



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES UNIDAD
LEÓN**

TEMA:

**IDENTIFICACIÓN DE GEMINIVIRUS AISLADOS DE VID EN
BAJA CALIFORNIA**

MODALIDAD DE TITULACIÓN:

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN CIENCIAS AGROGENÓMICAS

P R E S E N T A :

**ANA KAREN PALACIOS
GUTIÉRREZ**

**TUTORA EXTERNA: DRA. JIMENA CARRILLO TRIPP
TUTORA INTERNA: DRA. HARUMI SHIMADA BELTRÁN**



León, Guanajuato

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Virología Agrícola perteneciente al Departamento de Microbiología del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) en colaboración con el Comité Estatal de Sanidad de Vegetal de Baja California (CESVBC).

Dedicatoria

A mis padres, por su apoyo incondicional, por dejarme luchar por mis sueños y apoyarme para conseguirlos, por los valores que me han inculcado, por su amor y porque aún en la distancia siempre han estado conmigo. Los amo.

A mis hermanas, Jess y Bambi. Gracias por la compañía en las noches de desvelo, por el ánimo, la motivación y por su cariño incondicional. Ari, porque más que mi mejor amiga eres como mi hermana, gracias por todo.

A Axel, por tu amor, tu paciencia a lo largo de este camino, las risas, cada detalle y por la motivación de cada día. Porque este es el inicio de un futuro mejor.

Agradecimientos

A mi universidad, la Escuela Nacional de Estudios Superiores Unidad León, UNAM por permitirme desarrollarme personal y profesionalmente, así como las grandes amistades que me dejó. Gracias a todos los profesores de la Lic. en Ciencias Agrogenómicas, particularmente a la Dra. Harumi y a la Dra. Ale Rougón por el apoyo y las enseñanzas que me brindaron a lo largo de la carrera.

A la Dra. Jimena, gracias por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza, su apoyo constante, la paciencia, sus enseñanzas, su compromiso con el proyecto y por la libertad e independencia que me brindó para desarrollar mi trabajo de tesis. Gracias Dra. tiene toda mi admiración.

A mis compañeros del laboratorio Karendy, Kevin, Rodrigo y Luis, sin ustedes la estancia en Ensenada no hubiera sido lo mismo.

A la Dra. Rufina Hernández, al Dr. Edgardo Sepúlveda y a la Dra. Ana Ramos por el apoyo y enseñanzas que me brindaron para la realización de este proyecto.

Índice de contenidos

Resumen.....	8
Introducción	9
I.- La vid.....	9
II.- Cultivo en Baja California.....	10
III.- Enfermedades de la vid.....	11
IV.- Virus	12
V.- Geminivirus.....	13
VI.- Geminivirus en vid	15
VII.- Grapevine red blotch virus	15
VII.I.- Síntomas y manejo de GRBV	17
VII.II.- Diagnóstico molecular	18
Antecedentes	19
Justificación.....	20
Hipótesis.....	20
Objetivos	20
Resultados	21
Diagnóstico molecular de GRBV	21
Amplificación de genoma completo de GRBV.....	28
Amplificación de genoma en mitades	29
Patrones de restricción <i>in silico</i> de aislados reportados	32
Patrones con enzimas de restricción (RFLPs).....	36
Clonación de fragmentos virales.....	45
Árbol fenético.....	47
Discusión.....	49
Metodología	53
Muestreo.....	53
Extracción de DNA	54
Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	55
Amplificación de genomas circulares (RCA)	55
Amplificación del genoma de GRBV en mitades	56
Patrones de restricción <i>in silico</i>	56
Patrones de restricción de aislados bajacalifornianos	57
Clonación de fragmento B de aislados de geminivirus locales	57

Árbol fenético.....	59
Referencias.....	60
ANEXO I.....	64
ANEXO II.....	66
ANEXO III.....	66
ANEXO IV.....	67
ANEXO V.....	68

Índice de figuras

Figura 1: Mapa de las regiones vitivinícolas del estado de Baja California.....	10
Figura 2: Clasificación de Baltimore.....	13
Figura 3: Organización genómica de grapevine red blotch virus.....	16
Figura 4: Árbol filogenético de algunos aislados reportados de GRBV.....	17
Figura 5: DNA total de 80 muestras de plantas sintomáticas.....	21
Figura 6: Amplificación por PCR de control interno 16S y GRBV (CP + Rep) de 4 muestras sintomáticas.....	22
Figura 7: Amplificación de control interno 18S de 80 muestras sintomáticas.....	24
Figura 8: Ejemplo de diagnóstico de GRBV por PCR.....	25
Figura 9: Metodología para diagnóstico de GRBV en grupos.....	25
Figura 10: Amplificación de control interno 18S y muestras positivas GRBV.....	26
Figura 11: Origen de las 21 muestras positivas a GRBV.....	26
Figura 12: Fotos de 19 muestras positivas a GRBV.....	27
Figura 13: Ensayos de amplificación de genomas circulares.....	28
Figura 14: Segundo ensayo de amplificación de genomas circulares.....	28
Figura 15: Amplificación de fragmentos A y B del genoma de GRBV.....	29
Figura 16: Ensayos de amplificación del genoma de GRBV en mitades, muestras de plantas positivas a GRBV.....	30
Figura 17: Ejemplo de amplificación de fragmentos A y B del genoma de GRBV.....	31
Figura 18: Ejemplo de patrones de restricción con enzima AluI.....	36
Figura 19: Ejemplo de patrones de restricción con enzima EcoRI.....	37
Figura 20: Patrones de restricción de fragmento A del genoma.....	37
Figura 21: Patrones de restricción de fragmento B del genoma.....	38
Figura 22: Ejemplo de colonias con fragmento B clonado.....	46
Figura 23: PCR de fragmento específico para confirmar clonaciones.....	47
Figura 24: Árbol fenético de aislados bajacalifornianos.....	48
Figura 25: Distribución geográfica de 8 aislados de GRBV.....	50
Figura 26: Mapa de muestreo en Baja California.....	54
Figura 27: Colonias E. coli resistentes a kanamicina.....	58
Figura 28: Linearización de plásmido pGreen.....	58

Índice de tablas

Tabla 1: Patrones de restricción <i>in silico</i> de fragmento A y fragmento B de 12 aislados reportados de GRBV.....	33
Tabla 2: Agrupación por RFLP de aislados reportados, cortados con enzima AluI.....	35
Tabla 3: Agrupación por RFLP de aislados reportados, cortados con enzima EcoRI.....	35
Tabla 4: Patrones de restricción en fragmento A del genoma, cortados con enzima AluI.....	40
Tabla 5: Patrones de restricción en fragmento A del genoma, cortados con enzima EcoRI.....	41
Tabla 6: Patrones de restricción en fragmento B del genoma, cortados con enzima AluI.....	42
Tabla 7: Patrones de restricción en el fragmento B del genoma, cortados con enzima EcoRI.....	43
Tabla 8: Grupos de aislados bajacalifornianos de GRBV.....	43
Tabla 9: Patrones de restricción de aislados bajacalifornianos.....	44
Tabla 10: Matriz de combinación de enzimas utilizadas para la reacción de amplificación por círculo rodante.....	56

Resumen

Baja California concentra cerca del 75% de la producción de uva que es destinada a la elaboración de vino a nivel nacional, siendo la vitivinicultura una actividad económica y cultural muy importante en la región. La vid (*Vitis vinifera* L.) es hospedera de numerosos patógenos, entre virus, viroides, bacterias y hongos. Hay muy poca información respecto a los virus que se encuentran en los viñedos de Baja California, limitando el manejo y control de estos. En el presente trabajo se realizó el diagnóstico del geminivirus GRBV (grapevine red blotch virus) en 80 muestras de vid con síntomas de enrojecimiento recolectadas en Baja California. El genoma de los aislados geminivirales encontrados se amplificó en mitades mediante PCR de alta fidelidad y se clasificaron de acuerdo a los patrones de restricción (RFLPs) obtenidos con las enzimas AluI y EcoRI. Este trabajo representa una panorámica inicial de la diversidad de aislados de GRBV que se encuentran en Baja California, así como las posibles rutas de entrada del virus al estado.

Introducción

I.- La vid

La vid (*Vitis vinifera* L.) pertenece a la familia *Vitaceae*, en su mayoría plantas leñosas o lianas herbáceas (Mullins et. al, 1992), solo algunas crecen de forma arbustiva (Creasy y Creasy, 2009). El género *Vitis* se compone de dos subgéneros, *Vitis* y *Muscadinia*, las principales diferencias entre estos dos subgéneros son características morfológicas y el número cromosómico, *Vitis* tiene 38 cromosomas y *Muscadinia* 40 cromosomas (Creasy y Creasy, 2009).

Vitis vinifera es la especie de uva que se siembra más ampliamente en el mundo (Creasy y Creasy, 2009), con una superficie de siembra de 7.6 millones de hectáreas aproximadamente de acuerdo al informe de la Organización Internacional de la Viña y el Vino en 2017. Esta variedad es utilizada principalmente para la producción de vino, jugo, pasas y consumo directo (Creasy y Creasy, 2009).

La vid es una planta perene, angiosperma, dicotiledónea, con flores simples (Almanza, 2011). La temperatura óptima para su crecimiento es entre los 15 y 25 °C, es muy importante la temperatura del cultivo ya que esto determinará sus etapas fenológicas. Además, el cultivo requiere entre 150 a 1200 horas de frío, dependiendo de la variedad para salir de su periodo de dormancia (Flores, 2015). El cultivo prefiere los suelos franco-arenosos, con un pH de 5.5 - 7 (SAGARPA, 2016), sin embargo, también puede crecer en suelos de escasa fertilidad; los suelos franco-arenosos y silicio-calizos han sido utilizados para la producción de vinos de calidad (Flores, 2015).

Se han descrito ~10,000 variedades diferentes de vid en las colecciones de germoplasma alrededor del mundo (Asensio, 2000; This et. al, 2006), sin embargo, basados en *sequenced-tagged microsatellite site* (STMS) y en *simple sequence repeat* (SSR), que son marcadores moleculares, se ha estimado que hay entre 5,000 – 8,000 variedades de vid (Franks et. al, 2002). Las variedades se clasifican de acuerdo a su producción final, que pueden ser uvas de vino, uvas de mesa y pasas. Usando microsatélites se ha encontrado un nivel de diferenciación genética significativo entre la uva de vino y de mesa, esto podría deberse a la selección que se ha hecho para obtener el tamaño y el largo de la uva deseado, así como, la cantidad de azúcar en el fruto. Los datos de referencia de seis marcadores microsatelitales y un grupo de variedades y portainjertos reconocidos internacionalmente están disponibles en la página del Centro de Recursos Biológicos de la Vid (<https://www6.montpellier.inra.fr/vassal>), herramienta muy útil para la ampelografía, que se encarga de la identificación y clasificación de la vid (This et. al, 2006).

II.- Cultivo en Baja California

La vid en el Estado de Baja California representa un sector agrícola e industrial muy importante. La superficie sembrada de este cultivo es de 3,735 hectáreas, área superior a la extensión sembrada de Colima, Nayarit, Aguascalientes y Morelos. Más del 90% de la producción es destinada al sector vinícola, convirtiendo al Estado en el centro vitivinícola más importante del país (OIEDRUS, 2011; González y Fuentes, 2013). La producción vitivinícola va desde Mexicali hasta San Quintín en las regiones conocidas como la antigua y nueva ruta del vino. La región vitivinícola está formada por seis valles, el Valle de Guadalupe, San Antonio de las Minas, Santo Tomás, San Vicente, Ejido Uruapan y Ojos Negros (**Figura 1**); siendo los primeros cuatro los más importantes (OIEDRUS, 2011).



Figura 1: Mapa de las regiones vitivinícolas del estado de Baja California.

El Valle de Guadalupe concentra la mayor superficie (1,566 ha.) cultivada de vid para elaboración de vino (González y Fuentes, 2013). Se localiza a 25 kilómetros al norte de la ciudad de Ensenada en una zona rocosa-montañosa, a una altitud de 335 metros sobre el nivel del mar (Meraz et. al, 2012). El clima es semiárido, la temperatura media es de 16 °C, la máxima de 32 °C y una mínima de 3 °C, la precipitación anual promedio es de 309 mm. Las variedades más sembradas son Red Globe, Merlot, Nebbiolo y Chenin Blanc (Gaeta, 2006; OIEDRUS, 2011). El Valle de San Vicente se localiza al sur de Ensenada, es la segunda área más importante de cultivo de vid por la superficie plantada. La

temperatura mínima en esta región es de 4 °C y alcanza una máxima de 34 °C, la precipitación anual es de 215 mm. Red Globe, Cabernet Sauvignon y Crimson son las variedades más sembradas en esta región. En el Valle de Santo Tomás las variedades Tempranillo, Cabernet Sauvignon y Merlot son las más sembradas, la región tiene una temperatura mínima de 3.5 °C, la media de 18 °C y la temperatura máxima es de 35 °C, la precipitación media anual es de 235 mm. Cabernet Sauvignon, Chardonnay y Merlot son las variedades más sembradas en San Antonio de las Minas (OIEDRUS, 2011).

