAAAUAGCCCUAGUU	AACUAAGGGCAUUUUUGUA	697 - 715	82.08
118	CUAGUAUAAAUAAGGACCC	GGGUCCUUAUUUAUACUAG	775 - 793	82.07
119	UAAUAAGGACCCAGUAUA	UAUACUGGGUCCUUAUUUA	769 - 787	82.02
120	AUAUUUACAAAAUGCCCU	AGGGCAUUUUUGUAAAUAU	702 - 720	81.91
121	UCAAAAUUGCAAGAGAAUU	AAUUCUCUUGCAAUUUUUGA	557 - 575	81.91
122	AAACCCUAGAGCAACUAUU	AAUAGUUGCUCUAGGGUUU	608 - 626	81.72
123	UUUAUUUAAAUUCUAAAA	UUUUAGAAUUUAUAAUAAA	669 - 687	81.65
124	AUUUAUAGACCACAAAACA	UGUUUUGUGGUCUAUAAAU	975 - 993	81.42
125	UCAACUAGGUCAACACAUU	AAUGUGUUGACCUAGUUGA	447 - 465	81.38
126	AUAACGACAAUUUAUAGA	UCUAUAAAUUUGUCGUUAU	985 - 1003	81.36
127	AUUUAUAAAUUCUAAAAUU	AAUUUUUAGAAUUUAUAAU	666 - 684	81.35
128	AAAAUAUUCAAAAUUGCA	UGCAAUUUUUGAUUAUUUU	565 - 583	81.25
129	AGUUGUUAUAAAUAGACU	AGUCUAAUUAUUAACAACU	944 - 962	81.21
130	UUAGUUCCAAAAAAGUUUA	UAAACUUUUUUGGAACUAA	684 - 702	81.15
131	AAUGCGGAUUUAUAAAGAG	CUCUUUAAUUAUCCGCAUU	250 - 268	81.07
132	UAUCAAAAUUGCAAGAGAA	UUCUCUUGCAAUUUUUGAUA	559 - 577	81.01
133	UUAUUAUAAAUUCUAAAA	UUUUUAGAAUUUAUAAUAA	668 - 686	81
134	CUAAAAAUUUUUUCUAAC	GUUAGAAAUAUUUUUUG	656 - 674	80.94
135	UAGUUCCAAAAAAGUUUAU	AUAAACUUUUUUGGAACUA	683 - 701	80.92
136	UAAAGAGAAGCUCCAAAA	UUUUGGGAGCUUCUCUUUA	238 - 256	80.9
137	ACUUAUCAAAUUUACGGCC	GGCCGUAAAUUUGAUAAAGU	1121 - 1139	80.82
138	AAAUUCAAAACGCAAAAUU	AAUUUUGCGUUUUUGAAUUU	489 - 507	80.81
139	ACCUAUUAGUAUAAUCAUC	GAUGAUUAUACUAAUAGGU	46 - 64	80.78
140	AUGCGAUUGAAAGUUCUAU	AUAGAACUUCUAAUCGCAU	802 - 820	80.77
141	UUCUAAAAAUUUUUUCUA	UAGAAAUAUUUUUUGAA	658 - 676	80.75
142	UCGACCUACUAUAUUUACA	UGUAAAUAUAGUAGGUCGA	712 - 730	80.74
143	AAAAAUUAUUUCUAACAU	AUGUUAGAAAUAUUUUUU	654 - 672	80.71
144	UAAUUUGAGGAUCGACUAA	UUAGUCGAUCCUCAAUUUA	1083 - 1101	80.69
145	UAGUAUAAUAAGGACCCA	UGGGUCCUUAUUUAUACUA	774 - 792	80.65
146	AUAAAUUCUAAAAUUAUU	AAUAAUUUUUAGAAUUUAU	663 - 681	80.25
147	ACGACUUAUCAAAUUUACG	CGUAAAUUUUGAUAAAGUCGU	1124 - 1142	80.18
148	UUCUUUAACCAAGGAAGAA	UUCUUCUUGGUUAAAGAA	625 - 643	80.16
149	GUUAAUAAUAGACUACAC	GUGUAGUCUAAUUUAUUAAC	940 - 958	80.15
150	UCGCCAAGUUGUUAUUAAU	AUUUAUUAACAACUUGGCGA	950 - 968	80.11
151	UAGGCAUUUUCAAAAUCUA	UAGAUUUUGAAAAUGCCUA	1022 - 1040	80
152	GACUUAUCAAAUUUACGGC	GCCGUAAAUUUGAUAAAGUC	1122 - 1140	79.89
153	ACCUUCUAGUAUAAAUAAG	CUUAUUUAUACUAGAAGGU	780 - 798	79.86
154	GUUUCUUUUUCAGUAUCAC	GUGAUACUGAAAAAGAAAC	217 - 235	79.8

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
155	AAAAUUGCCGAUUCUUCGA	UCGAAGAAUCGGCAAUUUU	476 - 494	79.55
156	AAUUCUAGAGUUUUUGA	UCAAAAACUCUAAGGAAUU	747 - 765	79.31
157	AGUAUAAUAAGGACCCAG	CUGGGUCCUUAUUUAUACU	773 - 791	79.21
158	AAAUCUAAAAUUUUUU	AAAUAUUUUUUAGAAUUU	661 - 679	79.2
159	AAAAGUUUAUUUAAAUU	AAUUUAUUAAAACUUUUU	675 - 693	79.19
160	UAAAUUCUAAAAUUUUU	AAUAUUUUUUAGAAUUUA	662 - 680	79.17
161	UUAUCAAAUUACGGCCA	UGGGCCGUAAAUUUGAUAA	1119 - 1137	78.69
162	CUGAUUGGCUAACUUUAUC	GAUAAAGUUAGCCAAUCAG	912 - 930	78.65
163	ACAAAAUGCCCUUAGUUC	GAACUAAGGGCAUUUUUGU	696 - 714	78.65
164	UCCUUAGAGUUUUUGAAGA	UCUUCAAAAACUCUAAGGA	744 - 762	78.59
165	AUAGACCACAAAACAACUU	AAGUUGUUUUUGUGGUCUAU	971 - 989	78.55
166	ACAUAAUUUGAGGAUCGAC	GUCGAUCCUCAAUUUAUGU	1086 - 1104	78.45
167	AAAUUGCAAGAGAAUUGCA	UGCAAUUCUCUUGCAAUUU	554 - 572	78.38
168	AAGAGUUUCUUUUUCAGUA	UACUGAAAAAGAAACUCUU	221 - 239	78.38
169	UGGGCUGAUGAUUUUUUG	CAAAUAUAUCAAGCCCA	93 - 111	78.33
170	AUAUUUGAGGAUCGACUA	UAGUCGAUCCUCAAUUUAU	1084 - 1102	78.27
171	AAUCUAUAUAUCUGGACCA	UGGUCCAGAUUAUAGAUU	1009 - 1027	78.26
172	CAAAUUGCCGAUUCUUCG	CGAAGAAUCGGCAAUUUUG	477 - 495	78.2
173	AUAUCAUCGAGGGUGAUU	AAUCACCCUCGAUGAUUAU	36 - 54	78.14
174	AACGAAAUUCCAGAAUUG	CAAUUCUGGAAUUUUCGUU	882 - 900	78.13
175	UUCGAAGGCAAUUUAAAA	UUUUGAAUUUGCCUUCGAA	498 - 516	78.12
176	AGUUUUUGAAGAGAGCUCA	UGAGCUCUCUCAA AAAACU	737 - 755	78.08
177	AACGCAAAUUGCCGAUUC	GAAUCGGCAAUUUUGCGUU	481 - 499	78.04
178	AUCAGGAGGACAUAUUUU	AAUUUAUGUCCUCCUGAU	1096 - 1114	77.83
179	GAAGGCAAUUCAAACGC	GCGUUUUGAAUUUGCCUUC	495 - 513	77.78
180	UAAUAAAAUAUAUCAA	UUUGAUUAUUUUUUUAUA	571 - 589	77.54
181	CAUCCGUAAUAUUUAUCG	CGUAUAAUAUUACCGAUG	841 - 859	77.51
182	AGAGUUUCUUUUUCAGUAU	AUACUGAAAAAGAAACUCU	220 - 238	77.46
183	CAUAACGACAAUUUAUAG	CUAUAUUUUGUCGUUAUG	986 - 1004	77.38
184	CAUAAUUUGAGGAUCGACU	AGUCGAUCCUCAAUUUAUG	1085 - 1103	77.2
185	AUACCCACACUGUUCUUUA	UAAAGAACAGUGUGGGUAU	637 - 655	77.01
186	CUUUAACCAAGGAAGAAAC	GUUUCUUCUUGGUUAAAG	623 - 641	76.91
187	AAACGCAAAUUGCCGAUU	AAUCGGCAAUUUUGCGUUU	482 - 500	76.83
188	CGAUUGAAAGUUCUAUAGG	CCUAUAGAACUUUCAUUCG	799 - 817	76.73
189	AGUAUACCCA AUUCUAG	CUAAGGAUUUGGGUAUACU	756 - 774	76.68
190	CCUUCUAGUAUAAAUAAGG	CCUUAUUUAUACUAGAAGG	779 - 797	76.66
191	AUGCGGAUUUAUAAAAGAGA	UCUCUUUAUAAUCCGCAU	249 - 267	76.56
192	CGGAUUUAUAAAGAGAAGC	GCUUCUCUUUAUAAUCCG	246 - 264	76.56
193	UCCGGUAUAUUUAUCGGA	UCCGUAAUAUUUACCGGA	839 - 857	76.44
194	AUAUAUCAA AUUGCAAGA	UCUUGCAAUUUUGAUUAU	562 - 580	76.41
195	CGACUUAUCAAAUUUACGG	CCGUAAUUUUGAUAAAGUCG	1123 - 1141	76.32
196	UGCGAUUGAAAGUUCUAUA	UAUAGAACUUUCAUUCGCA	801 - 819	76.3
197	CUGAUGAUUAUUUUGGUAG	CUACCAAAAUAUCAUCAG	89 - 107	75.93
198	AAAUUUUAUAGACCACAAA	UUUUGUGGUCUAUAAAUU	977 - 995	75.79
199	UAUUUACAAAAUUGCCCUU	AAGGGCAUUUUUGUAAAUA	701 - 719	75.69

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
200	GUAAUUAUUAACGGGAUGGC	GCCAUCCGUUAUAUUUAC	835 - 853	75.54
201	AAAAAUGCCCUUAGUUCCA	UGGAACUAAGGGCAUUUUU	694 - 712	75.47
202	GACGACUUAUCAAAUUUAC	GUAAAUUUGAUAAAGUCGUC	1125 - 1143	75.31
203	UAGACAGGAUAUUCGCAAA	UUUGCGAAUAUCCUGUCUA	182 - 200	75.11
204	AUAUCAAAAUUGCAAGAGA	UCUCUUGCAAUUUUGAUUAU	560 - 578	74.99
205	AUUCUUAGAGUUUUUGAA	UUCAAAAACUCUAAGGAAU	746 - 764	74.95
206	UAUAAUCAUCGAGGGUGAU	AUCACCCUCGAUGAUUAUA	37 - 55	74.95
207	GAUUUAUAAAGAGAAGCUC	GAGCUUCUCUUUAAUAUC	244 - 262	74.82
208	AAAAAAGUUUAUUUAUAAU	AUUUAUAAUAAACUUUUUU	676 - 694	74.82
209	GACUAAUAAAAAUUAUUC	GAUUAUUUUUUUAUUAGUC	574 - 592	74.71
210	GAGACCUAUUAGUAUAUC	GAUUUAUCUAAUAGGUCUC	49 - 67	74.66
211	AAAUUAUCAAAAUUGCAA	UUGCAAUUUUGAUUAUUUU	564 - 582	74.55
212	CGAAAUUCCAGAAUUGGG	CCCAAUUCUGGAAAUUUCG	880 - 898	74.15
213	AGGCAUUUUCAAAUCUAU	AUAGAUUUUGAAAUGCCU	1021 - 1039	74.11
214	CUUAGGCAUUUUCAAAUC	GAUUUUGAAAUGCCUAAG	1024 - 1042	74.02
215	AGUUUCUUUUUCAGUAUCA	UGAUACUGAAAAGAAACU	218 - 236	73.97
216	AAAAUUAUUUUCUAACAUA	UAUGUUAGAAAUAUUUUU	653 - 671	73.96
217	AUGGGCUGAUGAUUAUUUU	AAAAUAAUCAUCAGCCCAU	94 - 112	73.95
218	UCCCAAAAGAGUUUCUUUU	AAAAGAAACUCUUUUGGGA	227 - 245	73.92
219	AGACCUAUUAGUAUAUCA	UGAUUAUACUAAUAGGUCU	48 - 66	73.86
220	AAGGCAAAUUCAAAACGCA	UGCGUUUUGAAUUUGCCUU	494 - 512	73.84
221	GAGUUUCUUUUUCAGUAUC	GAUACUGAAAAGAAACUC	219 - 237	73.68
222	CUUAGUUCAAAAAAGUUU	AAACUUUUUUGGAACUAAG	685 - 703	73.27
223	AUUUACAAAAAUGCCCUUA	UAAGGGCAUUUUUGUAAAU	700 - 718	72.8
224	AUCAAAAUUGCAAGAGAAU	AUUCUCUUGCAAUUUUGAU	558 - 576	72.76
225	AAGUUUAUUAUAAAUUCUA	UAGAAUUUAUAAUAAACU	672 - 690	72.44
226	AAGAAUGGGCUGAUGAUUA	UAAUCAUCAGCCAUUCUU	98 - 116	72.3
227	GUAUAAUAAGGACCCAGU	ACUGGGUCCUUAUUUAUAC	772 - 790	72.14
228	ACUAAUAAAAAUUAUUAUCA	UGAUUAUUUUUUUAUUAGU	573 - 591	71.97
229	UAGGACCUUCUAGUAUAAA	UUUAUACUAGAAGGUCCUA	784 - 802	71.88
230	CAAAAUUGCAAGAGAAUUG	CAAUUCUCUUGCAAUUUUG	556 - 574	71.54
231	GUCGACCUACUAUAUUUAC	GUAAAUUAAGUAGGUCGAC	713 - 731	71.46
232	AGUCCAAAAAAGUUUAUU	AAUAAACUUUUUUGGAACU	682 - 700	71.43
233	CCUAUUAGUAUAUUAUCG	CGAUGAUUAUACUAAUAGG	45 - 63	71.21
234	AAGAGAAUUGCACGAAGAU	AUCUUCGUGCAAUUCUCUU	547 - 565	70.83
235	UAUCAAAUUUACGGCCCAA	UUGGGCCGUAAAUUUGAUA	1118 - 1136	70.79
236	AUCAAAUUUACGGCCCAAU	AUUGGGCCGUAAAUUUGAU	1117 - 1135	70.77
237	CAAAACGCAAAAUUGCCGA	UCGGCAAUUUUGCGUUUUG	484 - 502	70.26
238	AGGACCUUCUAGUAUAAU	AUUUAUACUAGAAGGUCCU	783 - 801	70.26

ANEXO F: Se presentan los siRNAs del 51 al 209, que continúan de la Tabla 13. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de PepGMV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
51	AAAUGCAACAUCAAAGAUG	CAUCUUUGAUGUUGCAUUU	477 - 495	86.05
52	UCGUUUACAACGUUCCUG	CAGGAACGUUGUUAAACGA	126 - 144	85.86
53	AAUAAAAGACGACGUCUAC	GUAGACGUCGUCUUUUAUUU	304 - 322	85.85
54	AUUAAAAGCGAUAAAUGCAG	CUGCAUUUAUCGCUUUAAU	1014 - 1032	85.75
55	UUGGGUUGCUGAAUAUUUU	AAAAUAUUCAGCAACCCAA	94 - 112	85.67
56	ACUCUGUCUAUUUAAUCUC	GAGAUUAAAUAGACAGAGU	886 - 904	85.65
57	UCCGUAAUUUAAAUGGGC	GCCCAUUUUAAAUAACGGA	584 - 602	85.52
58	UCCUCGUUUAACAACGUUC	GAACGUUGUUAACGAGGA	129 - 147	85.33
59	UCAAAAUCAAUAUUUGGU	ACCAAUAUUUGAUUUUGA	914 - 932	85.23
60	UGAAUAUUUJGGUCGGAGU	ACUCCGACCAAAUAUUCA	85 - 103	85.23
61	AUAAUCAAAAGCUGGUGAUC	GAUCACCAGCUUUGAUUAU	243 - 261	85.17
62	AAUUACAUAACAAAAGAUG	CAUCUUUUGUUAUGUAAUU	372 - 390	85.15
63	UUAAAGCGAUAAAUGCAGA	UCUGCAUUUAUCGCUUUA	1013 - 1031	85.09
64	CUUAACAUAUCCACAAUGC	GCAUUGUGGAUAUGUUAAG	634 - 652	85.02
65	ACCAUAUUUGCAAAAUGC	GCAUUUUUGCAAAUAUGGU	696 - 714	84.97
66	AUGGUGAUUAUUGUGAAUC	GAUUCACAAUAUACCAU	356 - 374	84.92
67	UACAUGUAAAAACAUUUU	AAAUGUUUUUACAUUGUA	653 - 671	84.86
68	AUUAUCCUCGUUUAACAAC	GUUGUUAACGAGGAUAAU	133 - 151	84.8
69	AUCCUUUCGUUUAACAUGU	ACAUUGUAAACGAAAGGAU	664 - 682	84.7
70	UAUCCUCGUUUAACAACGU	ACGUUGUUAACGAGGAUA	131 - 149	84.68
71	CUGUCUAUUUAUCUCAGC	GCUGAGAUUAAAUAGACAG	883 - 901	84.62
72	ACAAUAUCUAGACUUGAC	GUCAAGUCUAGAUUUUGU	954 - 972	84.57
73	CUAAAGACUCCAAAAAUC	GAUUUUUUGGAGUCUUUAG	844 - 862	84.51
74	UAAAGCGAUAAAUGCAGAU	AUCUGCAUUUAUCGCUUUA	1012 - 1030	84.45
75	UUGGUCAGUCAAAAUCAAA	UUUGAUUUUGACUGACCAA	922 - 940	84.44
76	AAACAUUUUCUUAACAUAU	AUAUGUUAAGAAAUGUUU	643 - 661	84.36
77	UUAUCCAUAUCCUCGUUU	AAACGAGGAUAAUGGAUA	139 - 157	84.32
78	AAUUUAAAAUGGGCAGUGG	CCACUGCCAUUUUAAAUAU	579 - 597	84.26
79	AAAAGCAAUAAGACGAC	GUCGUCUUUAUUUGCUUUU	310 - 328	84.23
80	UCCAUAUCCUCGUUUAAC	GUUAAACGAGGAUAAUGGA	136 - 154	84.17
81	AUCAAAUAUUUGGUGGUCC	GGACCACCAUUUAUUUGAU	909 - 927	84.12
82	UUAGUUAUCAUAACAUA	UUUAUGUUAUGUAACUAA	209 - 227	84.06
83	AAGCAAUAAGACGACGU	ACGUCGUCUUUAUUUGCUU	308 - 326	83.94
84	UAUUUGCAAAAUGCCACU	AGUGGCAUUUUUGCAAUA	692 - 710	83.79
85	AAAGAUGGUGAUUAUUGUG	CACAUAUACCAUCUUU	360 - 378	83.79
86	UUCAUUGUUAUUAUCAUA	UAUGUAACUAACAAUGAA	216 - 234	83.51
87	UCUUAACAUAUCCACAAUG	CAUUGUGGAUAUGUUAAGA	635 - 653	83.5
88	UGCUCGGUAAUUUAAAUG	CAUUUUAAAUAACGGAGCA	587 - 605	83.31
89	AAAGCGAUAAAUGCAGAUG	CAUCUGCAUUUAUCGCUUU	1011 - 1029	83.24
90	AAAUGCCGUUAAAAAUAC	GUAUUUUUAACGGCAUUU	385 - 403	83.21

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
91	UAUCAUAACAUAAGGCUA	UAGCCUUUAUGUUAUGAUA	204 - 222	83.17
92	GUUAUCAUAACAUAAGGC	GCCUUUAUGUUAUGAUAAC	206 - 224	83.06
93	UUGACUGGAAAAUGCAACA	UGUUGCAUUUCCAGUCAAA	486 - 504	83.01
94	UCAGUCAAAAUCAAAUAU	AUUUUUGAUUUUGACUGA	918 - 936	82.97
95	AAGACUCCAAAAAUCGCG	CGCGAUUUUUUGGAGUCU	841 - 859	82.96
96	AGUUUAUCAUAACAUAAGG	CCUUUAUGUUAUGAUAACU	207 - 225	82.84
97	UUUUGAAUUAAGCGAUAA	UUAUCGCUUUAUUCAAAA	1020 - 1038	82.83
98	AAAUCCUUUCGUUUACAAU	AUUGUAAACGAAAGGAUUU	666 - 684	82.79
99	AUAUCCACAAUGCGAUUUC	GAUAUCGCAUUGUGGAUUA	628 - 646	82.79
100	UUUCGUUUACAUGUAAAA	UUUUACAUUGUAAACGAAA	660 - 678	82.71
101	UUCUUAACAUAUCCACAAU	AUUGUGGAUAUGUUAAGAA	636 - 654	82.7
102	AUUGUUAGUUACAUAACA	UGUUUAUGAUAACUAACAAU	213 - 231	82.46
103	UUCGUUUACAUGUAAAA	UUUUACAUUGUAAACGAA	659 - 677	82.44
104	AAAAGAUGGUGAUUAUUGU	ACAAUAAUCACCAUCUUUU	361 - 379	82.44
105	UAUUUACAACUCCUCCUAU	AUAGGAGGAGUUGUAAAUA	173 - 191	82.34
106	UGGGUUGCUGAAUUAUUUG	CAAAUAUUCAGCAACCCA	93 - 111	82.33
107	AGGCUUUAUGUAUAUAAGG	CCUUAUAUACAUAAGCCU	771 - 789	82.14
108	AAAAACAUUUCUUAACA	AUGUUAAGAAAAUGUUUUU	645 - 663	82.1
109	AAAACGUUCAUUGUUAAGU	AACUAACAUGAACGUUUU	222 - 240	81.98
110	AAUUAUUUGGUCGGAGUUG	CAACUCCGACCAAAUAUU	83 - 101	81.88
111	UGGUCAGUCAAAAUCAAAU	AUUUGAUUUUGACUGACCA	921 - 939	81.86
112	UAACAAAAGAUGGUGAUUA	UAAUCACCAUCUUUGUUA	365 - 383	81.81
113	GAAUUAAGCGAUAAAUGC	GCAUUUAUCGCUUUAUUUC	1016 - 1034	81.8
114	AUUUAAAUGGGCAGUGGU	ACCACUGCCAUUUUAAA	578 - 596	81.74
115	AGUCAAAAUCAAUAUUUG	CAAUUAUUUGAUUUUGACU	916 - 934	81.72
116	UAAAAACAUUUCUUAACA	UGUUAAGAAAAUGUUUUUA	646 - 664	81.7
117	AAGGCACAAUAUCUAGAC	GUCUAGAUUUUGUGCCU	959 - 977	81.22
118	UUAAAUGGGCAGUGGUAA	UUACCACUGCCAUUUUAA	576 - 594	81.21
119	UAAAAAUACAUAACAAA	UUUUGUUAUGUAAUUUUUA	376 - 394	81.11
120	UUAAAAUUACAUAACAAA	UUUGUUAUGUAAUUUUUAA	377 - 395	81.1
121	AAUGUAAAAACAUUUUCU	AAGAAAUGUUUUUACA	650 - 668	81.01
122	AAAAUACAUAACAAAAGA	UCUUUUGUUAUGUAAUUUU	374 - 392	80.87
123	ACAUGUAAAAACAUUUUC	GAAAUGUUUUUACA	652 - 670	80.87
124	AACAUAUCCACAAUGCGAU	AUCGCAUUGUGGAUAUGUU	631 - 649	80.81
125	UUAACCAUUUUGAAUUAAA	UUUAAUUCAAAUGGUUAA	1027 - 1045	80.61
126	AUUGGGUUGCUGAAUUAUU	AAUAUUCAGCAACCCAAU	95 - 113	80.57
127	CAUUGUUAGUUAUCAUAAC	GUUAUGUAACUAACAAUG	214 - 232	80.56
128	UAUCCAGUUGACUGGAAA	UUUCCAGUCAACUGGAUUA	494 - 512	80.35
129	UCAUAACAUAAGGCUAAC	GUUAGCCUUUAUGUUAUGA	202 - 220	80.33
130	AUAACAUAAGGCUAACAU	AUGUUAGCCUUUAUGUUAU	200 - 218	80.29
131	AAUUAAGCGAUAAAUGCA	UGCAUUUAUCGCUUAAAU	1015 - 1033	80.2
132	AUUUAUGUGAAUCUGGGCA	UGCCAGAUUCACAAUAU	350 - 368	80.16

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición		Inhibición (%)
133	ACGUUCAUUGUUAGUUAUC	GAUAACUAACAAUGAACGU	219	- 237	80.06
134	CAUCCGGUAAUUAUAGG	CCUAUAAUUAUACCGGAUG	820	- 838	80.01
135	AUGCCGUUAAAAUUACAU	AUGUAAUUUUUAAACGGCAU	383	- 401	79.95
136	AUAGACCGAUUAGUAUUGU	ACAAUACUAAUCGGUCUAU	53	- 71	79.9
137	UCGAAAUGCUCCGUAAUUU	AAAUUACGGAGCAUUUCGA	593	- 611	79.83
138	UGACUGGAAAUGCAACAU	AUGUUGCAUUUUCAGUCA	485	- 503	79.72
139	AAAUGCAACAUCAAAGAU	AUCUUUGAUGUUGCAUUUU	478	- 496	79.47
140	CUCCGUAAUUUAAAUGGG	CCCAUUUUAAAUAACGGAG	585	- 603	79.4
141	CAUAACGCUGUAAAUGCUG	CAGCAUUUACAGCGUUAUG	285	- 303	79.31
142	GUCAAAAUCAAAUAUUGG	CCAAUUUUUGAUUUUGAC	915	- 933	79.09
143	UGUGAUUGGUCAGUAAAA	UUUUGACUGACCAAUCACA	927	- 945	78.99
144	UGGUGAUUAUUGUGAAUCU	AGAUUCACAAUAAUCACCA	355	- 373	78.82
145	AACAUAUGACAGAAGUUGA	UCAACUUCUGUCAUAUGUU	736	- 754	78.73
146	UUUAAAAUGGGCAGUGGUA	UACCACUGCCCAUUUUAAA	577	- 595	78.66
147	UCAUUGUUAUUAUCAUAA	UUAUGAUAACUAACAAUGA	215	- 233	78.59
148	AAAUUACAUAACAAAAGAU	AUCUUUUGUUAUGUAAUUU	373	- 391	78.53
149	GUGAUUAUUGUGAAUCUGG	CCAGAUUCACAAUAAUCAC	353	- 371	78.39
150	AUCCGAAAACGUUCAUUGU	ACAAUGAACGUUUUCGGAU	227	- 245	78.34
151	AAGAUGGUGAUUAUUGUGA	UCACAUAUAUCACCAUCUU	359	- 377	78.19
152	AAUGCCGUUAAAAUUACA	UGUAAUUUUUAACGGCAUU	384	- 402	77.78
153	UGUAAAAACAUUUUCUUA	UUAAGAAAUGUUUUUACA	648	- 666	77.77
154	GUCAAAAAGCAAUAAAGAC	GUCUUUAUUUGCUUUUGAC	313	- 331	77.69
155	UAAAUGGGCAGUGGUAAA	UUUACCACUGCCCAUUUUA	575	- 593	77.55
156	ACAUUGACAGAAGUUGAG	CUCAACUUCUGUCAUAUGU	735	- 753	77.54
157	UUUGAAUUAAGCGAUAAA	UUUAUCGCUUAAUUCAAA	1019	- 1037	77.49
158	GUAAAAACAUUUUCUUAAC	GUUAAGAAAUGUUUUUAC	647	- 665	77.38
159	AUUUGCAAAAUGCCACUA	UAGUGGCAUUUUUGCAAAU	691	- 709	77.13
160	CACUCUGUCUAAUUAAUCU	AGAUUAAAUAGACAGAGUG	887	- 905	77.08
161	AACGUUCAUUGUUAGUUAU	AUAACUAACAAUGAACGUU	220	- 238	77.01
162	AUCCGGUAAUUAUUAAGGA	UCCUAUAAUUAUACCGGAU	819	- 837	76.98
163	AAACGUUCAUUGUUAGUUA	UAACUAACAAUGAACGUUU	221	- 239	76.96
164	AAUCAAAUAAUUGGUGGUC	GACCACCAAUUAUUUGAUU	910	- 928	76.94
165	UCCGGUAAUUAUUAAGGAU	AUCCUAUAAUUAUACCGGA	818	- 836	76.57
166	AUAACAAAAGAUGGUGAUU	AAUCACCAUCUUUUGUUAU	366	- 384	76.5
167	CCAUAUUUGCAAAAUGCC	GGCAUUUUUGCAAAUAUGG	695	- 713	76.49
168	UAUCCAUAUCCUCGUUUA	UAAACGAGGAUAAUGGAUA	138	- 156	76.45
169	UGAUCCGAAAACGUUCAUU	AAUGAACGUUUUCGGAUCA	229	- 247	76.31
170	CUCGACAUAAUCAAGCUG	CAGCUUUGAUUAUGUCGAG	249	- 267	76.25
171	AGCAAUAAAGACGACGUC	GACGUCGUCUUUAUUUGCU	307	- 325	76.17
172	AAUCAAAUAAUUGGUGGU	ACCACCAAUUAUUUGAUUU	911	- 929	76.06
173	GUAAUAUUAUAGGAUGGCC	GGCAUCCUAUAAUUAUAC	814	- 832	76.06
174	ACCAUUUUGAAUUAAGCG	CGCUUUAUUAUCAAUUGGU	1024	- 1042	75.83