III.- Enfermedades de la vid

La vid es atacada por diversos patógenos y plagas, entre bacterias, hongos, nemátodos, insectos, fitoplasmas y virus; los cuales son responsables de daños al cultivo, al fruto y reducción de la producción. Algunas de las bacterias que afectan a la vid son *Xylella fastidiosa* y *Agrobacterium tumefaciens*. La primera es el agente causal de la enfermedad de Pierce, las plantas enfermas presentan clorosis y decoloración en las hojas, además no producen frutos o producen frutos de muy baja calidad, la marchitez de la hoja puede llevar a la muerte de la planta. Por su parte, *A. tumefaciens* que provoca deformaciones en forma de agalla en la madera. El oidio (*Erysiphe necator* Schwein), la botritis (*Botrytis cinerea* Pers.) causante de necrosis en los órganos verdes de la vid, además de pudrición de los frutos; la pudrición negra (*Phyllostictia lambruscae*) y la cenicilla polvorienta (*Uncinula necator*) son algunas de las enfermedades causadas por hongos. Algunas de las plagas que atacan al cultivo son la chicharrita de la vid (*Erythroneura variabilis*), el gusano presidario (*Harrisinae brillans*) y el piojo harinoso (*Planococcus ficus*) (Martos, 2008; Vázquez, 2011), este último es considerado actualmente como la plaga más dañina de los viñedos, llega a causar pérdidas en la producción del 30 al 100%; además es vector del complejo viral de la hoja enrollada de la vid (grapevine leafroll associated virus, GLRaV) (CESVBC, 2018).

De los cultivos perenes, la vid es una de las plantas que más infecciones por virus sufren. Se han descrito 80 virus en plantas sintomáticas y asintomáticas que afectan los viñedos, los cuales pertenecen a 27 géneros de 15 familias diferentes de fitovirus (Al Rwahnih et. al, 2013; Sudarshana et. al, 2015; Yepes et. al, 2018). Un fenómeno reportado en los cultivos es la coinfección, es decir, la presencia de más de un virus en el hospedero, la coinfección puede alterar la dinámica de las infecciones que tiene como consecuencia un agravamiento de síntomas y disminución en el rendimiento del cultivo (Díaz-Muñoz, 2017). Algunas de las enfermedades causadas por virus son el enrollamiento de la hoja (Grapevine leafroll-associated virus), el tallo de Kober (Grapevine virus A), el listado del tallo de Ruspestris (Rupestris stem pitting associated virus), el entrenudo corto (Grapevine fanleaf virus) y la enfermedad de la mancha roja de la vid (Grapevine red blotch virus) (Komínek et. al, 2009).

IV.- Virus

Los virus son parásitos intracelulares obligados, se replican a sí mismos en una célula hospedera. Tienen genomas de ácido desoxirribonucleico (DNA) o de ácido ribonucleico (RNA) (Breitbart y Rohwer, 2005; Lewsey et. al, 2009) cubiertos por capas proteicas, algunos están envueltos en membranas lipídicas. Para la replicación de los virus de RNA se requiere la actividad de la enzima RNA-polimerasa dependiente de RNA (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) dada por un complejo replicasa formado mediante el reclutamiento de proteínas provenientes del virus y del hospedero. La RdRp sintetiza una cadena complementaria del RNA, para posteriormente realizar la síntesis del mRNA viral (Lewsey et. al, 2009). Los virus con genoma de DNA se replican en el núcleo de la célula del hospedero, para producir mRNA requieren la actividad de la RNA polimerasa II del hospedero (Hull, 2009; Lewsey et. al, 2009).

En cada etapa del ciclo viral se producen distintas interacciones entre el hospedero y el virus. La incompatibilidad de estos puede darse por dos vías. Cuando la planta desconoce al virus se trata de una interacción incompatible y se produce un sistema pasivo, pues la planta no tiene los factores necesarios para la replicación y movimiento del virus dentro del hospedero. La vía alterna de incompatibilidad involucra la producción de compuestos antivirales por parte de la planta, en este caso se desencadena un sistema activo de defensa, un ejemplo de esto es la respuesta hipersensible (HR). Por otra parte, las interacciones compatibles se dan cuando el hospedero tiene los factores celulares y recursos necesarios para que el virus complete las diferentes etapas del ciclo infeccioso (Lewsey et. al, 2009; García-Ruiz, 2019).

David Baltimore propuso un sistema que clasifica los virus de acuerdo al tipo de ácido nucleico que contienen y a su mecanismo de replicación, es conocida como la clasificación de Baltimore (**Figura 2**). Hay 7 grupos, el Grupo I incluye a los virus que tienen un genoma de DNA bicatenario (dsDNA); en el Grupo II se encuentran los virus que tienen genoma de DNA monocatenario (ssDNA), para su replicación se convierte en DNA bicatenario; el Grupo III incluye virus de RNA bicatenario (dsRNA), para la síntesis proteica a partir del dsRNA se forma mRNA; en el Grupo IV están los virus de RNA monocatenario positivo ((+)ssRNA); en el Grupo V se encuentran los virus con genoma de RNA monocatenario negativo ((-)ssRNA), el RNA de sentido negativo de estos virus se convierte a mRNA mediante una transcriptasa inversa y de esta forma pueda ser traducido. En el Grupo VI de esta clasificación se encuentran los virus que tienen un genoma de RNA monocatenario retrotranscrito (ssRNA-RT), es decir, para llevar a cabo su replicación el RNA producirá una cadena de DNA monocatenario, posteriormente DNA bicatenario que será transcrito a mRNA; finalmente en el Grupo

VII se encuentran los virus de DNA bicatenario retrotranscrito (dsDNA-RT) (Baltimore, 1971; Mahmoudabadi y Phillips, 2018).

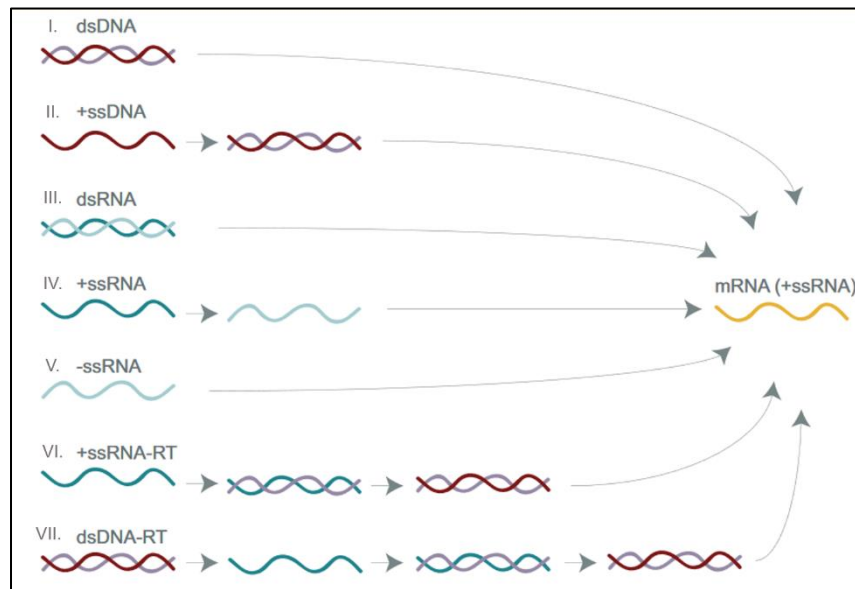


Figura 2: Clasificación de Baltimore.

I. virus de DNA bicatenario (dsDNA), II. virus de DNA monocatenario (ssDNA), III. virus de RNA bicatenario (dsRNA), IV. virus de RNA monocatenario positivo (+ssRNA), V. virus de RNA monocatenario negativo (-ssRNA), VI. virus de RNA monocatenario retrotranscrito (+ssRNA-RT) y VII. virus de DNA bicatenario retrotranscrito (dsDNA-RT). Tomada de Mahmoudabadi y Phillips, 2018.

V.- Geminivirus

Los geminivirus (Familia *Geminiviridae*) pertenecen al grupo II de la clasificación de Baltimore, son la segunda familia más grande y diversa de virus de plantas, tienen un rango amplio de hospederos, llegando a causar pérdidas significativas en los cultivos a nivel mundial (Hanley-Bowdoin et. al, 1999).

Los geminivirus se caracterizan por tener una cápside geminada formada por dos partículas icosédricas incompletas fusionadas (Hesketh et. al, 2018), con una longitud de 38 nm y un diámetro de 22 nm, así como, un genoma circular de DNA monocatenario (ssDNA) que se duplica mediante moléculas de DNA bicatenario (dsDNA) intermediarias en el núcleo de las células infectadas. Los virus sólo contribuyen con algunos factores para su replicación y transcripción, sin embargo, dependen de las DNA y RNA polimerasas del hospedero (Hanley-Bowdoin et. al, 1999; Zúñiga-Vega y Ramírez, 2001).

La infección comienza cuando el virus entra en la célula hospedera, posteriormente sin recubrimiento el ssDNA viral penetra el núcleo, las DNA polimerasas del hospedero convierten este ssDNA en

dsDNA. La RNA polimerasa II del hospedero transcribe el dsDNA, que se ensambla con los nucleosomas, permitiendo la producción de la proteína iniciadora de la replicación (Rep). Rep inicia la replicación en círculo rodante produciendo cadenas de ssDNA; estos ssDNA recién sintetizados pueden a) convertirse en dsDNA y servir como plantilla para la transcripción de proteínas virales, b) acumularse moléculas de ssDNA y ser encapsidadas por la proteína de la cápside (CP) en forma de viriones que serán liberados y quedan libres para que algún insecto vector los adquiera o c) ser transportadas fuera del núcleo a una célula vecina a través de los plasmodesmos para propagar el virus por toda la planta (Hanley-Bowdoin et. al, 2013; Sharma y Ruhel, 2019).

El genoma de los geminivirus es pequeño, consta de una o dos moléculas de DNA circular de entre 2.5 a 3 x 10³ nucleótidos. La capacidad codificante de los genomas varía, esto de acuerdo al subgrupo de la familia que pertenezca cada virus (Hanley-Bowdoin et. al, 1999). El subgrupo I incluye virus que infectan plantas monocotiledóneas y con genomas de un solo componente, tienen cuatro marcos de lectura abiertos (ORF). Los del subgrupo II infectan plantas dicotiledóneas e igualmente tienen genomas de un solo componente y finalmente los del subgrupo III infectan plantas dicotiledóneas y genomas bipartitos, ambos subgrupos tienen de 6 a 7 ORF (Hanley-Bowdoin et. al, 1999).

La familia *Geminiviridae* se compone de nueve géneros, *Becurtovirus*, *Begomovirus*, *Capulavirus*, *Curtovirus*, *Eragrovirus*, *Grablovirus*, *Mastrevirus*, *Topocuvirus* y *Turncurtovirus* (Varsani et. al, 2017), entre las diferencias de cada género se encuentra la organización genómica, el rango de hospederos y sus insectos vectores. Los miembros del género *Mastrevirus* son de genoma monopartito, son transmitidos por varias especies de chicharritas y generalmente infectan especies monocotiledóneas, el maize streak virus (MSV) pertenece a este género. Los curtovirus también son transmitidos por chicharritas, tienen genoma monopartito, infectan plantas dicotiledóneas y la organización genómica varía ligeramente a la de los mastrevirus; un ejemplo es el beet curly top virus (BCTV). Los begomovirus son transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), la mayoría tienen un genoma bipartito (componentes A y B) e infectan plantas dicotiledóneas, el tomato golden mosaic virus (TGMV) y el tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) son algunos de los miembros de este género (Gutiérrez, 1999). Los géneros *Grablovirus* y *Capulavirus* son los de más reciente descubrimiento; los capulavirus tienen genoma monopartito, sus hospederos naturales son plantas dicotiledóneas y son transmitidos por áfidos, euphorbia caput-medusae latent virus (ECMLV) es un ejemplo de los virus de este género. Los grablovirus deben su nombre al único miembro de este género identificado hasta ahora, grapevine red blotch virus (GRBV), el vector natural de estos virus es el alfarero tricornudo (*Spissistilus festinus* Say) (Varsani et. al, 2017).

VI.- Geminivirus en vid

A la fecha se conocen dos especies de geminivirus que infectan vid, *Grapevine red blotch virus* (GRBV) y *Grapevine geminivirus A* (GGVA). GRBV ha sido reportado en viñedos comerciales de Estados Unidos, Canadá y Corea del Sur, por mencionar algunos (Krenz et. al, 2014; Varsani et. al, 2017). De GGVA se han reportado 13 aislados en China, Hungría, Israel, Japón y Corea del Sur (Al Rwahnih et. al, 2017; Varsani et. al, 2017). GGVA aún no ha sido asignado a un género de geminivirus pues no se han identificado sus insectos vectores ni se han observado sus partículas virales (Varsani et. al, 2017).