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición		Inhibición (%)
175	CAGUUUCAUCCAAACGUUC	GAACGUUUGGAUGAAACUG	420	- 438	75.81
176	GUUGCUGAAUUAUUUGGUC	GACCAAAAUAUUCAGCAAC	90	- 108	75.73
177	CUUUUAUGUAUAUAAGGGAC	GUCCCUUAUAUACAUAAG	768	- 786	75.7
178	AUCCUCGUUUAACAACGUU	AACGUUGUUAACGAGGAU	130	- 148	75.65
179	ACUACCACAAAAUCCUUU	AAAGGAUUUUGGUGGUAGU	676	- 694	75.53
180	CAAUGUAAAAACAUUUUCU	AGAAAUGUUUUUACAUUG	651	- 669	75.51
181	AGUUUCAUCCAAACGUUCA	UGAACGUUUGGAUGAAACU	419	- 437	75.45
182	AUUGUCAUUGAGGGUGAUU	AAUCACCCUCAUUGACAAU	39	- 57	75.41
183	CAAAGAUGGUGAUUAUUG	CAUAAUCACCAUCUUUUG	362	- 380	74.78
184	UGUUAGUUAUCAUAACAUA	UAUGUUAUGUAACUAACA	211	- 229	74.65
185	CAACUAUGACAGAAGUUG	CAACUUCUGUCAUAUGUUG	737	- 755	74.13
186	UACACCAUAUUUGCAAAAA	UUUUUGCAAAUAUGGUGUA	699	- 717	73.86
187	AUUUUGAAUUAAGCGAUA	UAUCGCUUUAUUUCAAAAU	1021	- 1039	73.86
188	UCCGAAAACGUUCAUUGUU	AACAAUGAACGUUUUCGGA	226	- 244	73.62
189	AUGUAAAAACAUUUUCUUA	UAAGAAAUGUUUUUACAU	649	- 667	73.53
190	AUGCUCGGUAAUUUAAAAU	AUUUUAAAUAACGGAGCAU	588	- 606	73.51
191	AGAUAGACCGAUUAGUAUU	AAUACUAAUCGGUCUAUCU	55	- 73	73.21
192	AUCCAGUUGACUGGAAAAU	AUUUUCAGUCAACUGGAU	492	- 510	72.85
193	UCUACCAUAACGCUGUAAA	UUUACAGCGUUAUGGUAGA	290	- 308	72.71
194	AAAUGCUCGGUAAUUUAAA	UUUAAAUAACGGAGCAUUU	590	- 608	72.2
195	AACAUUGGGUUGCUGAAUA	UAUUCAGCAACCCAAUGUU	98	- 116	72.1
196	ACGUGAAUAAUUCGCAGAG	CUCUGCGAAUUAUUCACGU	1094	- 1112	71.93
197	AUUGGUCAGUCAAAAUCA	UUGAUUUUGACUGACCAAU	923	- 941	71.79
198	CUGAAUAUUUUGGUCGGAG	CUCCGACCAAAAUAUUCAG	86	- 104	71.61
199	CACCAUAUUUGCAAAAUG	CAUUUUUGCAAAUAUGGUG	697	- 715	71.1
200	UGCCGUUAAAAAUACAUA	UAUGUAAUUUUUAACGGCA	382	- 400	71.05
201	GAUUAGUAUUGUCAUUGAG	CUCAUGACAAUACUAAUC	46	- 64	70.92
202	AAAACAUUUUCUUAACAUA	UAUGUUAAGAAAUGUUUU	644	- 662	70.86
203	ACAUAAAGGCUAACAUCGA	UCGAUGUUAGCCUUUAUGU	197	- 215	70.79
204	UCCUACACCAUAUUUGCAA	UUGCAAAUAUGGUGUAGGA	702	- 720	70.54
205	AGUGGUAAAACCAUCUAU	AUAGAUGGGUUUUACCACU	565	- 583	70.37
206	CAAAUCAAAUAUUUGGUG	CACCAAUUAUUUGAUUUUG	913	- 931	70.36
207	GUUUUCAUCCAAACGUUCAG	CUGAACGUUUGGAUGAAAC	418	- 436	70.32
208	GUUCAUUGUUAGUUAUCAU	AUGAUAACUAACAAUGAAC	217	- 235	70.11
209	GUUUACAAUGUAAAAACAU	AUGUUUUUACAUUGUAAAC	656	- 674	70.07

ANEXO G: Se presentan los siRNAs del 51 al 363, que continúan de la Tabla 14. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de TYLCV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
51	UAAGAUGCCUAAUJAAAUC	GAUUUAAUJAGGGAUCUUA	1127 - 1145	89.47
52	AUAUAUUAAAAGAGAAGGC	GCCUUCUCUUUJAAUAUAU	242 - 260	89.45
53	UUACAACAGAUUAAGAUC	GAUCUUAUAUCUGUUGUAA	1139 - 1157	89.35
54	UUUUGAAUUUUGAAUUUUG	CAAAAUUCAAAAUUCAAAA	810 - 828	89.34
55	AUAAGUAAGACACCGAUAC	GUUUCGGUGUCUUAUCUUAU	740 - 758	89.09
56	AAAAUACAUCAAGUUUG	CAAACUUUGAUGUAUUUUU	563 - 581	89.04
57	AUUUUGAAUJGCAUJGUAC	GUACAUJGCAAUUCAAAA	797 - 815	89.04
58	UACAUCAAGUUJGCAGAG	CUCUGCAAACUUJGAUGUA	558 - 576	89
59	AAUJGUUCUCUCUCUAAAG	CUUUAGAGAGAGAACA AUU	627 - 645	88.98
60	UGUUUCUCCA UUUUCUUUCU	AGAAAGAAAUGGAGAAACA	145 - 163	88.85
61	AUCCCUAAUUAAAUCJGUGG	CCACGAUUUAAUJAGGGAU	1123 - 1141	88.78
62	UUUGAUJGGUJGACAGUGA	UCACUGUCAACCAAUCAAA	918 - 936	88.76
63	UUUUAAUCAAGUJCCAGAU	AUCUGGAACUJGAUUAAAA	121 - 139	88.64
64	UUUAAGUUCAAAUUJAGAU	AUCUAAA UJGAACUAAAA	193 - 211	88.64
65	UCAAGUUJGCAGAGAACU	AGUUCUCUGCAAACUJUGA	554 - 572	88.39
66	AAUUAAUJCCUAACAUAUC	GAUAUGUJAGGAAAUA AUU	648 - 666	88.39
67	UUUJAGAUJGGAUUUUJAGU	ACUAAAAUJCCUAUCUAAA	181 - 199	88.29
68	UUGAAUJGCAUJGUACUUU	AAAGUACA UJGCAAUJCAA	794 - 812	88.29
69	AAUUAAAAACCUJAGAAAC	GUUUCUJAGGUUUUUJAAAU	593 - 611	88.22
70	AUAAAAAUACAUCAAGU	ACUJUGAUGUAUUUUUUJAU	566 - 584	88.06
71	AUJGGAUUUUJAGUCCUCC	GGAGGACUAAAAUJCCUAU	176 - 194	88.04
72	UUJAGUCCUCCUUJAGAAGU	ACUUCUAAAGGAGGACUAA	167 - 185	88.02
73	UUUJAGUCCUCCUUJAGAAG	CUUCUAAAGGAGGACUAAA	168 - 186	88.01
74	UGGAAAUJGAUUAUAUCGCC	GGCGAUUAUAUCAUUUCCA	1185 - 1203	87.77
75	UUGAAUUUJGAUJGCAAU	AUUGCAAUJCAAAAUJCAA	801 - 819	87.7
76	UAUGUUUCUCCA UJUUCUUU	AAAGAAAUGGAGAAACAUA	147 - 165	87.66
77	AAAUAACAUCAAGUUJGC	GCAAACUJUGAUGUAUUUU	562 - 580	87.61
78	UJGGAUUUUJAGUCCUCCU	AGGAGGACUAAAAUJCCUA	175 - 193	87.54
79	AAUUUCAUAAUJUAAGUUC	GAACUUA AAUJUAUGAAAU	203 - 221	87.49
80	UUJAGAAGUUUAUGUUUCUC	GAGAAACA UAAACUUCUAA	156 - 174	87.48
81	UUUGAUUUUJGAUJUGA	UCAAAAUJCAAAAUJCAA	816 - 834	87.47
82	UAACGUUJGAGGAUGCAAU	AUUGCAUJCCUCAAACGUUA	936 - 954	87.45
83	UUCUUCUUUJAAUCAAGUU	AACUUGAUUAAAAGAAGAA	127 - 145	87.43
84	CUUCUUUJAAUCAAGUJCC	GGAACUUGAUUAAAAGAAG	125 - 143	87.41
85	UACCAAUGUAAGAACCAAC	GUUGGUUCUUAACA UJGGUA	483 - 501	87.27
86	UUUJAGAAGUUUAUGUUUCU	AGAAACA UAAACUUCUAAA	157 - 175	87.22
87	AAAUJGAACACUUAUCUAAC	GUUJAGAUJAGUGUUCAUUU	951 - 969	87.21
88	UAAAAAUACAUCAAGUU	AACUJUGAUGUAUUUUUUA	565 - 583	87.09
89	UJGGAGUUUJCCAAAUJCGA	UCGAUUJGGA AAACUJCAA	347 - 365	87.03
90	UUUUACA AA AUJACCAAU	AUUJGUA AUUUUGUAAAA	778 - 796	86.87

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
91	UUUCCUAACAUAUCCCAU	AUUGGGUAUUGUUAGGAAA	643 - 661	86.84
92	AUUCAUUUAGAAGUGGAUC	GAUCCACUUCUAAAUGAAU	1016 - 1034	86.83
93	UCUUCUUCUUUUAAUCAAG	CUUGAUUAAAAGAAGAAGA	129 - 147	86.83
94	AACACUUAUCUAACGUUUG	CAAACGUUAGAUAAAGUGUU	946 - 964	86.76
95	UUGAUUUUGGAGUUUUCCA	UGGAAAACUCCAAAAUCA	353 - 371	86.73
96	AUGAACACUUUAUCUAACGU	ACGUUAGAUAAAGUGUUCAU	949 - 967	86.68
97	AACAAAUAAAAAUACAUC	GAUGUAUUUUUUUUUUUGUU	571 - 589	86.6
98	AUCCGGUAAUAUUUACGG	CCGUAAUAUUUACCGGAU	851 - 869	86.52
99	ACAAAUUACCAAUAGCC	GGCUAUUUGGUAUUUUUGU	774 - 792	86.48
100	AUCAAGUCCAGAUGAACU	AGUUCAUCUGGAACUUGAU	116 - 134	86.46
101	AUAAAGACAAUUGAACACU	AGUGUUCAUUUGUCUUUUAU	959 - 977	86.4
102	UUUGAAUUUUGAAUUUUGA	UCAAAAUUCAAAAUUCAAA	809 - 827	86.36
103	UUAUGUUUCUCCAUUUUCU	AAGAAAUGGAGAAACAUAA	148 - 166	86.35
104	UUUCUUCUUCUUUUAAUCA	UGAUUAAAAGAAGAAGAAA	131 - 149	86.31
105	UCCAUUUCUUUCUUCUUCU	AGAAGAAGAAAGAAUUGGA	139 - 157	86.21
106	AUGUUUCUCCAUUUCUUC	GAAAGAAUUGGAGAAACAU	146 - 164	86.09
107	AUUUGAUUGGUUGACAGUG	CACUGUCAACCAUCAAU	919 - 937	86.04
108	UUAUCUAACGUUUGAGGAU	AUCCUCAACGUUAGAUAA	941 - 959	85.99
109	AAUUGCAAUGUACUUUAC	GUAAAAGUACAUUGCAAU	791 - 809	85.98
110	AUUUUUAGUCCUCCUUUAG	CUAAAGGAGGACUAAAAU	171 - 189	85.96
111	UUUCUUUCUUCUUCUUUA	UAAAAGAAGAAGAAAGAAA	135 - 153	85.95
112	UUGAGGAUGCAAUUUGAUU	AAUCAAAUUGCAUCCUCA	930 - 948	85.84
113	UUUUUGAAUUUUGAAUUUU	AAAAUUCAAAAUUCAAAA	811 - 829	85.8
114	UACAACGAAUCCGUGAAC	GUUCACGGAUUUCGUUGUA	1046 - 1064	85.78
115	AUAGUGCAAGACAAACUAC	GUAGUUUGUCUUGCACU	993 - 1011	85.7
116	UAAAUAGAUUUGAUUUUGA	UCAAAAAUCAAUUUA	823 - 841	85.7
117	UAAAAUAUAGCCAAAAU	AUUUUUGGCAUUAUUUUA	664 - 682	85.68
118	UCUUUUAAUCAAGUCCAG	CUGGAACUUGAUUAAAAGA	123 - 141	85.65
119	AAUACAUCAAAGUUUGCAG	CUGCAAACUUUGAUGUAU	560 - 578	85.65
120	UUCAAAUUUAGAUAGGAU	AAUCCUAUCUAAUUUGAA	187 - 205	85.62
121	UUUGAGGAUGCAAUUUGAU	AUCAAAUUGCAUCCUCA	931 - 949	85.54
122	UUUUACA AUUUCAUAAUUU	AAUUUAUGAAUUGUAAAA	209 - 227	85.5
123	AAUAAAAAUACAUCAAG	CUUUGAUGUAUUUUUUAU	567 - 585	85.4
124	UUUUGAAUUUUGAAUUGCA	UGCAAUUCAAAAUUCAAA	803 - 821	85.33
125	AAGUAUAUAAAGACAAUUG	CAUUUGUCUUUAUAUACU	965 - 983	85.29
126	UUCUUUUAAUCAAGUCCA	UGGAACUUGAUUAAAAGAA	124 - 142	85.27
127	UUUUUAGUCCUCCUUUAGA	UCUAAAGGAGGACUAAAA	170 - 188	85.22
128	AUUUAGAUAGGAUUUUUAG	CUAAAAUCCUAUCUAAU	182 - 200	85.11
129	UUUAUAGCUAACAUACAA	UUGUAUGUUAGCUAUUAAA	1060 - 1078	85.01
130	UCCAGAUGAACUUGAAGA	UCUUCAAGUUCUUCUGGAA	110 - 128	84.92
131	UAUUUUACA AUUUCAUAAU	AUUUAUGAAUUGUAAAAU	211 - 229	84.84
132	CUACAUAACAACGAAUCC	GGAUUUCGUUGUAUGUUAG	1052 - 1070	84.83

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
133	UACCAAUAGCCAUUUGGU	ACCAAUGGCUAUUUGGUA	767 - 785	84.8
134	AAUGAACACUUAUCUAACG	CGUUAGAUAAAGUGUUCAUU	950 - 968	84.76
135	AAUUUAAGUUCAAAUUUAG	CUAAAUUUGAACUUAUUUU	195 - 213	84.74
136	UCAAUUCAGGCAGUAAAUC	GAUUUACUGCCUGAAUUGA	272 - 290	84.71
137	ACAUAAAAGAAAAGGCGC	GCGCCUUUUUUUUUAUGU	874 - 892	84.57
138	AAGUUCAAAUUAGAUAGG	CCUAUCUAAAUUUGAACUU	190 - 208	84.48
139	AUAAAAGAAAAGGCGCGG	CCGCGCCUUUUUUUUUAU	872 - 890	84.45
140	AACAUAUCCAAUUGUUCU	AGAACA AUUGGGAUAUGUU	637 - 655	84.36
141	UAAAGACAAAUGAACACUU	AAGUGUUCAUUUGUCUUUA	958 - 976	84.33
142	UUUUUUAAAUAUAUGCCA	UGGCAUAUAUUUUAAAUA	669 - 687	84.27
143	AAUCAAGUCCAGAUGAAC	GUUCAUCUGGAACUUGAUU	117 - 135	84.23
144	AUUUCUUUCUUCUUCUUUU	AAAAGAAGAAGAAAGAAU	136 - 154	84.2
145	CUUUCUUCUUCUUUAAUC	GAUUAAAAGAAGAAGAAAG	132 - 150	84
146	AAAAAGACGGAGACUUCAU	AUGAAGUCUCCGUCUUUUU	371 - 389	83.99
147	UUCAGGAAAUUCAUUUAGA	UCUAAAUGAAUUUCCUGAA	1024 - 1042	83.92
148	UUCUUCUUCUUUAAUCA	UUGAUUAAAAGAAGAAGAA	130 - 148	83.92
149	ACUGCAAUAUUUAAUAGC	GCUAUUAAAUAUUUUGCAGU	1070 - 1088	83.88
150	UACUUUUACAAAUAACCA	UGGUAUUUUUGUAAAAGUA	781 - 799	83.84
151	CAAUUCGAAGGCAAUACC	GGUAUUUGCCUUCGAAUUG	498 - 516	83.8
152	AUAUCCAAUUGUUCUCUC	GAGAGAACA AUUGGGAUAU	634 - 652	83.69
153	AUUCAGGAAAUUCAUUUAG	CUAAAUGAAUUUCCUGAAU	1025 - 1043	83.65
154	UUCAACAUGCCUCGUUUUAU	AUAAACGAGGCAUGUUGAA	684 - 702	83.64
155	UUAAGUUCAAAUUAGAU	UAUCUAAA UUUGAACUUAA	192 - 210	83.6
156	AAAUUAUUCCUAACAUAU	AUAUGUUAGGAAUAUUUU	649 - 667	83.56
157	AUUUAAUAGCUAACAUACA	UGUAUGUUAGCUAUUAAA	1061 - 1079	83.41
158	ACUUAUCUAACGUUUGAGG	CCUCAACGUUAGAUAAAGU	943 - 961	83.35
159	UUCCUAACAUAUCCAAUU	AAUUGGGAUUUGUUGGAA	642 - 660	83.25
160	AUUACCAAUAGCCAUUUG	CAAUUGGCUAUUUGGUAU	769 - 787	83.25
161	CUUUAGAAGUUUAUGUUUC	GAAACAUAACUUCUAAAAG	158 - 176	83.23
162	CAAUUCAUUUCAACAUGCC	GGCAUGUUGAAUUGAAUUG	692 - 710	83.22
163	UAUAAGUAAGACACCGAUA	UAUCGGUGUCUUAUUUA	741 - 759	83.11
164	UAAGUAAGACACCGAUACA	UGUAUCGGUGUCUUAUUUA	739 - 757	83.1
165	UGAGGAUGCAAUUUGAUUG	CAAUCAAUUUGCAUCCUCA	929 - 947	83.1
166	UUGCAAUGUACUUUUACAA	UUGUAAAAGUACAUUGCAA	789 - 807	83.08
167	UUUUAGUCCUCCUUUAGAA	UUCUAAAAGGAGGACUAAA	169 - 187	83.08
168	AAUGAUUAUAUCGCCUGGU	ACCAGGCGAUUAUAUCAUU	1181 - 1199	83.08
169	AAUUCAUUUCACAUGCCU	AGGCAUGUUGAAUUGAAUU	691 - 709	83.08
170	UGAAUUGCAAUGUACUUUU	AAAAGUACA UUGCAAUUCA	793 - 811	83.03
171	UCUUUCUUCUUCUUUUAAU	AUUAAAAGAAGAAGAAAGA	133 - 151	83.02
172	AUUGUUCUCUCUCUAAAGA	UCUUUAGAGAGAGAACA AU	626 - 644	83
173	AAUAGCUAACAUACAACGA	UCGUUGUAUGUUAGCUAUU	1057 - 1075	82.92
174	AGACAAUGAACACUUAUC	GAUAAGUGUUCAUUUGUCU	955 - 973	82.82

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
175	AUUUGAUUUUUGAAUUUUG	CAAAAUUCAAAAUCAAAU	817 - 835	82.76
176	UGAAUUUUGAAUUGCAAUG	CAUUGCAAUUCAAAAUUCA	800 - 818	82.75
177	UUUAAAAUAUUGCCAAAA	UUUUGGCAUAUAUUUUAAA	666 - 684	82.7
178	UUUACAAAAUACCAAUA	UAUUUGGUAUUUUUGUAAA	777 - 795	82.66
179	UUUACAUUUCAUAUUUA	UAAAUUAUGAAAUUGUAAA	208 - 226	82.6
180	AUAUAAAGACAAAUAGAACA	UGUUCAUUUGUCUUUAUAU	961 - 979	82.6
181	UGCAAUUUGAUUGGUUGAC	GUCAACCAAUCAAAUUGCA	923 - 941	82.6
182	UUUGAAUUUUGAAUUGCAA	UUGCAAUUCAAAAUCAAA	802 - 820	82.46
183	ACAUACAACGAAAUCCGUG	CACGGAUUUCGUUGUAUGU	1049 - 1067	82.42
184	UAGUCCUCCUUAGAAGUU	AACUUCUAAAGGAGGACUA	166 - 184	82.3
185	AAAUUUACCAAUAGCCAU	AUGGCUAUUUGGUAAUUUU	772 - 790	82.26
186	UCCCAAUUAAAAACCUAG	CUAGGUUUUUAAUUGGGA	597 - 615	82.23
187	AAUAUUUAUAGCUAACAU	AUGUUAGCUAUUAAAUAU	1064 - 1082	82.12
188	AUAAGAUCUUAAUUAAAU	AUUUAAUUAGGGAUCUUAU	1128 - 1146	82.11
189	AAUACAUCAAAGUUUGCA	UGCAAACUUUGAUGUAUUU	561 - 579	82.09
190	AAAAAUACAUCAAAGUUU	AAACUUUGAUGUAUUUUUU	564 - 582	82.06
191	UUAAAAUAUUGCCAAAA	UUUUUGGCAUAUAUUUUAA	665 - 683	82.02
192	GUACUUUUACAAAUUACC	GGUAAUUUUGUAAAAGUAC	782 - 800	82.01
193	AAUUUGAUUGGUUGACAGU	ACUGUCAACCAAUCAAAU	920 - 938	81.99
194	ACAACAGAUUAAGAUC	GGGAUCUUAUAUCUGUUGU	1137 - 1155	81.91
195	UUACAUUUCAUAUUUUA	UUAAAUAUGAAUUGUAA	207 - 225	81.88
196	UAUAAGAUCCUAAUUAAA	UUUAAUUAGGGAUCUUAUA	1129 - 1147	81.79
197	UAGCUAACAUACAACGAAA	UUUCGUUGUAUGUUAGCUA	1055 - 1073	81.7
198	AAGAUCCUAAUUAAAUCG	CGAUUUAAUUAGGGAUCUU	1126 - 1144	81.69
199	UAAUUUAAGUUCAAUUUA	UAAAUUUGAACUUAAAUA	196 - 214	81.68
200	UUGAUUUUUGAAUUUUGAA	UUCAAAAUUCAAAAUCA	815 - 833	81.63
201	AUGCCAAAAUUUUUCCU	AGGAAUAAUUUUUGGCAU	656 - 674	81.5
202	AUAUGCCAAAAUUUUUC	GAAUAAUUUUUGGCAUAU	658 - 676	81.46
203	UUGAAUUUUGAAUUUUGAA	UUCAAAAUUCAAAAUCA	808 - 826	81.45
204	AAGUAUUGUCAUUGAGGGU	ACCCUCAUGACAAUACUU	40 - 58	81.43
205	UCGUUUUUUAAAAUAUAU	AUAUAUUUUAAAAUAACGA	673 - 691	81.29
206	AAUAUAUGCCAAAAUUUAU	AUAAUUUUUGGCAUAUAUU	661 - 679	81.29
207	AAAUGAUUAUAUCGCCUGG	CCAGGCGAUUAUAUCAUUU	1182 - 1200	81.28
208	ACAUAGUGCAAGACAAACU	AGUUUGUCUUGCACUAUGU	995 - 1013	81.27
209	UCAACGGACUGCAAUAUU	AAUAUUUGCAGUCCGUUGA	1077 - 1095	81.22
210	UAUUCCUAACAUAUCCCA	UGGGAUAUGUUAGGAAUA	645 - 663	81.16
211	UGGAGUUUUCCAAUCGAU	AUCGAUUUGGAAAACUCCA	346 - 364	81.05
212	UGAUUUUUGAAUUUUGAAU	AUUCAAAUAUCAAAAUCA	814 - 832	81.03
213	AACAUAACAACGAAUCCGU	ACGGAUUUCGUUGUAUGUU	1050 - 1068	81.02
214	AAGUUUAUGUUUCUCCA	AAUGGAGAAACAUAACUU	152 - 170	81
215	AUCAAGUUUGCAGAGAAC	GUUCUCUGCAAACUUUGAU	555 - 573	80.99
216	AUUGCAAUGUACUUUUACA	UGUAAAAGUACAUUGCAAU	790 - 808	80.98

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
217	UCUCCAUUUCUUCUUCUU	AAGAAGAAAGAAAUGGAGA	141 - 159	80.98
218	UCAUAAUUUAAGUUCAAU	AUUUGAACUUAUUUAUGA	199 - 217	80.97
219	AAUGUAAGAACCAACGGUU	AACCGUUGGUUCUACAUI	479 - 497	80.95
220	UGAAUUUUGAAUUUUGAAU	AUUCAAAAUUCAAAAUCA	807 - 825	80.89
221	UUCAUUGAUUUUGGAGUUU	AAACUCCAAAAUCAUGAA	357 - 375	80.88
222	AAAAUUUUUCCUAACAU	AUGUUAGGAAAUAUUUUU	651 - 669	80.84
223	CUCCAUUUCUUCUUCUUC	GAAGAAGAAAGAAAUGGAG	140 - 158	80.81
224	UCUAAAGAGGAAGCACUUU	AAAGUGCUUCCUCUUUAGA	615 - 633	80.78
225	UAUAUUUUACAAUUUCAUA	UAUGAAAUGUAAAAUAUA	213 - 231	80.73
226	UUCUUUCUUCUUCUUUUA	UUAAAAGAAGAAGAAAGAA	134 - 152	80.54
227	UUAUCCA AUUCGAAGGCAA	UUGCCUUCGAAUUGGAUAA	503 - 521	80.47
228	UCCUUUAGAAGUUUAUGUU	AACAUA AACUUCUAAAGGA	160 - 178	80.46
229	AUUUCAUAAUUUAAGUUCA	UGAACUUAUUUAUGAAAU	202 - 220	80.44
230	AAGACAAAUGAACACUUAU	AUAAGUGUUCAUUUGUCUU	956 - 974	80.36
231	UUUCAUAAUUUAAGUUCAA	UUGAACUUAUUUAUGAAA	201 - 219	80.28
232	AAAAUAUAUGCCAAAAUU	AAUUUUUGGCAUAUAUUUU	663 - 681	80.25
233	UUCGAAGGCAAUACCAAU	AUUGGUUUUUGCCUUCGAA	495 - 513	80.22
234	UCAUUGAUUUUGGAGUUUU	AAAACUCCAAAAUCAUGA	356 - 374	80.21
235	AGAUAGGAUUUUUAGUCCU	AGGACUAAAAUCCUAUCU	178 - 196	80.15
236	AAUGAUUUGAUUUUUGAAU	AUUCAAAAUCAAUCAUU	821 - 839	80.06
237	AUAAUUUAAGUUCAAUUU	AAUUUUGAACUUAUUUAU	197 - 215	80.06
238	CUUUCCAAUUAAAAAAC	GGUUUUUUAAUUGGAAAG	600 - 618	79.77
239	AAUAUUUAAUAGCUAACA	UGUUAGCUAUUAAAUAUUU	1065 - 1083	79.71
240	AUUUUGGAGUUUCCAAAU	AUUUGGAAAACUCCAAAAU	350 - 368	79.6
241	AUAUAUGCCAAAAUUUUU	AAUAUUUUUUGGCAUAUAU	660 - 678	79.37
242	ACCACAUAAAAAGAAAAGG	CCUUUUCUUUUUAUGUGGU	877 - 895	79.36
243	GUUUUUUUAAAAUAUUGC	GCAUAUAUUUUAAAUAAC	671 - 689	79.35
244	AUGAUUUGAUUUUUGAAUU	AAUUCAAAAUCAAUCAU	820 - 838	79.29
245	AUUUAAGUUCAAUUUAGA	UCUAAAUUUGAACUAAAAU	194 - 212	79.13
246	AAGGACUAUAUUUACAAU	AUUGUAAAAUAUAGUCCUU	219 - 237	79.11
247	AAUUCGAAGGCAAUACCA	UGGUUUUUGCCUUCGAAUU	497 - 515	79.07
248	AAAUUCAUUUAGAAGUGGA	UCCACUUCUAAAUGAAUUU	1018 - 1036	79.07
249	AGGAAAUUCAUUUAGAAGU	ACUUCUAAAUGAAUUUCCU	1021 - 1039	78.95
250	ACAAUUUCAUAAUUUAAGU	ACUUAAAUAUGAAAUUGU	205 - 223	78.9
251	ACUUUCCCAAUUAAAAAC	GUUUUUUUAAUUGGAAAGU	601 - 619	78.77
252	AUGUGCUUAUCCAAUUCGA	UCGAAUUGGAUAAGCACAU	509 - 527	78.76
253	UCCAUGUCUUAUCCAAUU	AAUUGGAUAAGCACAUUGA	512 - 530	78.72
254	UCAAGUCCAGAUGAACUU	AAGUUCAUCUGGAACUUGA	115 - 133	78.71
255	GUUUUUGUUUCUCCAUUUC	GAAAUGGAGAAACAUAAC	150 - 168	78.63
256	AAUUUUGAAUUUUGAAUUG	CAAUUCAAUUUCAAAUUU	805 - 823	78.41
257	AUACAUCAAGUUUGCAGA	UCUGCAAACUUUGAUGUAU	559 - 577	78.4
258	AAGUCCAGAUGAACUUGA	UCAAGUUCAUCUGGAACUU	113 - 131	78.38