VII.- Grapevine red blotch virus

El GRBV, es el único miembro del género *Grabovirus* (Varsani et. al, 2017), su genoma consta de una sola molécula de ssDNA circular de 3,206 nucleótidos de longitud (**Figura 3**), tiene 6 marcos de lectura abierto (ORF). Tres de los ORF tienen orientación de los sentidos virales (V1, V2 y V3) y tres con orientación complementaria (C1, C2 y C3). Estos ORF de orientación complementaria codifican para proteínas asociadas a la replicación, en específico C1 codifica para la proteína RepA y C1 en conjunto con C2 codifican para la proteína de replicación Rep; el ORF V1 codifica para la proteína de la cápside CP (Krenz et. al, 2012; Sudarshana et. al, 2015). En el genoma de GRBV se encuentra un motivo nona-nucleótido conservado, 'TAATTATT|AC', el cual funciona como origen de replicación, *ori*, en la región intergénica de los miembros de la familia *Geminiviridae* (Krenz et. al, 2014).

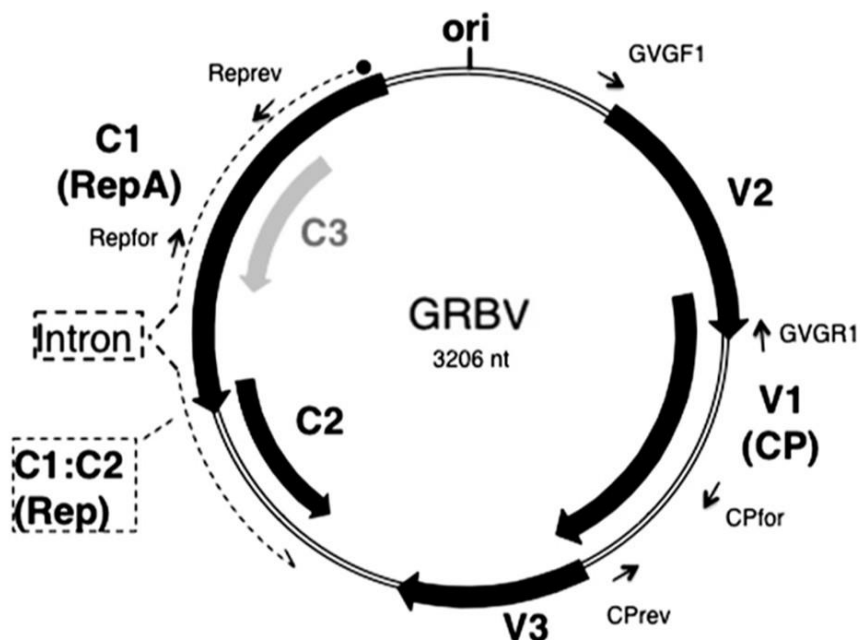


Figura 3: Organización genómica de grapevine red blotch virus. Genoma circular de 3,206 nt. ori representa el origen de replicación. Los ORF codifican para las siguientes proteínas: V1 proteína de la cápside (CP), V2 y V3 función desconocida, C1 proteína asociada a la replicación (RepA), C1:C2 proteína de replicación (Rep), C3 interno de C1, ORF diferente en la misma fase de lectura. Las flechas en CPfor, CPrev, Repfor y Reprev indican la posición de los primers propuestos por Krenz et. al, 2014; GVGR1 y GVGF1 son los primers propuestos por Al Rwahnih et. al, 2013 para diagnóstico de GRBV por reacción de PCR. Modificada de Sudarshana et. al, 2015.

Mediante diversos algoritmos filogenéticos como *neighbour-joining*, el cual produce la unión de las unidades taxonómicas operativas (OTUs) más cercanas; máxima verosimilitud, método que crea todos los árboles filogenéticos posibles y selecciona el árbol con más probabilidad; e inferencia Bayesiana se han identificado dos clados filogenéticos de GRBV (**Figura 4**). Entre los clados se encontró una identidad nucleotídica de entre 91 – 93% (Krenz et. al, 2014; Sudarshana et. al, 2015). No se han reportado diferencias biológicas entre los aislados de los diferentes clados. Los aislados que corresponden al clado I comparten una identidad nucleotídica de 95%, sin embargo, los aislados del clado II son ligeramente menos divergentes ya que comparten un 98% de identidad nucleotídica (Sudarshana et. al, 2015). Los aislados de GRBV que fueron reportados en el estado de Baja California se agrupan en el clado I (**Figura 4**) donde se encuentran los aislados de Canadá y algunos de Nueva York, EUA (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018).

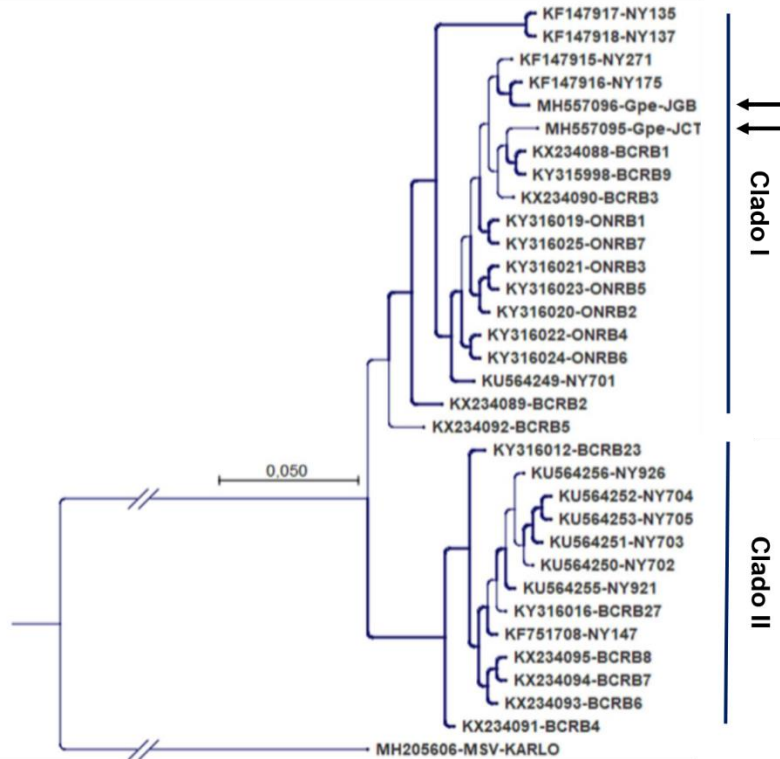


Figura 4: Árbol filogenético de algunos aislados reportados de GRBV. Las flechas indican los aislados reportados en Baja California. Modificada de Gasperin-Bulbarela et. al, 2018.

VII.I.- Síntomas y manejo de GRBV

Los síntomas de GRBV consisten en manchas rojas en la lámina y el margen de la hoja, así como venas secundarias y terciarias rojas (Al Rwahnih et. al, 2013); para variedades de uva blancas, los síntomas son decoloración o clorosis foliar, a veces acompañada de áreas necróticas en el borde de las hojas (Sudarshana et. al, 2015). La vides infectadas con GRBV se ven afectadas en la calidad y la maduración del fruto, ya que presentan una disminución de 1 - 6° Brix, indicadores del nivel de azúcares en el fruto. En variedades tintas se ha reportado disminución de antocianinas, fenoles y taninos (Sudarshana et. al, 2015; Fuchs et. al, 2016), compuestos importantes para la producción vinícola. La pérdida económica estimada causada por este virus oscila en un rango de \$2,213 dólares/ha para viñedos con una incidencia baja, hasta \$65,548 dólares/ha en viñedos donde la incidencia de la enfermedad es muy alta (Ricketts et. al, 2017). Para contrarrestar la disminución de azúcares en las plantas infectadas con GRBV se toman algunas medidas como mejorar el estado nutricional de las plantas con la adición de fosfatos o potasio, y retrasando la cosecha 2 ó 3 semanas para lograr un nivel suficiente de sólidos solubles totales y compuestos volátiles en el fruto (Sudarshana et. al, 2015). Algunos productores utilizan tratamiento químico para controlar al insecto

vector, sin embargo, no se ha examinado la eficacia ni el costo del tratamiento con pesticidas. La mayoría de los productores en California, Nueva York y Washington optan por la opción de reemplazar en su totalidad el viñedo y sembrar con plantas sanas, esto con el fin de eliminar o minimizar la posibilidad de dispersión del virus en plantas asintomáticas (Ricketts et. al, 2017).

VII.II.- Diagnóstico molecular

El diagnóstico basado en la sintomatología puede resultar confuso, debido a las similitudes entre los síntomas de GRBV y los causados por el complejo viral grapevine leafroll associated virus (GLRaV) perteneciente a la familia *Closteroviridae*, los cuales producen enrojecimiento en la lámina de la hoja, enrollamiento de las hojas hacia abajo y el área intervenal de las hojas puede tornarse amarillo o rojo, sin embargo las venas principales se mantienen verdes (Velásquez-Valle et. al, 2013). Además, también puede confundirse con los daños causados por otros factores como carencia de nutrientes, deficiencia mineral, incluso la presencia de las bacterias *Xyllela fastidiosa* y *Agrobacterium tumefaciens*. Por esto es importante realizar ensayos de diagnóstico basados en DNA, usando primers específicos diseñados para GRBV amplificando por PCR (Polymerase Chain Reaction) o por RCA (Rolling Circle Amplification) que no requiere primers específicos y es útil para amplificar genomas circulares como los de los geminivirus (Fuchs et. al, 2016).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular termo cíclica utilizada para amplificar fragmentos específicos del genoma. El proceso consiste en la desnaturalización de la cadena de DNA, esto se realiza generalmente a 95 °C; seguido del alineamiento de los primers o iniciadores que se utilizan para amplificar la región del genoma de interés, el alineamiento se realiza entre los 45 - 65 °C; posteriormente la extensión a 72 °C, en la cual la enzima *Taq* polimerasa irá adicionando los nucleótidos y formará una nueva cadena con la región específica; estos ciclos se repiten entre 20 y 40 veces con la finalidad de obtener muchas copias de la región de interés (Caetano-Anollés, 2013). Un ejemplo de diagnóstico de GRBV por PCR es el publicado por Poojari et al. en viñedos comerciales de la provincia Columbia Británica, Canadá. El diagnóstico se realizó con 2 pares de primers específicos para la detección de este geminivirus (GVGF1, GVGR1, GRLaV-4 For y GRLaV-4 Rev). En un total de 2,000 muestras compuestas (4 hojas basales de 5 plantas de vid) se diagnosticó GRBV en 32 muestras compuestas, lo que indicó un nivel bajo de incidencia (1.6%) en el viñedo (Poojari et. al, 2017).

La amplificación por círculo rodante (RCA) es un proceso enzimático isotérmico que permite amplificar genomas circulares de DNA o RNA. La amplificación es llevada a cabo por una polimerasa, para DNA se utilizan ϕ 29, Bst y VentR -exo y para RNA la polimerasa T7 (Ali et. al,

2014). En el caso de DNA la reacción requiere un patrón de DNA circular, puede ser en una muy baja concentración (0.01 ng) (Nelson et. al, 2012), también hexámeros al azar que actúan como iniciadores, de forma que la polimerasa irá adicionando los nucleótidos (dNTPs) en dirección 5' a 3' para formar de decenas a cientos de copias en tándem (Ali et. al, 2014). La DNA polimerasa ϕ 29 es la más utilizada por su eficiencia, capacidad de desplazamiento y procesamiento, en promedio puede sintetizar aproximadamente 1,500 pb por minuto resultando en productos de hasta 70 kpb en 20 minutos (Johns et. al, 2009; Ali et. al, 2014). Esta técnica ha sido utilizada ampliamente para la amplificación de genomas virales, así como la identificación de nuevos virus con genomas circulares (Johns et. al, 2009). En viñedos de Nueva York sembrados con la variedad Cabernet Franc se realizó la amplificación del genoma mediante amplificación por círculo rodante (RCA), la digestión de productos mediante RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) y finalmente la secuenciación que reveló la presencia de un nuevo geminivirus (Krenz et. al, 2012).

Antecedentes

GRBV fue reportado por primera vez en viñedos con síntomas de enrojecimiento sembrados con la variedad “Cabernet Sauvignon” en la estación experimental Oakville de la Universidad de California en 2007 (Calvi, 2011); posteriormente fue reportado (2010) en viñedos de Nueva York sembrados con la variedad “Cabernet Franc” (Krenz et. al, 2012). En los viñedos de Nueva York se observaron síntomas sugerentes del complejo grapevine leafroll-associated virus, sin embargo, las plantas resultaron negativas para este complejo viral. Mediante amplificación de círculo rodante (RCA) y secuenciación se detectó la presencia de un geminivirus que fue llamado provisionalmente grapevine cabernet franc-associated virus (GCFaV) (Krenz et. al, 2012), este geminivirus fue asociado a la enfermedad de la mancha roja de la vid (*red blotch*).