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
259	UGAACACUUAUCUAACGUU	AACGUUAGAUAGUGUUCA	948 - 966	78.36
260	AGAACAGGCAAAACAAUGU	ACAUUGUUUUGCCUGUUCU	15 - 33	78.19
261	UUCCCAUUAAAAAACCUA	UAGGUUUUUUAAUUGGGAA	598 - 616	78.05
262	UCAACAUGCCUCGUUUAAU	AAUAAACGAGGCAUGUUGA	683 - 701	77.95
263	AUUUCAACAUGCCUCGUUU	AAACGAGGCAUGUUGAAA	686 - 704	77.93
264	UAUAUGCCAAAAAUUUUU	AAAUAUUUUUUGGCAUAUA	659 - 677	77.91
265	AAAUUUAGAUAGGAUUUUU	AAAAUCCUAUCUAAAUUU	184 - 202	77.81
266	UCCUAACAUAUCCCAAUUG	CAAUUGGGAUUUGUUAGGA	641 - 659	77.77
267	UUCAUAUUUAAGUUCAAA	UUUGAACUUAUUUAUGAA	200 - 218	77.71
268	AUUUCAUCCGAACAUUCA	UGAAUGUUCGGAUGGAAA	428 - 446	77.57
269	CAUCCGUAAUAUUUACG	CGUAUAAUAUUACCGAUG	852 - 870	77.51
270	AAUACCAAUGUAAGAACA	UGGUUCUACAUUGGUAAU	485 - 503	77.5
271	AUAUUAAUAGCUAACAUA	UAUGUUAGCUAUUAAAUAU	1063 - 1081	77.43
272	GAGUUUUCAAAUCGAUGG	CCAUCGAUUUGGAAAACUC	344 - 362	77.2
273	UAUUUAAAAUAUUGCCAA	UUGGCAUAUAUUUUAAAUA	668 - 686	77.09
274	CUUAUCUAACGUUUGAGGA	UCCUCAACGUUAGAUAAAG	942 - 960	76.99
275	CAAUUUGAUUGGUUGACAG	CUGUCAACCAAUCAAAUUG	921 - 939	76.85
276	UCAAUUUAGAUAGGAUUU	AAAUCCUAUCUAAAUUUGA	186 - 204	76.75
277	UUUCAACAUGCCUCGUUUA	UAAACGAGGCAUGUUGAAA	685 - 703	76.66
278	AAAAAACCUAGAAACCCCA	UGGGGUUUCUAGGUUUUUU	589 - 607	76.57
279	ACUUCAUUGAUUUUUGGAGU	ACUCCAAAUCAAUGAAGU	359 - 377	76.56
280	AGAAGUUUAUGUUUCUCCA	UGGAGAAACAUAACUUCU	154 - 172	76.52
281	UCCGUAAUAUUUACGGA	UCCGUAAUAUUUACCGGA	850 - 868	76.44
282	CUCCUUJAGAAGUUUAUGU	ACAUAAACUUCUAAAGGAG	161 - 179	76.42
283	CAGAACAGGCAAAACAUG	CAUUGUUUUGCCUGUUCUG	16 - 34	76.32
284	AAAGACAAUGAACACUUA	UAAGUGUUCAUUUGUCUUU	957 - 975	76.29
285	GUGGAAUAGAUUAUAUCGC	GCGAUUAUAUCAUUCCAC	1186 - 1204	76.27
286	AAUCCGUGAACAGAUUCA	UGAAUCUGUUCACGGAUUU	1039 - 1057	76.03
287	AACGUUUGAGGAUGCAAUU	AAUUGCAUCCUCAACGUU	935 - 953	75.77
288	UGAUUUUUGGAGUUUCCAA	UUGGAAAACUCCAAAUCA	352 - 370	75.69
289	GAGACUUCAUUGAUUUUGG	CCAAAUCAUGAAGUCUC	362 - 380	75.65
290	GUAUAUUUAJACGGAUGGC	GCCAUCCGUAAUAUUUAC	846 - 864	75.54
291	UCCUCCUUJAGAAGUUUAU	AUAAACUUCUAAAGGAGGA	163 - 181	75.5
292	AUGUACUUUJACAAAUAUA	UAAUUUUGUAAAAGUACAU	784 - 802	75.47
293	AACAGAUUCAGGAAAUUCA	UGAAUUUCCUGAAUCUGUU	1030 - 1048	75.47
294	UCAUAUAUUAAAAGAGAA	UUCUCUUUUAAUAUAUUGA	245 - 263	75.41
295	AUAUUUJACAAUUUCAUAA	UUAUGAAAUUGUAAAUAU	212 - 230	75.18
296	AGUGCAAGACAAACUACUU	AAGUAGUUUGUCUUGCACU	991 - 1009	75.14
297	UAAUCAAGUCCAGAUGAA	UUCAUCUGGAACUUGAUUA	118 - 136	75.07
298	UGAUUUGAUUUUUGAAUUU	AAAUCAAAAUCAAAUCA	819 - 837	75.04
299	AGUAUAUAAAGACAAUGA	UCAUUUGUCUUUAUAUACU	964 - 982	75.01
300	AGUUUAUGUUUCUCCAUUU	AAAUGGAGAAACAUAACU	151 - 169	74.85

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
301	UGCAAUAAUUAAUAGCUA	UAGCUAAUAAAUAUUUGCA	1068 - 1086	74.76
302	GUGCUUAUCCAAUUCGAAG	CUUCGAAUUGGAUAAGCAC	507 - 525	74.74
303	CCACAUAAAAGAAAAGGC	GCCUUUUCUUUUUAUGUGG	876 - 894	74.73
304	AUAGCUAACAUACAACGAA	UUCGUUGUAUGUUAGCUAU	1056 - 1074	74.71
305	AAUAUAUGCCAAAAAUUA	UAAUUUUUGGCAUAUAUUU	662 - 680	74.69
306	AAAAUUUUUCCUAACAUUA	UAUGUUAGGAAAUAAUUUU	650 - 668	74.67
307	AGAUCCCUAAUUAAAUCGU	ACGAUUUAAUUAGGGAUUCU	1125 - 1143	74.66
308	GAAAUCCGUGAACAGAUUC	GAAUCUGUUCACGGAUUUC	1040 - 1058	74.56
309	AUUUUUGAAUUUUGAAUUU	AAAUUCAAAAUUCAAAAAU	812 - 830	74.54
310	UAGAAACCCCAACAAAUA	UUUUUUUGUUGGGUUUCUA	581 - 599	74.44
311	ACCAAUUCAUUUCAACAUG	CAUGUUGAAUUGAAUUGGU	694 - 712	74.38
312	GAACAGAUUCAGGAAAUUC	GAAUUUCCUGAAUCUGUUC	1031 - 1049	74.27
313	UGCCUCGUUUUUUUAAAAU	AUUUUAAAUAACGAGGCA	677 - 695	74.27
314	CAAAUACCAUGUAAGAAC	GUUCUUAUAUUGGUUUUG	487 - 505	74.25
315	AGAUUAAGAUCCCUAAUU	AAUUAGGGAUCUUAUAUCU	1132 - 1150	74.24
316	CAUUUCCAUCGGAACAUUC	GAAUGUUCGGAUGGAAAUG	429 - 447	74.2
317	AUGGCCGCUUUAAUGAUUU	AAUCAUUAAGCGGCAU	832 - 850	74.16
318	AAUUACCAAUAGCCAUUU	AAUUGGCUAUUUGGUAAUU	770 - 788	73.92
319	UAAUGAUUUGAUUUUUGAA	UUCAAAAAUCAAUCAUUA	822 - 840	73.86
320	CACAUAAAAGAAAAGGCG	CGCCUUUUCUUUUUAUGUG	875 - 893	73.78
321	ACAUAUCCCAUUGUUCUC	GAGAACAUUGGGUAUUGU	636 - 654	73.74
322	AUUUUACAAUUUCAUAAUU	AAUUUAUGAAAUUGUAAAAU	210 - 228	73.71
323	ACAAUAAAAAAUACAUCA	UGAUGUAUUUUUUAUUUGU	570 - 588	73.68
324	CAAAUAAUUAAUAGCUAAC	GUUAGCUAUUAAUUAUUUG	1066 - 1084	73.61
325	CAACAGAUUAAGAUCCCU	AGGGAUCUUAUAUCUGUUG	1136 - 1154	73.56
326	UGUGCUUAUCCAAUUCGAA	UUCGAAUUGGAUAAGCACA	508 - 526	73.49
327	ACAGAUUCAGGAAAUUCAU	AUGAAUUUCCUGAAUCUGU	1029 - 1047	73.43
328	AAAAGACGGAGACUUCAUU	AAUGAAGUCUCCGUCUUUU	370 - 388	73.41
329	AAUGUACUUUUACAAAUU	AAUUUUGUAAAAGUACAUU	785 - 803	73.38
330	CAUAAAAGAAAAGGCGCG	CGCGCCUUUUCUUUUUAUG	873 - 891	73.08
331	AGGCAAUACCAUGUAAG	CUUACAUUGGUUUUUGCCU	490 - 508	72.96
332	CAUAAGUAUUGUCAUUGAG	CUCAAUGACAAUACUUAUG	43 - 61	72.93
333	AAUUAUUCGUGGCCCAAU	AUUGGGCCACGAUUUAAUU	1117 - 1135	72.87
334	AUAUAAGAUCCCUAAUUAA	UUAAUUAAGGGAUCUUAUAU	1130 - 1148	72.82
335	UUCUCUCUCUAAAGAGGAA	UUCUCUUUAGAGAGAGAA	622 - 640	72.55
336	GAAAUUCAUUUAGAAGUGG	CCACUUCUAAAUGAAUUC	1019 - 1037	72.49
337	CCAAUUCAUUUCACAUGC	GCAUGUUGAAAUGAAUUGG	693 - 711	72.41
338	AAUUUUGAAUUGCAAUGUA	UACAUUGCAAUUCAAAAUU	798 - 816	72.4
339	CAUAUCCCAUUGUUCUCU	AGAGAACAUUGGGUAUUG	635 - 653	72.39
340	AACAGAUUAAGAUCCCUA	UAGGGAUCUUAUAUCUGUU	1135 - 1153	72.37
341	CUUACAACAGAUUAAGAU	AUCUUAUAUCUGUUGUAAG	1140 - 1158	72.35
342	GAAUUGAUUAUAUCGCCUG	CAGGCGAUUAUAUCAUUUC	1183 - 1201	72.06

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
343	GACACCAAUUCAUUUC AAC	GUUGAAAUGAAUUGGUGUC	697 - 715	71.92
344	AGAUUCAGGAAAUUC AUUU	AAAUGAAUUUCCUGAAUCU	1027 - 1045	71.91
345	UGCAUGUACUUUUACAAA	UUUGUAAAAGUACAUUGCA	788 - 806	71.78
346	CAUGUGCUUAUCCAAUUCG	CGAAUUGGAUAAGCACAUG	510 - 528	71.58
347	AUUUCCUAACAUAUCCCAA	UUGGGAUUAGUUAGGAAAU	644 - 662	71.56
348	GACUAUAUUUUACAAUUUC	GAAAUUGUAAAAUUAUGUC	216 - 234	71.5
349	ACGGAGACUUCAUUGAUUU	AAAUCAAUGAAGUCUCCGU	365 - 383	71.47
350	AAUUCAUUUAGAAGUGGAU	AUCCACUUCUAAAUGAAUU	1017 - 1035	71.34
351	AAUUUAGAUAGGAUUUUUA	UAAAAUCCUUAUCUAAAUU	183 - 201	71.34
352	AUGCAAUUUGAUUGGUUGA	UCAACCAAUCAAUUUGCAU	924 - 942	71.34
353	GAUCCCUAAUUAAAUCGUG	CACGAUUUAAUUAGGGAU	1124 - 1142	71.17
354	UGAACAGAUUCAGGAAAUU	AAUUUCCUGAAUCUGUUCA	1032 - 1050	71.07
355	ACGUUUGAGGAUGCAUUUU	AAAUUGCAUCCUCAAACGU	934 - 952	71.04
356	UAAUUAAAUCGUGGCCCAA	UUGGGCCACGAUUUAAUUA	1118 - 1136	71.03
357	AAAUUACCAAUAGCCAUU	AAUGGCUAUUUGGUAAUUU	771 - 789	70.63
358	AUUCGAAGGCAAUACCAA	UUGGUAUUUGCCUUCGAAU	496 - 514	70.58
359	GAUAGGAUUUUUAGUCCUC	GAGGACUAAAAUCCUAUC	177 - 195	70.24
360	GAAUUUUGAAUUGCAAUGU	ACAUUGCAAUUCAAAAUUC	799 - 817	70.18
361	AAAACCUAGAAACCCCAA	UUGGGUUUCUAGGUUUUU	588 - 606	70.16
362	AUUUGGUGUCCAGGUUAAA	UUUAUCCUGGACACCAAU	755 - 773	70.14
363	AAGCACUUUCCCAAUUAAA	UUUAAUUGGGAAGUGCUU	605 - 623	70.08

ANEXO H: Se presentan los siRNAs del 51 al 225 que continúan de la Tabla 11. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de CuLCrV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
51	ACAUUUUCUUAACAUAUCC	GGAUAUGUUAAGAAAUGU	632 - 650	86.74
52	UUGUGAAUUUAUCAUAACAU	AUGUUAUGAUAAUUCACAA	203 - 221	86.65
53	AACAUUUUCUUAACAUAUCC	GAUAUGUUAAGAAAUGUU	633 - 651	86.59
54	AUUUAUCCGGUAAGUCUAAC	GUUAGACUUAACGGAUAAU	478 - 496	86.56
55	AAGAAUUACAUCACCAAAG	CUUUGGUGAUGUAAUUCUU	366 - 384	86.12
56	UUUCCGUUAUCAUCGUUCA	UGAACGAUGAUACGGAAA	129 - 147	86.11
57	AUCUUAACUGGUCAAUCGU	ACGAUUGACCAGUUAAGAU	569 - 587	86.06
58	AAUUCUUCGUUAUAUCAG	CUGAUUAACGAAAGGAAUU	657 - 675	85.88
59	UACAAAUCUAGCAAGGAC	GUCCUUGCUAGAUUUUGUA	304 - 322	85.87
60	UCCAAAAGAGUAAAGUUGU	ACAACUUUACUCUUUUGGA	918 - 936	85.65
61	UAUAGAUAAAGGACCACGA	UCGUGGUCCUUUAUCUUA	1007 - 1025	85.62
62	UUGAGUUAAGUGUCCUAA	UUAGGACACUUUAACUCAA	1041 - 1059	85.58
63	UAGUCAAGAAAGCAUAAA	AUUUAUGCUUUCUUGACUA	986 - 1004	85.45
64	UUUUACGUGGUCCAAAAGA	UCUUUUGGACCACGUAAAA	928 - 946	85.43
65	AAAAGAGUAAAGUUGUGGU	ACCACAACUUUACUCUUUU	915 - 933	85.4

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
66	UUUACAAUAUGCCACGGA	UCCGUGGCAUAUUUGUAAA	681 - 699	85.35
67	AAUUACAUCACCAAAGAAG	CUUCUUUGGUGAUGUAAUU	363 - 381	85.32
68	CUCUUAUUUACAAUAUGC	GCAUAUUUGUAAAUAAGAG	687 - 705	85.14
69	AAGGUGAUUAUUGUGAGUC	GACUCACAAUAUACCCUU	347 - 365	85.05
70	UUAACUGGUCAAUCGUCAA	UUGACGAUUGACCAGUAAA	566 - 584	85
71	UCAAGAAAGCAUAAAUAUG	CAUAUUUAUGCUUUCUUGA	983 - 1001	84.98
72	CUAGAUUUUUCGACCUUGC	GCAAGGUCGAAAAUCUAG	449 - 467	84.89
73	AAAGCAUAAAUAUGUAGAC	GUCUACAUAUUUAUGCUUU	978 - 996	84.7
74	AUCCGGUAAUAUUAUUGCG	CGCAUAUAUUAUACCGGAU	833 - 851	84.67
75	AAGGAUGCAGAUUUUUCG	CGAAAAUCUAGCAUCCUU	456 - 474	84.52
76	UAAUCCUUUCGUUAUCA	UGAUUAACGAAAGGAUUA	658 - 676	84.49
77	UAUUUACAAUAUGCCACG	CGUGGCAUAUUUGUAAAUA	683 - 701	84.49
78	UAGAGAAUUUAGCCUUGA	UCAAGGCUAAAAUUCUCUA	773 - 791	84.43
79	UUCUUAACAUAUCCUCAGU	ACUGAGGAUAUGUUAAGAA	627 - 645	84.39
80	UUAGUCAAGAAAGCAUAAA	UUUAUGCUUUCUUGACUAA	987 - 1005	84.34
81	AAUUUUAGCCUUGAGAUAU	AUAUCUCAAGGCUAAAAUU	768 - 786	84.32
82	UGGUCCAAAAGAGUAAAAGU	ACUUUACUCUUUUGGACCA	921 - 939	84.28
83	AUUUAUAAAAGCCGGUGAUC	GAUCACCGGCUUUUAUAAU	234 - 252	84.27
84	AAGUUGUGGUUGAAUCAUG	CAUGAUUCAACCACAACUU	906 - 924	84.26
85	UUCCGAAAGAUGAAGCUAU	AUAGCUUCAUCUUUCGGAA	602 - 620	84.22
86	AAAGAAGGUGAUUAUUGUG	CACAAUAAUCACCUUCUUU	351 - 369	84.18
87	UACACUGCCUCAUUCAAUU	AAUUGAAUGAGGCAGUGUA	494 - 512	84.15
88	UUACAUCACCAAAGAAGGU	ACCUUCUUUGGUGAUGUAA	361 - 379	84.12
89	AAGCAUAAAUAUGUAGACU	AGUCUACAUAUUUAUGCUU	977 - 995	84.1
90	CUCUCGACAUUAUAAAAGC	GCUUUUAUAAUGUCGAGAG	242 - 260	84.05
91	UCCAAAACGUUUUAUUGUG	CACAAUAAACGUUUUUGGA	217 - 235	84.03
92	UCAGCCAAGAACAUUUUUCU	AGAAAUGUUCUUGGCUGA	642 - 660	84.03
93	AAGAGUAAAGUUGUGGUUG	CAACCACAACUUUACUCUU	913 - 931	83.99
94	UAAAGUUGUGGUUGAAUCA	UGAUUCAACCACAACUUUA	908 - 926	83.96
95	UACCAGUUUUCACCCAAAU	AUUUGGGUGAAAACUGGUA	415 - 433	83.91
96	AUAAUCAUAGAAGGUGACU	AGUACCUUCUAUGAUUAU	27 - 45	83.91
97	CAUUUAUAGAUAAAGGACC	GGUCCUUUAUCUAUAAAUG	1011 - 1029	83.87
98	UGGUGCGUAUUCUUUUACG	CGUAAAAGAAUACGCACCA	940 - 958	83.61
99	AUGCUAGAUUUUUCGACCU	AGGUCGAAAAUUCUAGCAU	452 - 470	83.6
100	UUUGAGUUAAGUGUCCUA	UAGGACACUUAACUCAAA	1042 - 1060	83.53
101	AAAGUGUCCUAAAUUGUCA	UGACAAUUUAGGACACUUU	1034 - 1052	83.5
102	UGGUAGAGAAUUUUAGCCU	AGGCUAAAAUUCUCUACCA	776 - 794	83.41
103	UUUUCACCCAAAUGUUCAG	CUGAACAUUUGGGUGAAAA	409 - 427	83.37
104	UCCUGGUAGAGAAUUUUAG	CUAAAUAUCUCUACCAGGA	779 - 797	83.2
105	AAGAUGAAGCUAUUCAGAU	AUCUGAAUAGCUUCAUCUU	596 - 614	83.18
106	AAGUAUAAUCAUAGAAGGU	ACCUUCUAUGAUUAUACUU	31 - 49	83.17
107	UAUCAUAACAUAAGGCUA	UAGCCUUUAUGUUAUGAUA	195 - 213	83.17

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
108	UUUAUUGUGAAUUAUCAUA	UAUGAUAAUUCACAAUAAA	207 - 225	82.98
109	UUAUUGUGAAUUAUCAUAA	UUAUGAUAAUUCACAAUAA	206 - 224	82.98
110	AGCCUUGAGAUUAAAUGG	CCAUUUAUAUCUCAAGGCU	762 - 780	82.85
111	UCUUAACAUAUCCUCAGUG	CACUGAGGAUAUGUUAAGA	626 - 644	82.79
112	CAAAGAGUAAAGUUGUGG	CCACAACUUUACUCUUUUG	916 - 934	82.75
113	UUGAGAUUAAAUGGGACA	UGUCCCAUUUAUAUCUCA	758 - 776	82.72
114	AUGCUUCAGCAUCUUAACU	AGUUAAGAUGCUGAAGCAU	579 - 597	82.55
115	UGAGAUUAAAUGGGACAC	GUGUCCCAUUUAUAUCUCA	757 - 775	82.5
116	CAUCCGGUAAUUAUUAUUGC	GCAAUAAUUAUACCGGAUG	834 - 852	82.47
117	AACAUAAGUUUCUGGAGAG	CUCUCCAGAAACUAUUGUU	726 - 744	82.44
118	UAUCAGCCAAGAACAUUUU	AAAAGUUCUUGGCUGAUA	644 - 662	82.16
119	UCGGCAUUUUGAGUAAAAG	CUUUAAUCUAAAAUGCCGA	1049 - 1067	82.15
120	AAAGAUGAAGCUAUUCAGA	UCUGAAUAGCUUCAUCUUU	597 - 615	82.11
121	UUCUUUUACGUGGUCCAAA	UUUGGACCACGUAAAAGAA	931 - 949	82.04
122	UAGAAGUAUAAUCAUAGAA	UUCUAUGAUUAUACUUCUA	34 - 52	81.93
123	ACGUUUUAUUGUGAAUUAUC	GAUAAUUCACAAUAAACGU	210 - 228	81.91
124	UAUUCUUUUACGUGGUCCA	UGGACCACGUAAAAGAAUA	933 - 951	81.78
125	AAAGUUGUGGUUGAAUCAU	AUGAUUCAACCACAACUUU	907 - 925	81.75
126	AUCAGCCAAGAACAUUUUC	GAAAAGUUCUUGGCUGAU	643 - 661	81.72
127	UGUCCUAAAUUGUCAUUAU	AUAAUGACAAUUUAGGACA	1030 - 1048	81.7
128	UGAUGAUUUAUUUGGGAGG	CCUCCAAAAUUAUCAUCA	79 - 97	81.67
129	AAUAUGUAGACUUGUCAGA	UCUGACAAGUCUACAUAUU	970 - 988	81.52
130	AGAAGUAUAAUCAUAGAAG	CUUCUAUGAUUAUACUUCU	33 - 51	81.45
131	UGUCAUUAUCAUUUAUAGA	UCUAUAAAUGAUAAUGACA	1020 - 1038	81.42
132	CAUUUUGAGUUAAGUGUC	GACACUUUAACUAAAUG	1045 - 1063	81.39
133	AUCCAAAACGUUUAUUGU	ACAAUAAACGUUUUUGGAU	218 - 236	81.37
134	AUAUCAGCCAAGAACAUUU	AAAAGUUCUUGGCUGAUUA	645 - 663	81.29
135	AUUGUGAAUUAUCAUAACA	UGUUAUGAUAAUUCACAAU	204 - 222	81.18
136	AAGAACAUUUUCUUAACAU	AUGUUAAGAAAUGUUCU	636 - 654	81.08
137	GAAGUAUAAUCAUAGAAGG	CCUUCUAUGAUUAUACUUC	32 - 50	80.99
138	AAAACGUUUUAUUGUGAAUU	AAUUCACAAUAAACGUUUU	213 - 231	80.89
139	AGUAUAAUCAUAGAAGGUG	CACCUUCUAUGAUUAUACU	30 - 48	80.63
140	UCAUAACAUAAGGCUAAC	GUUAGCCUUUAUGUUAUGA	193 - 211	80.33
141	AUAACAUAAGGCUAACA	AUGUUAGCCUUUAUGUUAU	191 - 209	80.29
142	AUUCAAUUAUCCGGUAAGU	ACUUACCGGAUAAUUGAAU	483 - 501	80.14
143	AUAUGUAGACUUGUCAGAA	UUCUGACAAGUCUACAUAU	969 - 987	80.11
144	CAUCUUAACUGGUCAAUCG	CGAUUGACCAGUUAAGAUG	570 - 588	80.08
145	UAACUGGUCAAUCGUCAA	UUUGACGAUUGACCAGUUA	565 - 583	79.96
146	UUUAGCCUUGAGAUUAAA	UUUAUAUCUCAAGGCUAAA	765 - 783	79.92
147	AGUUUUCACCCAAUGUUC	GAACAUUUGGGUGAAAACU	411 - 429	79.8
148	UCCUAAAUUGUCAUUUAUCA	UGAUAAUGACAAUUUAGGA	1028 - 1046	79.57
149	UUACAAUAUGCCACGGAA	UUCGGUGGCAUAUUUGUAA	680 - 698	79.39

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
150	GUAAAGUUGUGGUUGAAUC	GAUUCAACCACAACUUUAC	909 - 927	79.38
151	UUUUAGCCUUGAGAUUAAA	UUUAUUCUCAAGGCUAAAA	766 - 784	79.36
152	AGAUGAAGCUAUUCAGAUG	CAUCUGAAUAGCUUCAUCU	595 - 613	79.35
153	UGUCCAUUUCCGUUAUCAU	AUGAUAACGGAAAUGGACA	135 - 153	79.16
154	UUCGUUAUUCAGCCAAGAA	UUCUUGGCUGAUUAACGAA	650 - 668	79.15
155	UGUCCUGGUAGAGAAUUUU	AAAAUUCUCUACCAGGACA	781 - 799	79.08
156	AAGAAGGUGAUUAUUGUGA	UCACAUAUAUCACCUUCUU	350 - 368	79.05
157	UGAAGCUAUUCAGAUGCUU	AAGCAUCUGAAUAGCUUCA	592 - 610	79.01
158	AUUUAUAGAUAAAAGGACCA	UGGUCCUUUAUCUAUAAA	1010 - 1028	78.97
159	AUCAUUUAUAGAUAAAAGGA	UCCUUUAUCUAUAAAUGAU	1013 - 1031	78.71
160	UGAUCCAAAACGUUUUAUU	AAUAAACGUUUUUGGAUCA	220 - 238	78.7
161	UGAGUUAAGUGUCCUAAA	UUUAGGACACUUUAACUCA	1040 - 1058	78.67
162	UCAAGGAUGCUAGAUUUUU	AAAAUCUAGCAUCCUUGA	458 - 476	78.55
163	AACGUUUUAUUGUGAAUUUAU	AUAAUUCACAAUAAACGUU	211 - 229	78.48
164	AGAAUUUUAGCCUUGAGAU	AUCUCAAGGCUAAAAUUCU	770 - 788	78.42
165	UGGGCUGAUGAUUAUUUUG	CAAAUUAUUCUAGCCCA	84 - 102	78.33
166	AUCAAGGAUGCUAGAUUUUU	AAAUCUAGCAUCCUUGAU	459 - 477	77.86
167	UGAUUAUUUUGGGAGGGAU	AUCCCUCCAAAAUUAUCA	76 - 94	77.75
168	CUUGAGAUUAUAAUGGGAC	GUCCAUUUUAUUCUCAAG	759 - 777	77.69
169	CAUAAAUAUGUAGACUUGU	ACAAGUCUACAUUUUAUG	974 - 992	77.53
170	ACUGCCUCAUUCAAUUAUC	GAUAAUUGAAUGAGGCAGU	491 - 509	77.5
171	AGAAAGCAUAAAUAUGUAG	CUACAUAUUUAUGCUUUCU	980 - 998	77.48
172	CUAAUUCUUCGUUAUAUC	GAUAUACGAAAGGAUUUAG	659 - 677	77.45
173	AAAGAGUAAAGUUGUGGUU	AACCACAACUUACUCUUU	914 - 932	77.31
174	AUGUCCAUUUCCGUUAUCA	UGAUAACGGAAAUGGACAU	136 - 154	77.24
175	CUCGACAUUAUAAAAGCCG	CGGCUUUUAUAAUGUCGAG	240 - 258	77.19
176	ACAAACAUAAGUUUCUGGA	UCCAGAAACUAUUGUUUGU	729 - 747	77.11
177	AGAAGGUGAUUAUUGUGAG	CUCACAAUAAUCACCUUCU	349 - 367	76.89
178	CAAGGAUGCUAGAUUUUUC	GAAAAUCUAGCAUCCUUG	457 - 475	76.75
179	UGAAUUAUCAUAACAUAUAA	UUUAUGUUAUGAUAAUUCA	200 - 218	76.38
180	CAAGAAAGCAUAAAUAUGU	ACAUAUUUAUGCUUUCUUG	982 - 1000	76.3
181	GUUAAAGUGUCCUAAAUUG	CAUUUAGGACACUUUAAC	1037 - 1055	76.29
182	AAUGCGAGCUAGAAGUAUA	UAUACUUCUAGCUCGCAUU	43 - 61	76.16
183	AGAGAAUUUUAGCCUUGAG	CUCAAGGCUAAAAUUCUCU	772 - 790	76.07
184	UGCUGAUUUUUCGACCUU	AAGGUCGAAAAUCUAGCA	451 - 469	75.83
185	AGUUAAGUGUCCUAAAUU	AAUUUAGGACACUUUAACU	1038 - 1056	75.82
186	AAGUGUCCUAAAUUGUCAU	AUGACAAUUUAGGACACUU	1033 - 1051	75.75
187	GUCCUAAAUUGUCAUUAUC	GAUAAUGACAAUUUAGGAC	1029 - 1047	75.65
188	CACGACUUAUGUCAAGAAAG	CUUUCUUGACUAAGUCGUG	993 - 1011	75.58
189	AAUCGUCAAACCGACGUAU	AUACGUCGGUUUGACGAUU	556 - 574	75.54
190	AGCAUAAAUAUGUAGACUU	AAGUCUACAUUUUAUGCU	976 - 994	75.4
191	AAACAUAAGUUUCUGGAGA	UCUCCAGAAACUAUUGUUU	727 - 745	75.38