En viñedos comerciales del estado de Washington, USA sembrados con las variedades Merlot y Cabernet Franc se tomaron muestras de plantas con síntomas de virosis; a partir de estas muestras se obtuvieron librerías de cDNA que fueron secuenciadas con Illumina. En los análisis bioinformáticos se encontró en las muestras de plantas con síntomas de *red blotch* una secuencia de DNA de una sola cadena, posteriormente se realizaron análisis filogenéticos en los cuales se comprobó la similitud de esta secuencia con la reportada previamente para *red blotch* en Nueva York (Krenz et. al, 2012) y en California (Calvi, 2011), de esta forma se identificó por primera vez grapevine red blotch virus (GRBV) mediante secuenciación masiva (Poojari et. al, 2013). Simultáneamente, en tres viñedos comerciales sembrados con las variedades Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon y Zinfandel en el Valle de Napa, California se utilizaron técnicas de secuenciación masiva para identificar la presencia de GRBV (Al Rwahnih et. al, 2013) en viñedos con síntomas de *red blotch*.

Los postulados de Koch, en los que se establece que el patógeno debe ser aislado de un organismo enfermo, después inocular el patógeno en un organismo sano y que se desarrolle la enfermedad y finalmente aislar el patógeno causal del organismo enfermo (Grimes, 2006), son fundamentales en patología para establecer la relación causal entre un patógeno y una enfermedad. Se demostró mediante estos postulados que GRBV es el agente causal de *red blotch disease* (RBD) (Yepes et. al, 2018).

La transmisión del virus GRBV puede darse a través de injertos que tengan el virus o a través de su insecto vector, el alfarero o periquito tricornudo (*Spissistilus festinus*) (Bahder et. al, 2016).

La presencia de dos aislados de GRBV en México fue reportada por el grupo de Fitopatología del Centro de Investigación Científica y Educación Superior de Ensenada (CICESE) (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018). Estos aislados de GRBV reportados, se agrupan filogenéticamente en el Clado I de GRBV (**Figura 4**) junto con algunos aislados de Canadá y Nueva York.

Justificación

El estado de Baja California es el principal productor de uva para la elaboración de vinos en el país (OEIDRUS, 2016), siendo la vitivinicultura una actividad de gran importancia cultural y económica.

Además del primer reporte de GRBV, no se ha estudiado la incidencia de geminivirus de vid en Baja California. La falta de información en México acerca de los geminivirus que afectan a la vid limita la detección oportuna, disminuyendo las opciones para tomar las medidas de control adecuadas. Este trabajo busca identificar y clasificar los aislados geminivirales que se encuentran presentes en los viñedos de Baja California, y en conjunto con el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California (CESVBC), tomar medidas para limitar la dispersión de estos.

Hipótesis

En los viñedos de Baja California existen diversos aislados de geminivirus en vid, indicando diferentes orígenes y rutas de entrada de los mismos.

Objetivos

- Diagnosticar la presencia de geminivirus en viñedos de Baja California mediante técnicas de biología molecular.
- Clasificar los aislados geminivirales con base en sus patrones de restricción (RFLPs).

Resultados

Diagnóstico molecular de GRBV

Plantas con síntomas de enrojecimiento fueron localizadas y muestreadas por colaboradores del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California (CESVBC). Un total de 80 muestras se recibieron en el laboratorio de Virología Agrícola de CICESE.

Para el diagnóstico molecular de GRBV se realizó la extracción de DNA genómico y viral de 80 muestras recolectadas y 3 plantas sanas como control negativo. Para la extracción de DNA se probaron y compararon resultados siguiendo 3 protocolos de extracción de DNA. Con el protocolo de extracción de TriReagent (Sigma) se obtuvo una buena concentración de DNA (100-1600 ng/ μ l), sin embargo, se obtuvo una pureza muy baja ($A_{260}/A_{280} < 0.9$); con el protocolo de extracción propuesto por Krenz et. al, 2014 se obtuvo una concentración media (40-160 ng/ μ l) y una pureza regular (A_{260}/A_{280} 1.1 - 1.5).

Finalmente, la extracción de DNA se realizó siguiendo un protocolo modificado de Lodhi et. al, 1994, con el que se obtuvo una concentración media de DNA (50-400 ng/ μ l) y una pureza aceptable ($A_{260}/A_{280} > 1.6$). Se verificó la calidad del DNA obtenido en un gel de agarosa 0.8% (**Figura 5**). Durante la optimización de esta técnica se llegó al siguiente criterio: si no se observó banda en gel de agarosa y si la pureza de DNA fue $A_{260}/A_{280} < 1.3$, se repitió la extracción de DNA. Es importante la pureza del DNA para la posterior amplificación de fragmentos por PCR.



Figura 5: DNA total de 80 muestras de plantas sintomáticas.

DNA total de plantas sintomáticas analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% teñido con HydraGreen. Carriles 1 – 77: DNA de plantas sintomáticas. CN1: DNA de control negativo 1, CN2: DNA de control negativo 2, CN3: DNA de control negativo 3. Algunas de las muestras tienen baja concentración de DNA, por ello no se alcanzan a ver en el gel de agarosa.

Para verificar la integridad del DNA obtenido se utilizó como control interno el gen 18S rRNA de la planta. Mediante amplificación por PCR se probó con los primers propuestos por Krenz et. al, 2014, que amplifican un fragmento del gen que codifica al 16S rRNA (producto esperado, 105 pb); el producto se analizó en gel de agarosa 2% (**Figura 6**). Sin embargo, se descartó este par de primers debido a que el tamaño de banda obtenido es muy pequeño y se puede llegar a confundir con primers dimerizados en la reacción de PCR.

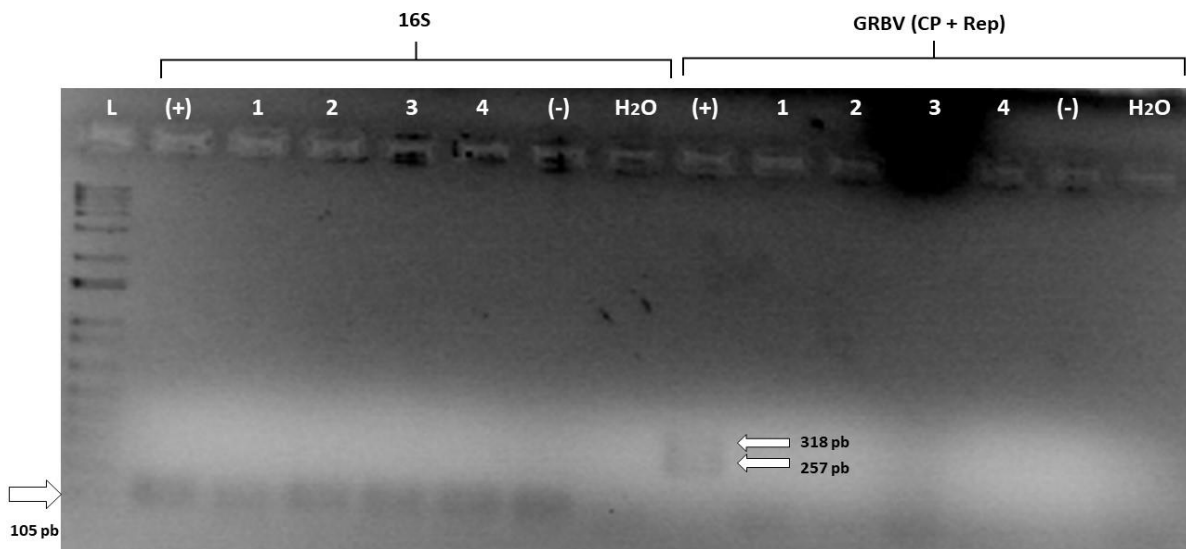


Figura 6: Amplificación por PCR de control interno 16S y GRBV (CP + Rep) de 4 muestras sintomáticas. Gel de agarosa 2.5% teñido con bromuro de etidio. L: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus. Carriles 1-4 (izquierda): productos de PCR para fragmento de gen 16S (105 pb). Carriles 1-4 (derecha): productos PCR para GRBV, CP (257 pb) y Rep (318 pb). Control (+), control (-) planta sana y control de agua.

Finalmente, se seleccionaron los primers propuestos por Gambino et. al (2006) que amplifican una región del gen que codifica para el 18S rRNA (producto esperado, 844 pb), la reacción se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa 2% (**Figura 7**). En todas las muestras se observó la amplificación de la banda del tamaño esperado (844 pb) lo que permitió seguir con el diagnóstico de geminivirus.

Para el diagnóstico de GRBV, en algunas muestras se usaron los pares de primers propuestos por Krenz et. al, 2014, CP (producto esperado, 257 pb) y Rep (producto esperado, 318 pb) (**Figura 6**).

Para la detección final y corroboración de positivas a GRBV, se utilizaron los primers GVGR1 y GVGF1 (producto esperado, 557 pb) (Al Rwahnih et. al, 2013) (**Figura 8**). Las muestras se analizaron en grupos siguiendo un procedimiento de pirámide inversa (**Figura 9**) con el objetivo de economizar y agilizar el diagnóstico. Para iniciar, se realizaron grupos con 5 muestras cada uno y se realizó PCR con los primers GVGR1 y GVGF1. Las muestras de los grupos en los que se observó amplificación de la banda esperada (557 pb) pasaron al siguiente nivel de la pirámide, ahora agrupadas en tercias; los grupos en los que no hubo amplificación se descartaron. En el siguiente nivel, las muestras dentro de los grupos que resultaron positivas se agruparon en pares y se siguió la misma lógica, hasta que finalmente, las muestras en los grupos en los que se observó la banda de 557 pb se procesaron de forma individual (**Figura 9**).

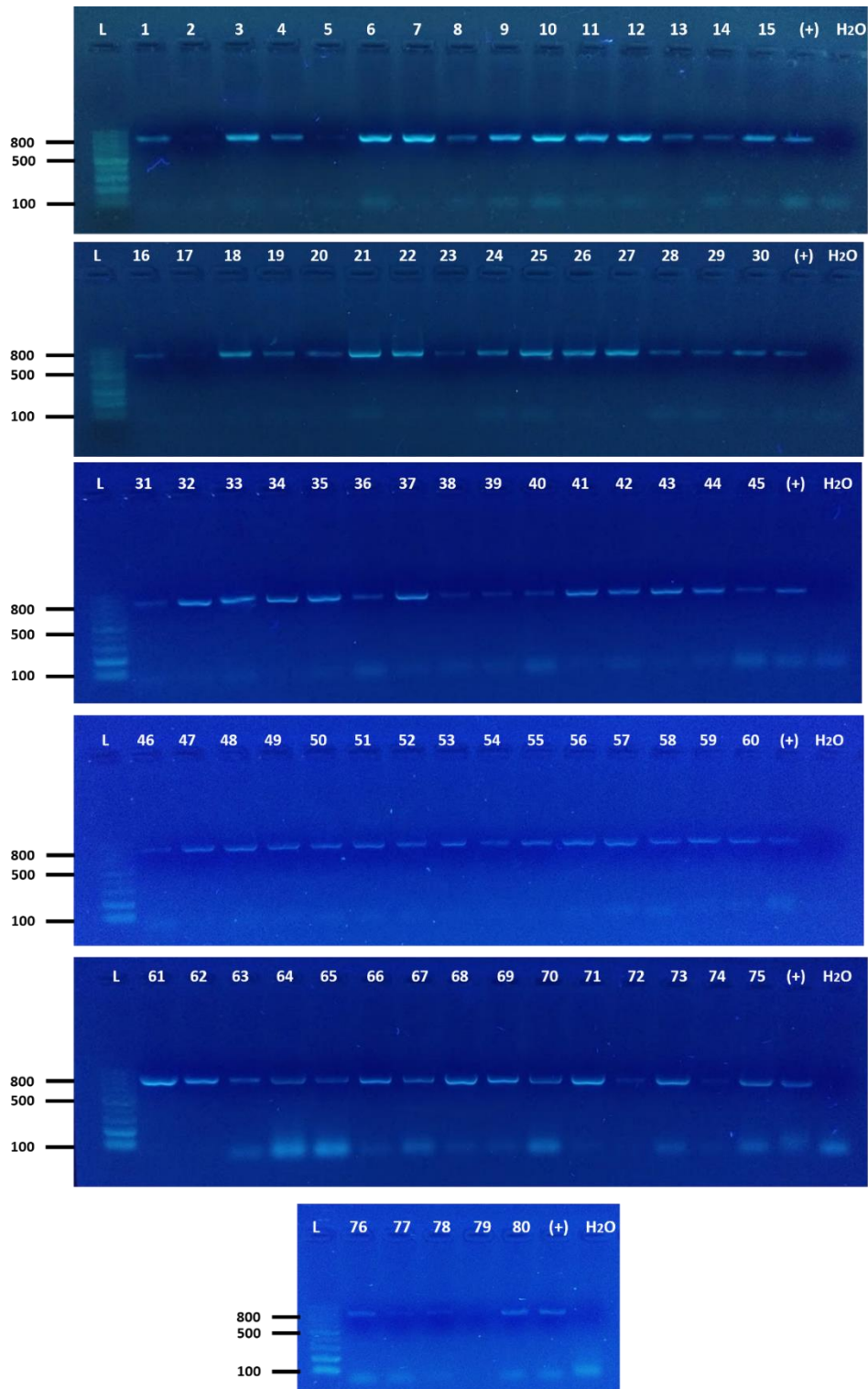


Figura 7: Amplificación de control interno 18S de 80 muestras sintomáticas .
 Geles de agarosa 2% teñidos con HydraGreen. Carriles 1-77: amplificación de fragmento de gen 18S (844 pb) de 80 muestras. Carriles 78-80: amplificación de fragmento del gen 18S de controles negativos L: Marcador de peso molecular 100 pb. (+) control positivo de la reacción y control de agua.

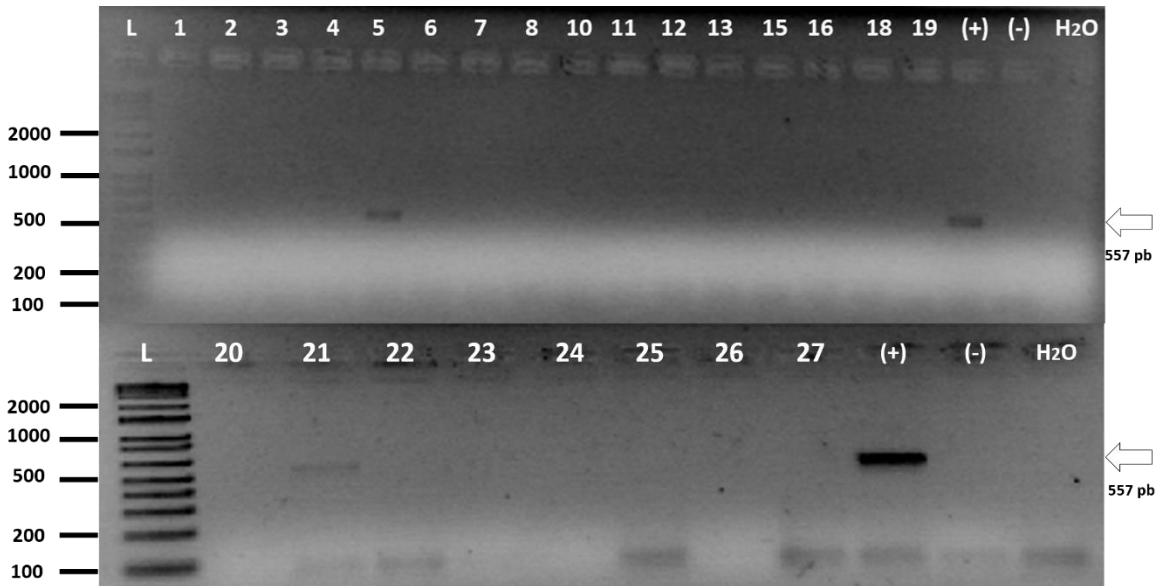


Figura 8: Ejemplo de diagnóstico de GRBV por PCR. Amplificación de fragmento específico para diagnóstico de GRBV analizado en geles de agarosa 2.5% teñidos con bromuro de etidio. L: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus. Carriles 1-27: productos de PCR probados para GRBV (557 pb) (Al Rwahnih et. al, 2013). Control (+), control (-) planta sana y control de agua. Carriles 5 y 21: Muestras positivas para GRBV.

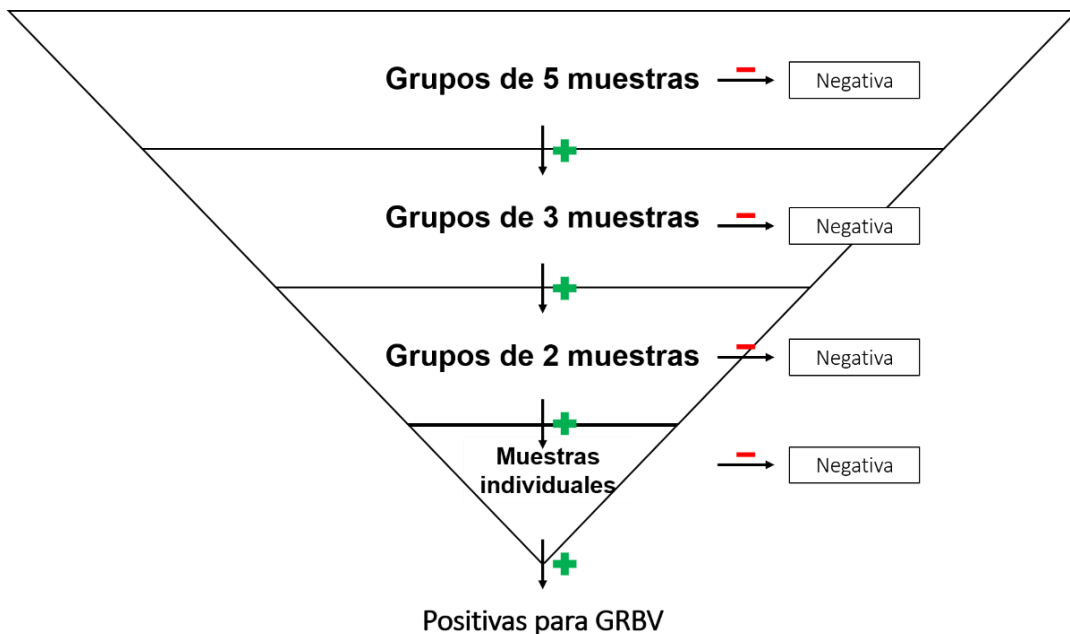


Figura 9: Metodología para diagnóstico de GRBV en grupos. Los grupos negativos se descartaron. Los grupos que resultaron positivos pasaron al siguiente nivel reorganizando las muestras que los acompañan en grupos menores.

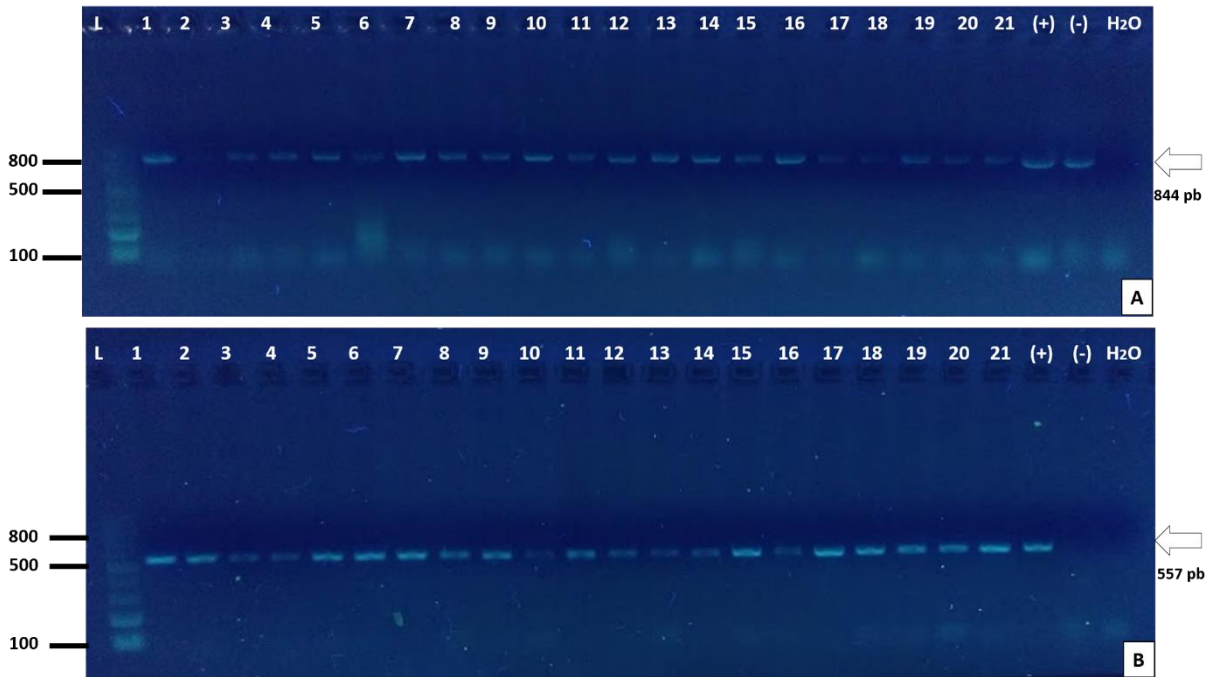


Figura 10: Amplificación de control interno 18S y muestras positivas GRBV. Geles de agarosa 2.5% teñidos con bromuro de etidio. A. Amplificación de control interno 18S (844 pb). B. Detección de GRBV (557 pb). L: Marcador de peso molecular 100 pb. Carriles 1-21: productos de PCR de muestras positivas para GRBV. Control (+): planta conocida infectada con GRBV. Control (-): planta sana. H2O: control negativo de reacción de PCR.

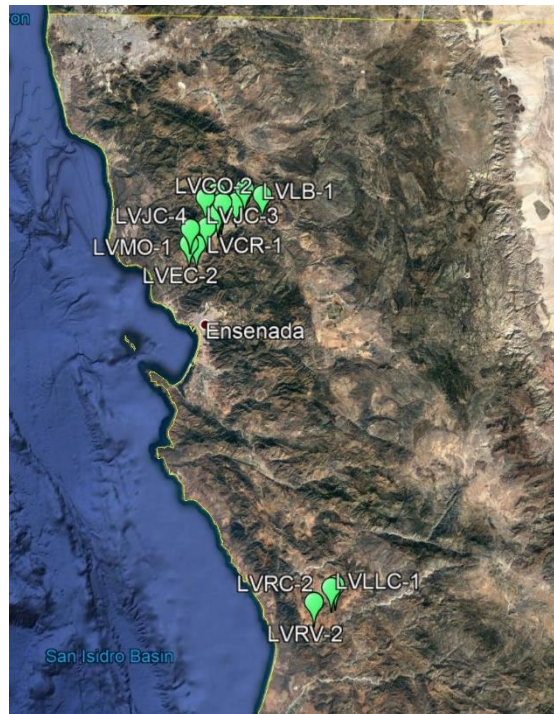


Figura 11: Origen de las 21 muestras positivas a GRBV.

Después de analizar un total de 80 muestras por los métodos descritos anteriormente, se encontraron 21 muestras positivas (**Figura 10**). El 85% de los aislados de GRBV se encuentran distribuidos en la nueva ruta del vino (Valle de Guadalupe), el porcentaje restante se distribuye en la conocida como antigua ruta del vino (Valle de San Vicente) (**Figura 11**). Se detectó GRBV tanto en plantas de variedad tinta como en plantas de variedad blanca; en algunas de ellas se observó una sintomatología más avanzada. En plantas de variedad tinta se observaron manchas rojas en la lámina de la hoja y venas secundarias y terciarias rojas. En plantas de variedad blanca se presentaron síntomas como clorosis foliar, en algunas plantas los síntomas de la enfermedad van comenzando (**Figura 12**).

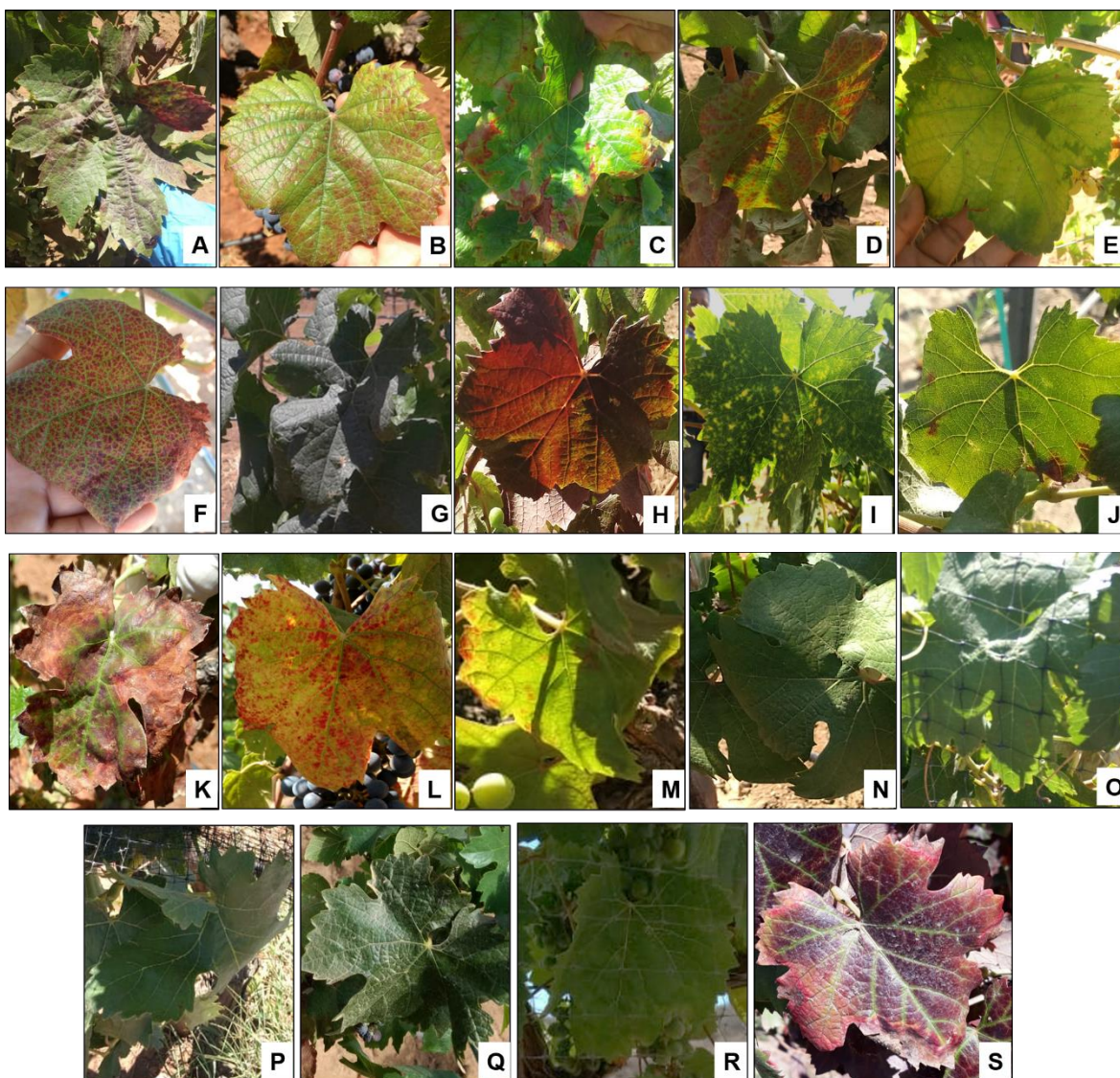


Figura 12: Fotos de 19 muestras positivas a GRBV.