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
192	AAGAAAGCAUAAAUAUGUA	UACAUUUUAUGCUUUCUU	981 - 999	74.83
193	AUAGAAGGUGACUCAAGAA	UUCUUGAGUCACCUUCUAU	21 - 39	74.8
194	AAUUGUCAUUAUCAUUUAU	AUAAAUGAUAAUGACAAUU	1023 - 1041	74.59
195	UCUUUUACGUGGUCCAAAA	UUUUGGACCACGUAAAAGA	930 - 948	74.49
196	GUGCGUAUUCUUUUACGUG	CACGUAAAAGAAUACGCAC	938 - 956	74.42
197	AUUGUCAUUAUCAUUUAUA	UAUAAAUGAUAAUGACAAU	1022 - 1040	74.17
198	UGGCUCUUAUUUACAAAUA	UAUUUGUAAAUAAGAGCCA	690 - 708	74.09
199	AUGGGCUGAUGAUUAUUUU	AAAAUAAUCAUCAGCCCAU	85 - 103	73.95
200	AUCACCAAAGAAGGUGAUU	AAUCACCUUCUUUGGUGAU	357 - 375	73.91
201	CACCACAAACAAUAGUUUC	GAAACUAUUGUUUGUGGUG	733 - 751	73.77
202	AAGCUAUUCAGAUGCUUCA	UGAAGCAUCUGAAUAGCUU	590 - 608	73.65
203	AGAAUJACAUACACCAAAGA	UCUUUGGUGAUGUAAUUCU	365 - 383	73.36
204	AAAUUGUCAUUAUCAUUUA	UAAAUGAUAAUGACAAUUU	1024 - 1042	73.3
205	CAAACAUAUAGUUUCUGGAG	CUCCAGAAACUAUUGUUUG	728 - 746	73.02
206	CUGAUGAUUAUUUUGGGAG	CUCCAAAAUAAUCAUCAG	80 - 98	73.02
207	ACCACAAACAAUAGUUUCU	AGAAACUAUUGUUUGUGGU	732 - 750	72.81
208	UCAUUAUCAUUUAUAGAUA	UAUCUAUAAAUGAUAAUGA	1018 - 1036	72.74
209	GUAUAUUAUUGCGGAUGG	CCAUCGCAAAUAAUUAUAC	828 - 846	72.73
210	GUCCAAAAGAGUAAAGUUG	CAACUUUACUCUUUUGGAC	919 - 937	72.35
211	CUAAAUUGUCAUUAUCAUU	AAUGAUAAUGACAAUUUAG	1026 - 1044	72.25
212	AGGACACCAAAAUUUGCG	CGCAAAUUUUUGGUGUCCU	855 - 873	72.19
213	CACAAACAUAUAGUUUCUGG	CCAGAAACUAUUGUUUGUG	730 - 748	72.08
214	UUCGGCAUUUUGAGUUAUA	UUUAACUCAAAAUGCCGAA	1050 - 1068	72.04
215	AUUCGAAAGAUGAAGCUA	UAGCUUCAUCUUUCGGAAU	603 - 621	71.93
216	AAAAACGUUAUUGUGAAU	AUUCACAUAAAACGUUUUU	214 - 232	71.81
217	UCAUUCAAUUAUCCGUAA	UUACCGGAUAAUUGAAUGA	485 - 503	71.32
218	UGCGAGCUAGAAGUAUAAU	AUUUAUCUUCUAGCUCGCA	41 - 59	71.12
219	UGUGAAUUAUCAUAACAUA	UAUGUUAUGAUAAUUCACA	202 - 220	71.11
220	ACUUAGUCAAGAAAGCAUA	UAUGCUUUCUUGACUAAGU	989 - 1007	71.04
221	CAUUUUCUUAACAUAUCCU	AGGAUAUGUUAAGAAAUG	631 - 649	71
222	AGAGGACACCAAAAUUUG	CAAAUUUUUGGUGUCCUCU	857 - 875	70.91
223	ACAUAAGGCUAACAUCGA	UCGAUGUUAGCCUUUAUGU	188 - 206	70.79
224	GAAAGAUGAAGCUAUUCAG	CUGAAUAGCUUCAUCUUUC	598 - 616	70.77
225	GUCAAGAAAGCAUAAAUAU	AUAUUUAUGCUUUCUUGAC	984 - 1002	70.48

ANEXO I: Se presentan los siRNAs del 51 al 250 que continúan de la Tabla 15. Lista de siRNAs candidatos de alta precisión predictiva obtenidos del fragmento AC1-RI-AV1 de SLCuV.

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
51	UUUUUAGCUAACGUCGAGA	UCUCGACGUUAGCUAAUAA	192 - 210	86.68
52	UUUACGAAAUUGCCACGA	UCGUGGCAUUAUUUCGUAAA	688 - 706	86.48
53	AACAAAGACGACGUUAUUC	GAUAUACGUCGUCUUUGUU	300 - 318	86.41
54	UUUAUUUUAUAGGGACCACA	UGUGGUCCUAUAAAUAUA	1004 - 1022	86.41
55	AUAAUUUAUAGCUAACGU	ACGUUAGCUAAUAAAUUAU	197 - 215	86.29
56	UUCUUAACUUAUCCAAGGU	ACCUUGGAUAAGUUAAGAA	633 - 651	86.27
57	UUACAUUAGAGUCGCAAGA	UCUUGCGACUCUAAUGUAA	547 - 565	86.27
58	UAUCUGGAAAAUCCAACAU	AUGUUGGAUUUUCCAGAU	482 - 500	86.19
59	AAAUCCAACAUCAAGGAUG	CAUCCUUGAUGUUGGAUUU	474 - 492	86.16
60	UCCCAAAGAAGAAGUUCU	AGAACUUCUUCUUGGGAA	608 - 626	86.16
61	UUAGUCACCAAGUCAUUAU	AUAUAGACUUGGUGACUAA	984 - 1002	86.13
62	UGUGUCUUGAGGUUAUUAU	AUAUAUACCUCAAGACACA	771 - 789	86.12
63	UUGAGGUUAUUAUAGGACA	UGUCCUAUAUAUACCUCAA	765 - 783	86.06
64	UGAUCCAAGACGUUUUAUC	GAUAAACGUCUUUGGAUCA	226 - 244	86.02
65	AACGUCGAGAGAUUAUUUC	GAAAUAAUCUCUCGACGUU	183 - 201	85.92
66	UAUCGUUAAUUAUCAUAAU	AUUAUGAUAAUUAACGAUA	211 - 229	85.79
67	AUAUGAGAAAGUUGAGAGG	CCUCUCAACUUCUCAUAU	732 - 750	85.76
68	UGUCAGCUUUUUUAUAGG	CCUAUAAAUAAGCUGACA	1011 - 1029	85.66
69	AAAGUCGAACAAAGACGAC	GUCGUCUUUGUUCGACUUU	307 - 325	85.03
70	AUUACAUAUAGAGUCGCAAG	CUUGCGACUCUAAUGUAAU	548 - 566	85.02
71	AUUUAUAAAAGCUGGUGAUC	GAUACCCAGCUUUUAUAAU	240 - 258	84.98
72	CUAGUAUAAUCAUAGAAGG	CCUUCUAUGAUUAUACUAG	41 - 59	84.97
73	AAGGCCAACUAGUAUAAUC	GAUUAUACUAGUUGGCCUU	49 - 67	84.9
74	AUUUUUUUAUAGAGUGUUC	GAACACUCAUUAUUAAUAAU	80 - 98	84.89
75	UAAUGUGGUCCAUAAAUA	AUUUUUAUGGGACCACAUAU	924 - 942	84.75
76	UCCAGAAGAGUUACAAGA	UCUUGUAACUCUUCUGGAA	110 - 128	84.74
77	UUUCGUUUAAACUGCCAGAA	UUCUGGCAGUUAACGAAA	657 - 675	84.73
78	AUCCGGUAAUUAUUAUUGCG	CGCAUAAUUAUACCGGAU	830 - 848	84.67
79	UUUAACUGCCAGAAAUAUA	UAUAUUUCUGGCAGUUAUA	652 - 670	84.59
80	UGGAAAUAUCAACAAG	CUUGAUGUUGGAUUUUCCA	478 - 496	84.43
81	AAUCCGGGCAUAUAAAGU	ACUUUAUAUUGCCCGGAU	338 - 356	84.27
82	AUCUGGAAAUAUCAACAU	GAUGUUGGAUUUUCCAGAU	481 - 499	84.2
83	UACACUGCCUCAUUCAAU	AAUUGAAUGAGGCAGUGUA	500 - 518	84.15
84	UAUGUGUCUUGAGGUUAU	AUAUACCUCAAGACACUA	773 - 791	84.15
85	UCAUAAUUUAUUAAGCUAAC	GUUAGCUAAUAAAUUAUGA	199 - 217	84.14
86	AAUAAAAAAAGGUUGUGGU	ACCACAACUUUUUUUAUU	908 - 926	84.1
87	CAUAUUUACGAAAUAUGCC	GGCAUUAUUUCGUAAUAUG	692 - 710	84.06
88	CUCUCGACAUUAUAAAAGC	GCUUUUAUAAUGUCGAGAG	248 - 266	84.05
89	UUAUUUAUCAUAAUUUAUU	AAUAAUUUAUGAUAAUUA	206 - 224	84.03
90	AUUUACGAAUAUGCCACG	CGUGGCAUUAUUUCGUAAU	689 - 707	83.98
91	AAGUUCUUGAGAUGCUUCU	AGAAGCAUCUCAAGAACUU	596 - 614	83.96

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
92	UACCAUUUUGAAUUAAAAGA	UCUUUAAUUCAAAAUGGUA	1041 - 1059	83.95
93	AUGUCAGCUUUUUAUUUUAUAG	CUAUAAAUAAGCUGACAU	1012 - 1030	83.93
94	AAAGAGGGUGAUUAUUGUG	CACAUAUAUCACCCUCUUU	357 - 375	83.9
95	AUUUAUUAGCUAACGUCGA	UCGACGUUAGCUAAUAAU	194 - 212	83.87
96	UUAAGAGGUUAUGGGUAU	AUAUCCAUACCUCUUUAA	1029 - 1047	83.83
97	UCUCUCUUUACCAUUUUGA	UCAAAAUGGUAAAGAGAGA	1049 - 1067	83.81
98	AAUAUAUUCUUAACUUAU	AUAAGUUAAGAAUAUAUU	640 - 658	83.78
99	UCUCUUUACCAUUUUGAAU	AUUCAAAUGGUAAAGAGA	1047 - 1065	83.61
100	UCGUUUAACUGCCAGAAAU	AUUUCUGGCAGUUAACGA	655 - 673	83.58
101	UCAUUUAUUGUAGACUCG	CGAGUCUACAUAUAAUGA	972 - 990	83.5
102	AUGAUUAUUUAAUGAGUG	CACUCAUUAUUAAUCAU	83 - 101	83.42
103	AGAUUAUUUCAGAAACCUC	GAGGUUUCUGAAUAAUCU	174 - 192	83.41
104	UAAAGAGGUUAUGGGUAUUG	CAUAUCCCAUACCUCUUUA	1028 - 1046	83.23
105	UAACUGCCAGAAUAUAUU	AAUAUAUUUCUGGCAGUUA	650 - 668	83.15
106	UUUAUCGUUAAUAUCAUA	UAUGAUAAUUAACGAUAAA	213 - 231	83.1
107	UCACCAAGUCAUUAUUUAUG	CAUAAUAUGACUUGGUGA	980 - 998	83.08
108	UAACGUCGAGAGAUUAUUU	AAUAUAUCUCUCGACGUUA	184 - 202	83.05
109	AAGAAGUUCUUGAGAUGCU	AGCAUCUCAAGAACUUCUU	599 - 617	82.98
110	UGCCUCAUUCAAUUAUCUG	CAGAUAAUUGAAUGAGGCA	495 - 513	82.96
111	UUAUCGUUAAUUAUCAUAA	UUAUGAUAAUUAACGAUAA	212 - 230	82.87
112	UAAAGUAGAGGACACCAA	UUUGGUGUCCUCUACUUUA	860 - 878	82.8
113	UAUAUUCUUAACUUAUCCA	UGGAUAAGUUAAGAAUAUA	637 - 655	82.73
114	ACGUUUAUCGUUAAUUAUC	GAUAAUUAACGAUAAACGU	216 - 234	82.68
115	UCUCGACAUUAUAAAAGCU	AGCUUUUAUAAUGUCGAGA	247 - 265	82.64
116	UCGAACAAAGACGACGUAU	AUACGUCGUCUUGUUCGA	303 - 321	82.54
117	UGGUUGGAAUAUUAUUGU	ACAUUAAUUAUCCAACCA	937 - 955	82.49
118	CAUCCGGUAAUAUUAUUGC	GCAUUAUAUUAACCGGAUG	831 - 849	82.47
119	AAACCCUAAUUCUUCUUCGU	ACGAAAGGAAUAGGGUUU	670 - 688	82.44
120	AAAAUAAAAAAGGUUGUG	CACAACCUUUUUUAUUUU	910 - 928	82.38
121	AGAGAUUAUUUCAGAAACC	GGUUUCUGAAUUAUCUCU	176 - 194	82.36
122	AAAGACGACGUUAUUCACA	UGUGAUUAACGUCGUCUUU	297 - 315	82.22
123	UAGUCACCAAGUCAUUAUU	AAUAUAGACUUGGUGACUA	983 - 1001	82.18
124	AUUUAUAGGGACACACUU	AAGUGUGGUCCUAUAAAU	1001 - 1019	82.16
125	UUGGGCUGAUGAUUAUUUU	AAAAUAAUCAUCAGCCCAA	91 - 109	82.03
126	ACGAAUAUGCCACGAAAC	GUUUCGUGGCAUUAUUCGU	685 - 703	82.01
127	AGAAGAGUUACAAGAUUGG	CCAAUCUUGUAACUCUUCU	106 - 124	81.97
128	AAACCGAAUUAUAUAGAG	CUCUAAUGUAAUUCGGUUU	555 - 573	81.76
129	AAGUCAUUAUUAUGUAGAC	GUCUACAUAUUAUGACUU	975 - 993	81.72
130	UUAUGUGUCUUGAGGUUAU	UAUACCUCAAGACACAUAA	774 - 792	81.68
131	AACUGCCAGAAUAUAUUC	GAAUAUAUUUCUGGCAGUU	649 - 667	81.65
132	UCUUAACUUAUCCAAGGUG	CACCUUGGAUAAGUUAAGA	632 - 650	81.61
133	AUCUCUCUUUACCAUUUUG	CAAAAUGGUAAAGAGAGAU	1050 - 1068	81.6
134	UCCCAUAAAAUAAAAAAG	CUUUUUUAUUUAUGGGA	916 - 934	81.57