A, C, G, I y K: Variedad desconocida. B, F, O y S: Variedad Nebbiolo. D, M y N: Variedad Zinfandel. E: Variedad Thompson. J y Q: Variedad Sauvignon Blanc. H: Uva de mesa. L: Variedad Petit Verdot. P: Variedad Cabernet Franc. R: Variedad Malbec.

Amplificación de genoma completo de GRBV

Se realizaron diferentes ensayos para amplificar el genoma completo de los aislados de GRBV mediante la técnica de amplificación por círculo rodante (RCA), para ello se adaptó un protocolo de Knierim y Maiss, 2007 (Descrito en Materiales y métodos). Los productos de RCA se analizaron por electroforésis en gel de agarosa 0.8%.

Los ensayos realizados para amplificar el genoma circular de los aislados de GRBV no fueron exitosos. En la primera prueba se utilizaron los 3 juegos de enzimas (pirofosfatasa y $\phi 29$) disponibles en el laboratorio de virología agrícola; se realizó una matriz de combinaciones de enzimas (**Tabla 10**) y se utilizaron 2 muestras positivas a GRBV, como control positivo se utilizó DNA de tomate positivo a los geminivirus PHYVV y PepGMV (**Figura 13**). La segunda prueba realizada fue con hexámeros al azar exo-resistentes y hexámeros al azar (para síntesis de cDNA) en mayor concentración (600 μM) (**Figura 14**). No se observó amplificación en ninguna de las pruebas realizadas.

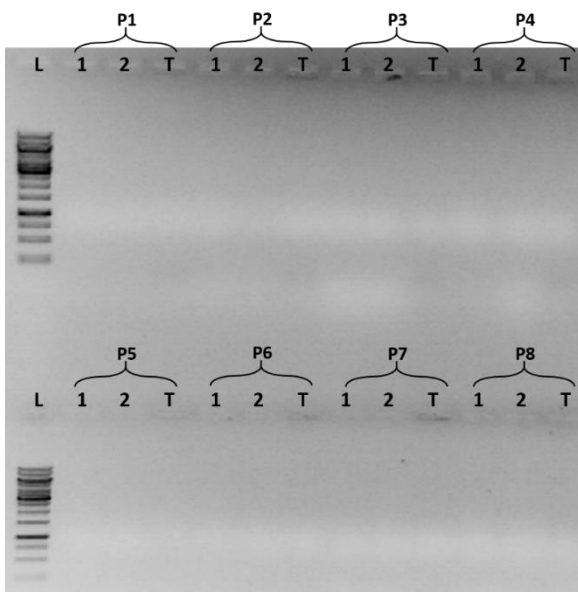


Figura 13: Ensayos de amplificación de genomas circulares.

Gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. L: Marcador de peso molecular O'Gene Ruler 1 Kb. 1 y 2: Muestras positivas de GRBV. T: Muestra de tomate, positiva a geminivirus. P1-P8: Pruebas con diferentes enzimas (**Tabla 10**).

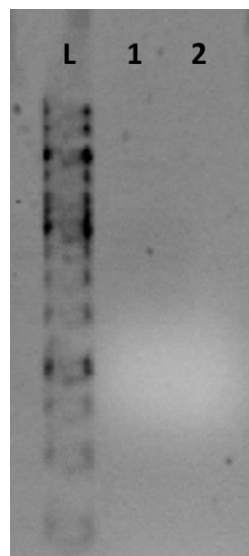


Figura 14: Segundo ensayo de amplificación de genomas circulares.

Gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio. L: Marcador de peso molecular O'Gene Ruler 1 Kb. Carril 1: Prueba con hexámeros exo-resistentes. Carril 2: Prueba con hexámeros al azar (usados para síntesis de cDNA).

Amplificación de genoma en mitades

Debido a que no se logró amplificar el genoma completo de los aislados de GRBV obtenidos mediante RCA; se optó por amplificar los genomas en dos fragmentos (A y B) mediante PCR de alta fidelidad (**Figura 15**). Para la amplificación del fragmento A se utilizó la combinación de primers CPfor-Reprev (~1.8 kb) y para la amplificación del fragmento B se utilizaron los primers Repfor-CPrev (~1.9 kb) (Krenz et. al, 2014; Gasperin-Bulbarela et. al, 2018). Se realizaron pruebas para estandarizar la técnica, modificando el programa de PCR, así como la concentración de DNA en la reacción.

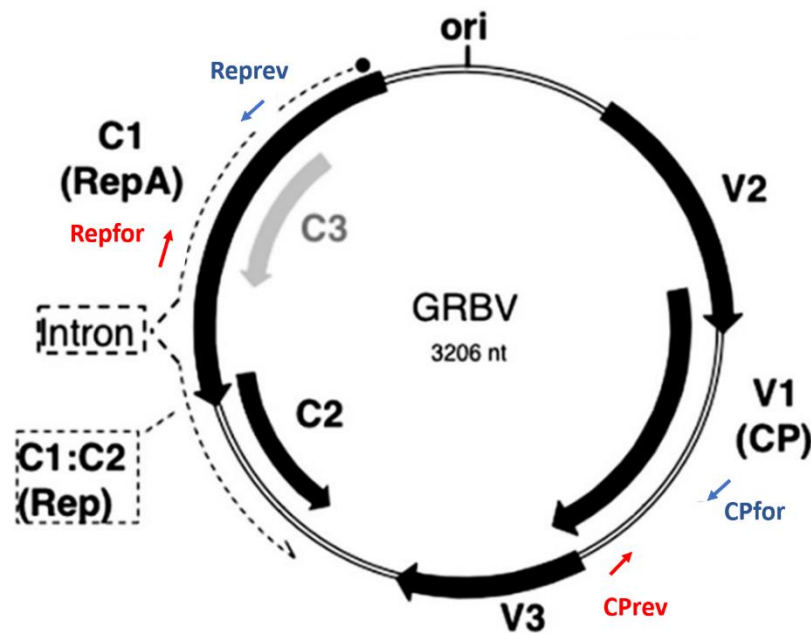


Figura 15: Amplificación de fragmentos A y B del genoma de GRBV. Combinación de primers utilizados para la amplificación del genoma de GRBV en mitades. Primers CPfor-Reprev (en azul) para amplificación de fragmento A del genoma (1.8 kb). Primers Repfor-CPrev (en rojo) para amplificación de fragmento B del genoma (1.9 kb). Modificada de Sudarshana et. al, 2015.

En el primer ensayo se utilizaron 3 muestras y 40 ciclos en el programa de PCR (ANEXO IV, 1), en la muestra 1 se observa la amplificación de los fragmentos de tamaño esperado, fragmento A (1.8 kb) y B (1.9 kb); en la muestra 2, se observa una banda del tamaño esperado para el fragmento A, en la muestra 3 no se observa ninguna amplificación; en todas las muestras se observan muchas bandas inespecíficas (**Figura 16 A**). En el segundo ensayo se utilizaron 6 muestras, se excluyó la muestra de la que se pudo amplificar el genoma en mitades, se utilizó el mismo programa de PCR que en el primer ensayo, solo se modificó la concentración de DNA en la reacción. Se observa solamente la amplificación del fragmento B (1.9 kb) en las muestras 3 y 5, así como, algunas bandas inespecíficas

en el carril B de las muestras 3 y 6 (**Figura 16 B**). En el tercer ensayo se utilizaron las mismas 6 muestras y se disminuyó el número de ciclos en el programa de PCR (ANEXO IV, 2). Se observa la amplificación de ambos fragmentos en la muestra 5 y la amplificación del fragmento B (1.9 kb) en las muestras 2 y 3 (**Figura 16 C**).

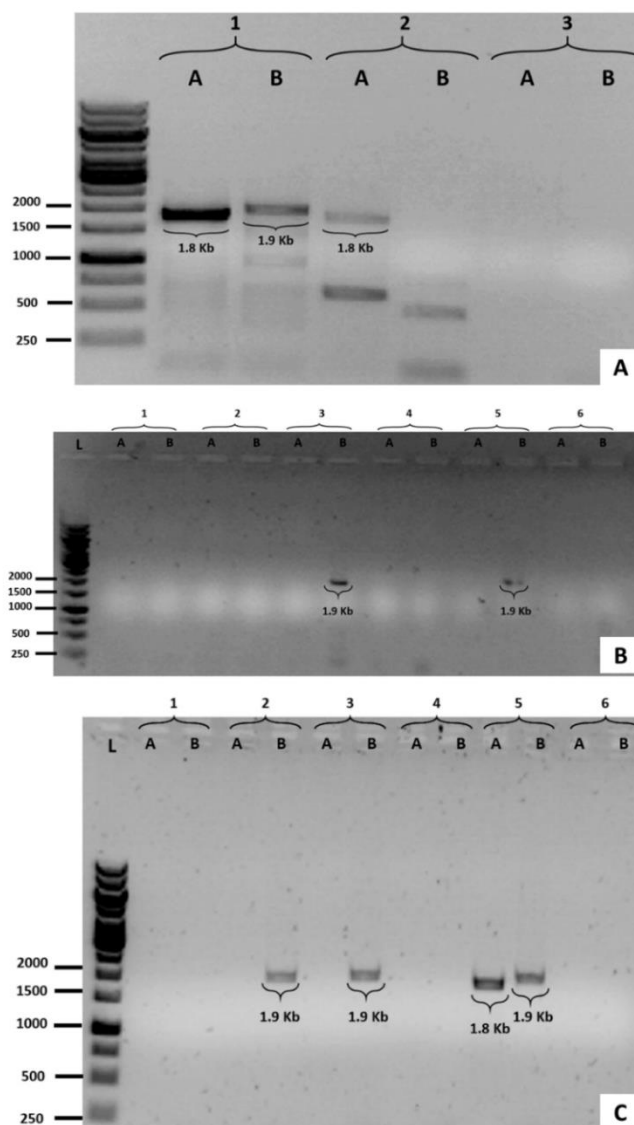


Figura 16: Ensayos de amplificación del genoma de GRBV en mitades, muestras de plantas positivas a GRBV.

Geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio. L: Marcador de peso molecular O'Gene Ruler 1Kb. Carriles 1-6: productos de PCR-HF, amplificación de fragmentos A y B. A, B y C: diferentes ensayos para la optimización de la reacción de PCR de alta fidelidad. A: Ensayo con programa de amplificación de 40 ciclos. B: Ensayo con programa de amplificación de 40 ciclos y concentración de DNA (~50 ng/μl). C: Ensayo con programa de amplificación de 30 ciclos y concentración de DNA (~50 ng/μl).

Para la amplificación de ambos fragmentos del genoma se disminuyó la concentración del DNA (< 50 ng/μl) y se utilizó el programa de amplificación de 30 ciclos (ANEXO IV). Se realizó la amplificación del fragmento A (CPfor-Repv) ~1.8 kb y del fragmento B (Repfor-CPv) ~1.9 kb de las 21 muestras positivas a GRBV, además se amplificaron ambas mitades del aislado GRBV-JGB (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018) como control positivo. La amplificación de los fragmentos se verificó mediante electroforésis en gel de agarosa 0.8%, fragmento A (**Figura 17 A**) y fragmento B (**Figura 17 B**).

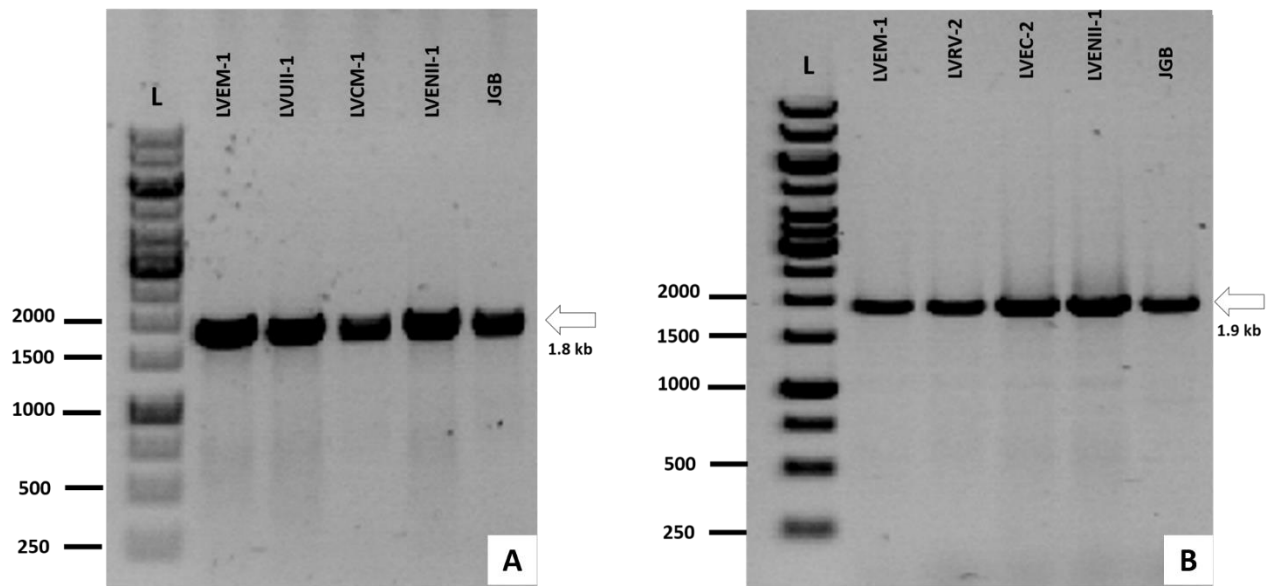


Figura 17: Ejemplo de amplificación de fragmentos A y B del genoma de GRBV.

Geles de agarosa 0.8% teñidos con bromuro de etidio. L: Marcador de peso molecular O'Gene Ruler. LVXX-X: Muestras problema. JGB: Amplificación de fragmento A (1.8 kb) y B (1.9 kb) de aislado JGB (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018). A Amplificación de fragmento A (1.8 kb) del genoma de GRBV. B. Amplificación de fragmento B del genoma (1.9 kb) de GRBV. En todos los carriles se observa la amplificación de la banda de 1.8 kb y 1.9 kb.

Patrones de restricción *in silico* de aislados reportados

Para hacer una predicción de los patrones de restricción (RFLPs) esperados en cada uno de los fragmentos A y B del genoma, se tomaron 12 aislados de GRBV reportados: 2 aislados de Baja California, 3 aislados de Nueva York, 4 aislados de Canadá, un aislado de California, un aislado de Washington y un aislado de Corea. Se fragmentaron los genomas, de acuerdo a la combinación de primers CPfor – Reprev (fragmento A, ~1.8 kb) y Repfor – CPrev (fragmento B, ~1.9 kb) en el software Unipro UGENE v1.31.1 (Okonechnikov et. al, 2012), posteriormente, con la herramienta NEBcutter V2.0 (Vincze et. al, 2003) se simuló la digestión de cada fragmento utilizando las enzimas de restricción AluI, BstUI, EcoRI y NcoI.

En los aislados GRBV-JGB, GRBV-JCT y GRBV ONRB7 con las 4 enzimas utilizadas no se observa ninguna diferencia en el número de cortes en el fragmento A del genoma, sin embargo, en el fragmento B se observa diferente número de cortes con estas enzimas. Un caso similar sucede con los aislados GRBV-CF214, GRBV-JRT456 y GRBV-SW6 en los que no se observa diferencias de corte en el fragmento A, y en el fragmento B solo se observa un patrón de corte diferente en el aislado de Corea (GRBV-SW6).

Los aislados WASY1, NY926, BCRB4, 93-21, CF214 y JRT456 presentan el mismo patrón de corte en el fragmento A del genoma con la enzima AluI, con esta misma enzima los aislados JCT, JGB, ONRB7, BCRB5 y NY135 muestran el mismo patrón, el aislado SW6 de Corea tiene un patrón de corte diferente. En el fragmento B del genoma con la enzima AluI los aislados se agrupan de diferente forma, WASY1, NY926, BCRB4 y 93-21 comparten patrón de corte; CF214 y JRT456 se agrupan, ONRB7 y SW6 también se agrupan, sin embargo, los aislados JGB, JCT, BCRB5 y NY135 muestran un patrón de corte diferente (**Tablas 1-3**).

Los patrones de corte obtenidos con la enzima EcoRI en el fragmento A del genoma agrupan a los aislados WASY1, NY926, BCRB4, 93-21, CF214, JRT456 y BCRB5; los aislados JGB, JCT y ONRB7 en otro grupo que comparte la similitud de patrones de restricción y finalmente los aislados NY135 y SW6 con RFLPs diferentes a los de los demás aislados utilizados en la predicción *in silico*. En el fragmento B del genoma con la enzima EcoRI se observan patrones diferentes, agrupando a los aislados WASY1, NY926, BCRB4 y 93-21, CF214 y JRT456 con otro patrón de corte, JCT y ONRB7 comparten patrón de corte, finalmente JGB, BCRB5, NY135 y SW6 con RFLPs diferentes cada uno (**Tablas 1-3**). La variedad de RFLPs obtenidos con la predicción *in silico* es útil para inferir a qué aislados son más similares los encontrados en Baja California, así como tener un buen margen de comparación con los aislados que han sido reportados.

Tabla 1: Patrones de restricción *in silico* de fragmento A y fragmento B de 12 aislados reportados de GRBV. Enzimas de restricción: AluI, BstUI, EcoRI y NcoI. Posición de corte en el fragmento del genoma, número de cortes y tamaño de fragmentos resultantes del corte.

Enzima	Aislado GRBV-JGB (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018) B.C.						Aislado GRBV-JCT (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018) B.C.					
	Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)		
	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
AluI	614, 1281, 1433	3	152, 345, 614, 667	341, 546, 1210	3	205, 341, 664, 758	618, 1285, 1437	3	152, 341, 618, 667	345, 550, 760, 777, 1218	5	17, 205, 210, 345, 441, 754
BstUI	478, 797	2	319, 478, 981	763, 969, 1272	3	206, 303, 696, 763	482, 801	2	319, 482, 977	768, 962, 977, 1280	4	15, 194, 303, 692, 768
EcoRI	441, 1552, 1642	3	90, 136, 441, 1111	58, 148, 1472	3	58, 90, 496, 1324	445, 1556, 1646	3	90, 132, 445, 1111	62, 152	2	62, 90, 1820
NcoI	-	-	-	1466	1	502, 1466	-	-	-	655	1	655, 1317

Enzima	Aislado GRBV-CF214 (Al Rhawnih et. al, 2013) California						Aislado GRBV-ONRB7 (Poojari et. al, 2017) Canadá					
	Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)		
	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
AluI	616, 1282, 1367, 1434	4	67, 85, 344, 616, 666	464, 546, 576, 1345, 1840	5	30, 82, 129, 464, 495, 769	616, 1283, 1435	3	152, 343, 616, 667	343, 548, 774, 1214	4	205, 226, 343, 440, 756
BstUI	480, 798, 1275, 1307	4	32, 318, 471, 477, 480	1652, 1845	3	124, 193, 1652	480, 799	2	319, 480, 979	765, 958, 973, 1276	4	15, 193, 303, 694, 765
EcoRI	443, 1583	2	195, 443, 1140	89, 1130	2	89, 839, 1041	443, 1554, 1644	3	90, 134, 443, 1111	60, 150	3	60, 90, 1820
NcoI	-	-	-	1136, 1953	2	16, 817, 1136	-	-	-	-	-	-

Enzima	Aislado GRBV-JRT456 (Krenz et. al, 2012) Nueva York						Aislado GRBV-SW6 (Lim et. al, unpublished) Corea					
	Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)		
	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
AluI	616, 1282, 1367, 1434	4	67, 85, 344, 616, 666	464, 546, 576, 1345, 1840	5	30, 82, 129, 464, 495, 769	498, 616, 1283, 1435	4	118, 152, 343, 498, 667	343, 548, 774, 1214	4	205, 226, 343, 440, 756
BstUI	480, 798, 1275, 1307	4	32, 318, 471, 477, 480	1652, 1845	2	124, 193, 1652	480, 799	2	319, 480, 979	765, 958, 973, 1276	4	15, 193, 303, 694, 765
EcoRI	443, 1583	2	195, 443, 1140	89, 1130	2	89, 839, 1041	443, 1644	2	134, 443, 1201	150	1	150, 1820
NcoI	-	-	-	1136, 1953	2	16, 817, 1136	-	-	-	-	-	-

Aislado GRBV-WASY1 (Adiputra et. al, unpublished) Washington							Aislado GRBV-NY926 (Perry et. al, 2016) Nueva York					
Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)				Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)		
Enzima	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
AluI	616, 1282, 1367, 1434	4	67, 85, 344, 616, 666	464, 546, 576, 769, 1264	5	30, 82, 193, 464, 495, 705	616, 1282, 1367, 1434	4	67, 85, 344, 616, 666	464, 546, 576, 769, 1264	5	30, 82, 193, 464, 495, 705
BstUI	480, 798, 1275, 1307	4	32, 318, 471, 477, 480	764, 957	2	193, 764, 1012	480, 798, 1275, 1307	4	32, 318, 471, 477, 480	764, 957	2	193, 764, 1012
EcoRI	443, 1583	2	195, 443, 1140	89, 1475	2	89, 494, 1386	443, 1583	2	195, 443, 1140	89, 1475	2	89, 494, 1386
NcoI	-	-	-	652, 1469	2	500, 652, 817	-	-	-	652, 1469	2	500, 652, 817

Aislado GRBV_BCRB4 (Poojari et. al, 2017) Canadá						Aislado GRBV_BCRB5 (Poojari et. al, 2017) Canadá						
Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)			
Enzima	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
AluI	616, 1283, 1368, 1435	4	67, 85, 343, 616, 667	465, 547, 577, 770, 1265,	5	30, 82, 193, 465, 495, 705	615, 1282, 1434	3	152, 344, 615, 667	464, 547, 771, 1266	4	83, 224, 464, 495, 706
BstUI	480, 799, 1276, 1308	4	32, 319, 470, 477, 480	765, 959	2	193, 765, 1012	479, 798	2	319, 479, 980	766, 959	2	193, 766, 1013
EcoRI	443, 1584	2	194, 443, 1141	90, 1476	2	90, 494, 1386	442, 1583	2	195, 442, 1141	89	1	89, 1883
NcoI	-	-	-	653, 1470	2	500, 653, 817	-	-	-	655	1	655, 1317

Aislado GRBV_93-21 (Xiao et. al, unpublished) Canadá						Aislado GRBV_NY135 (Krenz et. al, 2014) Nueva York						
Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)			Fragmento B (Rep F + CP R)			
Enzima	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	Posición de corte	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
AluI	622, 1288, 1373, 1440	4	67, 85, 338, 622, 666	470, 552, 582, 775, 1270	5	30, 82, 193, 470, 495, 705	614, 1281, 1386, 1433	4	47, 105, 345, 614, 667	546, 1262	2	546, 707, 716
BstUI	486, 804, 1281, 1313	4	32, 318, 465, 477, 486	770, 963	2	1993, 770, 1012	478, 797	2	319, 478, 981	764	1	764, 1205
EcoRI	449, 1589	2	189, 449, 1140	95, 1481	2	95, 494, 1386	441, 1552, 1582	3	30, 196, 441, 1111	58, 88, 1473	3	30, 58, 496, 1385
NcoI	-	-	-	658, 1475	2	500, 658, 817	873	1	873, 905	1467	1	502, 1467

Tabla 2: Agrupación por RFLPs de aislados reportados, cortados con enzima AluI.

Los colores indican los aislados que comparten patrones de restricción de acuerdo a tamaño de fragmentos obtenidos en la predicción *in silico*. * Aislados con patrón de restricción único.

Aislado	Fragmento A	Fragmento B
WASY1	[Color Azul]	[Color Azul]
NY926		
BCRB4		
9321		
CF214		
JRT456		
JGB	[Color Verde]	*
JCT		*
ONRB7		[Color Naranja]
BCRB5		*
NY135		*
SW6		*

Tabla 3: Agrupación por RFLPs de aislados reportados, cortados con enzima EcoRI.

Los colores indican los aislados que comparten patrones de restricción de acuerdo a tamaño de fragmentos obtenidos en la predicción *in silico*. * Aislados con patrón de restricción único.

Aislado	Fragmento A	Fragmento B
WASY1	[Color Azul]	[Color Azul]
NY926		
BCRB4		
9321		
CF214		
JRT456		
JGB	[Color Verde]	*
JCT		[Color Naranja]
ONRB7		
BCRB5	[Color Azul]	*
NY135	*	*
SW6	*	*

Patrones con enzimas de restricción (RFLPs)

Las mitades A y B del genoma amplificadas fueron cortadas con las enzimas de restricción AluI y EcoRI.