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
135	UGAUGAUUUUUUAAUGAG	CUCAUUAAAAUAAUCAUCA	85 - 103	81.56
136	AUGUUCCAAAGAAGAAGU	ACUUCUUCUUUGGGAACAU	611 - 629	81.4
137	AGCUUUUUUAUAGGGACC	GGUCCCUAUAUUAAAGCU	1007 - 1025	81.34
138	UUCGUUUAAACUGCCAGAAA	UUUCUGGCAGUUAAACGAA	656 - 674	81.29
139	UUUACCAUUUUUGAAUUAAA	UUUAAUUCAAAAUGGUAAA	1043 - 1061	81.29
140	ACUAGUAUAAUCAUAGAAG	CUUCUAUGAUUAUACUAGU	42 - 60	81.04
141	UGAUUUUUUAAUGAGUGU	ACACUCAUUAAAAUAAUCA	82 - 100	80.92
142	UAUCAUAAUUUAUAGCUA	UAGCUAAUAAUUUAUGAUA	201 - 219	80.88
143	UAGAGGCUUUUAUGUGUCUU	AAGACACAUAAGCCUCUA	782 - 800	80.65
144	AGUAUAAUCAUAGAAGGUG	CACCUUCUAUGAUUAUACU	39 - 57	80.63
145	UAUGUCAGCUUUUAUUUAUA	UAUAAAUAAGCUGACAUA	1013 - 1031	80.58
146	AUCCAAAGACGUUUUUCGU	ACGAUAAACGUCUUUGGAU	224 - 242	80.5
147	UAAAAGCUGGUGAUCCAAA	UUUGGAUCACCAGCUUUUA	236 - 254	80.47
148	UUAAUGUGGUCCCAUAAAA	UUUUUUGGGACCACAUUAA	925 - 943	80.28
149	UCUGGAAAUAUCCAACAUCA	UGAUGUUGGAUUUCCAGA	480 - 498	80.18
150	UAAUAAUGUGGUCCCAUA	UAUGGGACCACAUUAAUUA	928 - 946	79.96
151	UAUAAUCAUAGAAGGUGGU	ACCACCUUCUAUGAUUAUA	37 - 55	79.88
152	AUUUCACCCAAACAUUCAG	CUGAAUGUUUGGGUGAAAU	415 - 433	79.84
153	UGGAAUAAUUAUGUGGUC	GACCACAUUAAUUAUCCA	933 - 951	79.79
154	AUCGUUAAUUAUCAUAAUU	AAUUAUGAUAAUUAAACGAU	210 - 228	79.71
155	AUAAUUAUGUGGUCCCAU	AUGGGACCACAUUAAUUAU	929 - 947	79.7
156	GUAAUUAUCAUAGAAGGUGG	CCACCUUCUAUGAUUAUAC	38 - 56	79.7
157	UUACGAAUAUGCCACGAA	UUCGUGGCAUUAUUUCGUA	687 - 705	79.68
158	AGUCAUUAUUAUGUAGACU	AGUCUACAUAUAAUGACU	974 - 992	79.62
159	AUAUGUCAGCUUUUAUUUAU	AUAAAUAAGCUGACAUAU	1014 - 1032	79.62
160	AAGACGUUUAUCGUUAAUU	AAUUAACGAUAAACGUCUU	219 - 237	79.35
161	GAUUUUUCAGAAACCUCC	GGAGGUUUCUGAAUAAUC	173 - 191	79.16
162	UCGUUAAUUAUCAUAAUUU	AAUUUAUGAUAAUUAACGA	209 - 227	79.1
163	AGGGUGAUUAUUGUGAAUC	GAUUCACAAUAAUCACCCU	353 - 371	78.93
164	UCAAACCGAAUUAUUAUAG	CUAAUGUAAUUCGGUUUGA	557 - 575	78.88
165	AAUUAUCAUAAUUUAUUAUAG	CUAAUAAUUAUGAUAAUU	204 - 222	78.87
166	CGAAUUAUUAUAGAGUCGC	GCGACUCUAAUGUAAUUCG	551 - 569	78.81
167	UCCAGAAGAGUUACAAGAU	AUCUUGUAACUCUUCUGGA	109 - 127	78.69
168	GUCUUGAGGUUAUUAUAGG	CCUAUAUUAACCUCAAGAC	768 - 786	78.6
169	UCUUGAGGUUAUUAUAGGA	UCCUAUAUUAACCUCAAGA	767 - 785	78.5
170	AUAUUUACGAAUUAUGCCA	UGGCAUAAUUUCGUAAAUAU	691 - 709	78.41
171	ACUGCCAGAAUUAUUAUCU	AGAAUUAUUUCUGGCAGU	648 - 666	78.33
172	AAAGGUUGUGGUUGAUUUUG	CAAUCAACCACAACCUUU	901 - 919	78.02
173	AAAAGGUUGUGGUUGAUUU	AAUCAACCACAACCUUUUU	903 - 921	77.83
174	UAAUUAUCAUAAUUUAUUA	UAAUAAUUAUGAUAAUUA	205 - 223	77.83
175	UCCAAAGACGUUUUUCGUU	AACGAUAAACGUCUUUGGA	223 - 241	77.68
176	UCGUCAAACCGAAUUAUCAU	AUGUAAUUCGGUUUGACGA	560 - 578	77.55
177	ACUGCCUCAUUAUUAUC	GAUAAUUGAAUGAGGCAGU	497 - 515	77.5

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
178	AAAAGGUUGUGGUUGAUUU	AAAUCAACCACAACCUUUU	902 - 920	77.49
179	GUUGGAAUAAUUAUGUGG	CCACAUUAAUUAUCCAAC	935 - 953	77.49
180	AAGAGGGUGAUUAUGUGA	UCACAAUAAUCACCCUCUU	356 - 374	77.29
181	CAGAAGAGUUACAAGAUUG	CAAUCUUGUAACUCUUCUG	107 - 125	77.25
182	UCAAGGAUGCUGGAUUUUU	AAAAAUCCAGCAUCCUUGA	464 - 482	77.18
183	CUUGAGGUUAUAUAGGAC	GUCCUAUAUAUACCUCAAG	766 - 784	77.16
184	AACCGAAUJACAUUAGAGU	ACUCUAUUGUAAUUCGGUU	554 - 572	77.09
185	UCAGCUUUUUUAUAGGGA	UCCCUAUAUUAAAGCUGA	1009 - 1027	76.94
186	AUAAAAAAGGUUGUGGUU	AACCACAACCUUUUUUUUAU	907 - 925	76.92
187	ACCGAAUJACAUUAGAGUC	GACUCUAAUGUAAUUCGGU	553 - 571	76.86
188	AAAGAAGAAGUUCUUGAGA	UCUCAAGAACUUCUUCUUU	603 - 621	76.8
189	AUAUUCUUAACUUAUCCAA	UUGGAUAAGUUAAGAAUUAU	636 - 654	76.67
190	CAUAAUUUAUUAGCUAACG	CGUUAGCUAAUAAUUAUG	198 - 216	76.51
191	CUCGACAUUAUAAAAGCUG	CAGCUUUUAUAAUGUCGAG	246 - 264	76.45
192	AACCCUAAUUCUUCGUU	AACGAAAGGAAUJAGGGUU	669 - 687	76.38
193	CAUUAUUUAUGUAGACUCGU	ACGAGUCUACAUAAUAAUG	971 - 989	76.38
194	AGCAAUAUGAGAAAGUUGA	UCAACUUUCUCAUAUUGCU	736 - 754	76.26
195	ACAAAGACGACGUUAUCA	UGAUUAACGUCGUCUUUGU	299 - 317	76.2
196	AAAGUAGAGGACACCAAAA	UUUUGGUGUCCUCUACUUU	859 - 877	76.09
197	AAAAUCCAACAUAAGGAU	AUCCUUGAUGUUGGAUUUU	475 - 493	76.08
198	GUCAGCUUUUUUAUAGGG	CCCUAUAUUAAAGCUGAC	1010 - 1028	76.06
199	GUCAUUAUUUAUGUAGACUC	GAGUCUACAUAAUAAUGAC	973 - 991	76.01
200	AGAAUAUAUUCUUAACUU	AAGUUAAGAAUAUAUUUCU	642 - 660	75.97
201	AGUCGUCAAACCGAAUJAC	GUAUUUCGGUUUGACGACU	562 - 580	75.83
202	UGGUUGGUUGGAAUAAUUA	UAAUUAUCCAACCAACCA	941 - 959	75.44
203	GAAUAAUUAUGUGGUCCC	GGGACCACAUUAAUUAUUC	931 - 949	75.21
204	CAAAGAAGAAGUUCUUGAG	CUCAAGAACUUCUUCUUUG	604 - 622	75.17
205	CAGCAAUAUGAGAAAGUUG	CAACUUUCUCAUAUUGCUG	737 - 755	75.01
206	AGAAGAAGUUCUUGAGAUG	CAUCUCAAGAACUUCUUCU	601 - 619	74.99
207	GAUCCAAAGACGUUAUCG	CGAUAAACGUCUJUGGAUC	225 - 243	74.98
208	ACCAUUUUGAAUUAAGAG	CUCUUUAUUUCAAAAUGGU	1040 - 1058	74.95
209	AAGACGACGUUAUACCAA	UUGUGAUUAACGUCGUCUU	296 - 314	74.67
210	CUAAUUCUUCGUUAAC	GUUAAACGAAAGGAAUJAG	665 - 683	74.13
211	UACGAAUAUGCCACGAAA	UUUCGUGGCAUAUUUCGUA	686 - 704	73.88
212	CAGCUUUUUUAUAGGGAC	GUCCCUAUAUUAAAGCUG	1008 - 1026	73.79
213	AAUJACAUUAGAGUCGCAA	UUGCGACUCUAAUGUAAUU	549 - 567	73.41
214	AUCAAGGAUGCUGGAUUUU	AAAAUCCAGCAUCCUUGAU	465 - 483	73.26
215	AUJCAAUAUCUGGAAAAU	AUUUUCAGAUAAUUGAAU	489 - 507	73.22
216	ACUJAGUCACCAAGUCAUU	AAUGACUUGGUGACUAAGU	986 - 1004	73.19
217	CAUUUUGAAUUAAGAGGU	ACCUCUUUAUUUCAAAAUG	1038 - 1056	73.16
218	AGAAGUUCUUGAGAUGCUU	AAGCAUCUCAAGAACUUCU	598 - 616	72.76
219	GUAAUAUUAUUGCGGAUGG	CCAUCCGCAUAUAUUUAC	825 - 843	72.73
220	AAGAUUGGGCUGAUGAUUA	UAAUCAUCAGCCCAAUCUU	95 - 113	72.57

Rango	Hebra antisentido 5'-3'	Hebra en sentido 5'-3'	Posición	Inhibición (%)
221	UGCCAGAAUUAUUCUUA	UAAGAAUUAUUUCUGGCA	646 - 664	72.37
222	UCCCAAAGAAGAAGUUCUU	AAGAACUUCUUCUUUGGGA	607 - 625	72.3
223	UCAAGAACUACAUCACCAA	UUGGUGAUGUAGUUCUUGA	374 - 392	72.14
224	GCAUAUUUACGAAAUUGC	GCAUAUUUCGUAAAUAUGC	693 - 711	72.11
225	GAGAGAUUUUCAGAAAC	GUUUCUGAAUAAUCUCUC	177 - 195	71.9
226	ACGCAUAUUUACGAAAUAU	AUAUUUCGUAAAUAUGCGU	695 - 713	71.87
227	CUCUUUACCAUUUUGAAUU	AAUUCAAAAUGGUAAGAG	1046 - 1064	71.82
228	AACUAGUAUAAUCAUAGAA	UUCUAUGAUUAUACUAGUU	43 - 61	71.78
229	AUUUUGAAUUAAGAGGUA	UACCUCUUAAUUCAAAAU	1037 - 1055	71.73
230	CAAAGACGACGUUAUCAC	GUGAUUAACGUCGUCUUUG	298 - 316	71.7
231	AUAAUCAUAGAAGGUGUU	AACCACCUUCUAUGAUUAU	36 - 54	71.7
232	AGAACUACAUCACCAAAGA	UCUUUGGUGAUGUAGUUCU	371 - 389	71.61
233	AAGCUCUCGACAUUAUAAA	UUUAUAAUGUCGAGAGCUU	251 - 269	71.51
234	UGUCCCAAAGAAGAAGUU	AACUUCUUCUUUGGGAACA	610 - 628	71.5
235	AAUGUGGUCCCAUAAAAUA	UAUUUUUUGGGACCACAUAU	923 - 941	71.45
236	CCAUUUUGAAUUAAGAGG	CCUCUUUAAUUCAAAUGG	1039 - 1057	71.29
237	AUUAAUGUGGUCCCAUAAA	UUUAUGGGACCACAUAUAU	926 - 944	71.27
238	CUAACGUCGAGAGAUUAUU	AAUAAUCUCUCGACGUUAG	185 - 203	71.14
239	AUUAAAGAGGUAUGGGAUA	UAUCCCAUACCUCUUUAU	1030 - 1048	71.1
240	UCAUUCAAUUAUCUGGAAA	UUUCCAGAUAAUUGAAUGA	491 - 509	70.89
241	AAUUAAGAGGUAUGGGAU	AUCCCAUACCUCUUUAUU	1031 - 1049	70.82
242	CAGAAUUAUUCUUAACU	AGUUAAGAAUUAUUUCUG	643 - 661	70.6
243	CCAACUAGUAUAAUCAUAG	CUAUGAUUAUACUAGUUGG	45 - 63	70.59
244	ACGUCGAGAGAUUAUUUCA	UGAAUAAUCUCUCGACGU	182 - 200	70.54
245	AAAGACGUUUAUCGUUAAU	AUUAACGAUAAACGUCUUU	220 - 238	70.51
246	AUGUGGUCCCAUAAAAUAA	UUUUUUUUGGGACCACAUAU	922 - 940	70.44
247	CUUUUUUAUAGGGACCAC	GUGGUCCCAUAAAUAAG	1005 - 1023	70.4
248	AUAAAAGCUGGUGAUCCAA	UUGGAUCACCAGCUUUUAU	237 - 255	70.36
249	UCGAGAGAUUAUUUCAGAA	UUCUGAAAUAUCUCUCGA	179 - 197	70.34
250	GGAAUAAUUAUGUGGUCC	GGACCACAUAUUUAUUC	932 - 950	70.11