En el fragmento A se obtuvieron 2 patrones de corte diferentes con la enzima AluI (**Figura 18 A**), sin embargo, en el fragmento B con la misma enzima se obtuvieron 5 patrones de corte diferentes (**Figura 18 B**). Con la enzima EcoRI se observaron 2 patrones de corte diferentes tanto en el fragmento A como en el fragmento B (**Figura 19**). La suma de las bandas obtenidas en cada muestra da un total de ~1.8 kb y ~1.9 kb correspondiente al tamaño total de los fragmentos A y B del genoma respectivamente, indicativo de que la digestión con las enzimas de restricción AluI y EcoRI fue completa. Los patrones de corte obtenidos del aislado JGB con ambas enzimas coinciden con el tamaño de fragmentos esperados de la predicción realizada *in silico* (**Tabla 1**). Los patrones de corte de todos los aislados obtenidos se presentan en la **Figura 20** y **Figura 21**. El tamaño de los fragmentos obtenidos y el número de cortes de las 21 muestras se presenta en las Tablas 4-7.

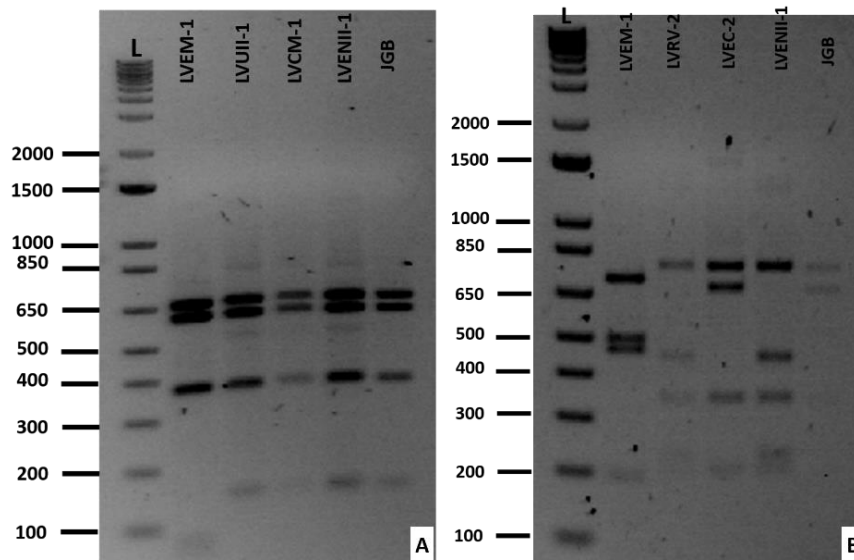


Figura 18: Ejemplo de patrones de restricción con enzima AluI.

Geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio. L: Marcador de peso molecular 1Kb Plus. Muestras LVXX-X cortadas con enzima AluI. A. Fragmento A del genoma. B. Fragmento B del genoma

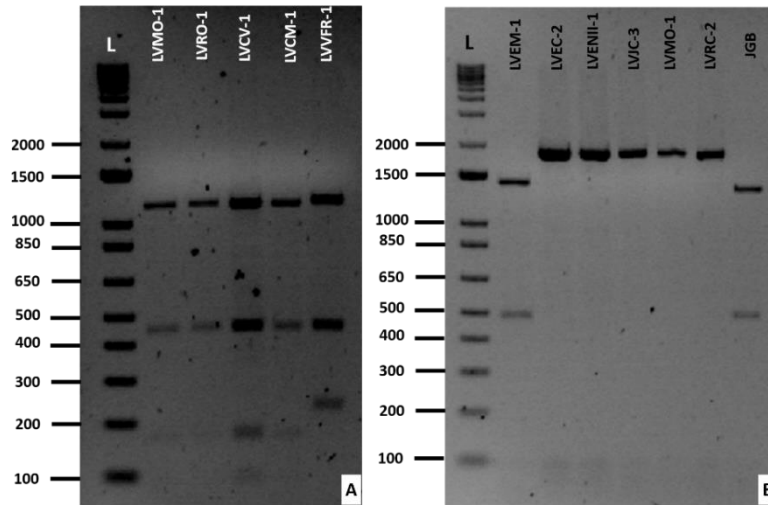


Figura 19: Ejemplo de patrones de restricción con enzima EcoRI. Geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio. L: Marcador de peso molecular 1Kb Plus. Muestras LVXX-X cortadas con enzima EcoRI. A. Fragmento A del genoma. B. Fragmento B del genoma

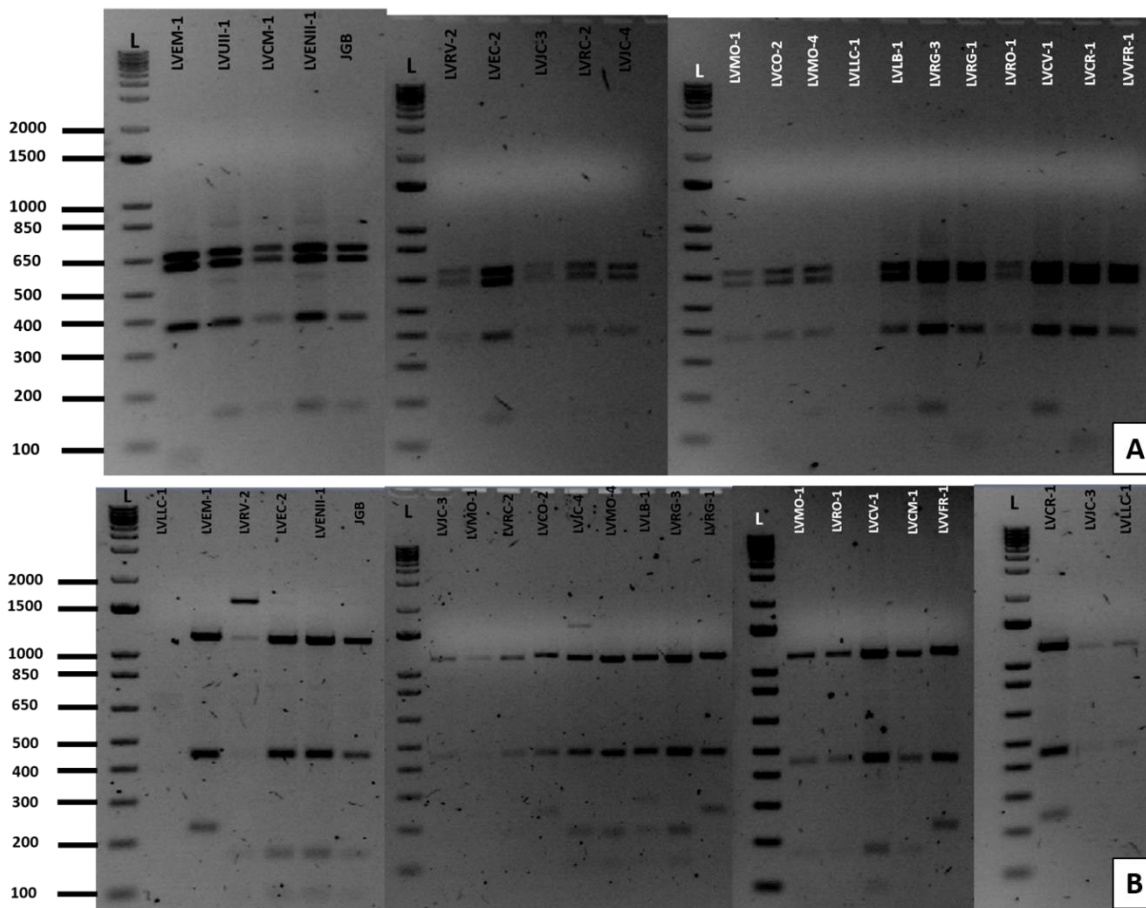


Figura 20: Patrones de restricción de fragmento A del genoma. Geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio. Fragmento A del genoma cortado con dos enzimas de restricción. L: Marcador de peso molecular 1Kb Plus. A. Muestras LVXX-X cortadas con enzima AluI. B. Muestras LVXX-X cortadas con enzima EcoRI. Algunas muestras fueron repetidas para confirmar el patrón de corte.

previamente para Baja California (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018). JCT y ONRB7 pertenecen al clado I (**Figura 4**).

Los aislados del grupo II y III tienen el mismo patrón en el fragmento A del genoma. En el fragmento B de los aislados del grupo III también hay similitud con los aislados JCT y ONRB7, sin embargo, los cortes con la enzima AluI indican una diferencia significativa con los aislados del grupo II (**Tabla 1** y **Tabla 9**), podría tratarse de una variante del aislado JCT.

El patrón de corte del aislado LVRG-3, miembro del grupo IV, es una combinación de los patrones identificados en los aislados JGB, JCT (Baja California), BCRB5 y ONRB7 (Canadá), del clado I. El aislado LVRG-1, miembro del grupo V, en el fragmento A presenta un patrón de corte más parecido a los aislados CF214 (California), NY926, JRT456 (Nueva York), BCRB4 (Canadá), miembros del clado II; en el fragmento B se observan patrones de corte diferentes a los obtenidos en los aislados de la predicción *in silico*.

El aislado LVMO-1, miembro del grupo VI tiene patrones de restricción muy similares a los aislados JGB, JCT y ONRB7, sin embargo los cortes realizados por la enzima AluI en el fragmento B del genoma permitieron identificar una variante de estos aislados. El fragmento B de este aislado es similar al del aislado LVLLC-1 (miembro del grupo VIII). El aislado LVLLC-1 tiene un patrón de corte muy diferente en el fragmento A al de los encontrados en la predicción *in silico*. Ambos son nuevos aislados que posiblemente se agruparían con los aislados del clado I. LVEC-2 aislado único del grupo VII tiene una combinación de patrones de corte de JGB (Baja California) y ONRB7 (Canadá).

Tabla 4: Patrones de restricción en fragmento A del genoma, cortados con enzima AluI. Aislados bajacalifornianos de GRBV, tamaño de fragmentos obtenidos en fragmento A del genoma con enzima de restricción AluI. Los colores indican los aislados que comparten patrones de restricción. * Indica el tamaño de fragmento esperado de acuerdo a predicciones *in silico* de aislados reportados. Tamaño obtenido (± 50 pb)/ Tamaño esperado*.

Muestra	AluI						Total
	# Cortes	Tamaño fragmentos (pb)					
LVEM-1	4	60 / 67*	90 / 85*	360 / 344*	630 / 614*	670 / 667*	1810 / 1777*
LVCO-2							
LVCR-1							
LVVFR-1							
LVRG-1							
LVRV-2	3	160 / 152*	380 / 345*	630 / 614*	670 / 667*	1840 / 1778*	
LVENII-1							
LVUII-1							
LVRO-1							
LVCV-1							
LVCM-1							
LVRG-2							
LVJC-3							
LVRG-3							
LVRC-2							
LVJC-4							
LVMO-4							
LVLB-1							
LVMO-1							
LVEC-2							
JGB							
LVLLC-1	3	380 / 420*	660 / 630*	670 / 690*		1680 / 1770*	

Tabla 5: Patrones de restricción en fragmento A del genoma, cortados con enzima EcoRI.

Aislados bajacalifornianos de GRBV, tamaño de fragmentos obtenidos en fragmento A del genoma con enzima de restricción EcoRI. Los colores indican los aislados que comparten patrones de restricción. * Indica el tamaño de fragmento esperado de acuerdo a predicciones *in silico* de aislados reportados. Tamaño obtenido (± 50 pb)/ Tamaño esperado*.

		EcoRI				
Muestra	# Cortes	Tamaño fragmentos (pb)				Total
LVEM-1	2	230 / 230*	450 / 441*	1100 / 1111*		1780 / 1782*
LVCO-2						
LVCR-1						
LVVFR-1						
LVRG-1						
LVRV-2	3	90 / 90*	170 / 136*	450 / 441*	1100 / 1111*	1810 / 1778*
LVENII-1						
LVUII-1						
LVRO-1						
LVCV-1						
LVCM-1						
LVRG-2						
LVJC-3						
LVLIC-1						
LVRG-3						
LVRC-2						
LVJC-4						
LVMO-4						
LVLB-1						
LVMO-1						
LVEC-2						
JGB						

Tabla 6: Patrones de restricción en fragmento B del genoma, cortados con enzima AluI.

Aislados bajacalifornianos de GRBV, tamaño de fragmentos obtenidos en fragmento B del genoma con enzima de restricción AluI. Los colores indican los aislados que comparten patrones de restricción. * Indica el tamaño de fragmento esperado de acuerdo a predicciones *in silico* de aislados reportados. Tamaño obtenido (± 50 pb)/ Tamaño esperado*.

Muestra	AluI						Total
	# Cortes	Tamaño fragmentos (pb)					
LVEM-1	3	200 / 210*	470 / 480*	500 / 510*	730 / 750*		1900 / 1950*
LVCO-2							
LVRG-3							
LVCR-1							
LVVFR-1							
LVRV-2	4	200 / 200*	220 / 220*	320 / 350*	440 / 450*	700 / 750*	1930 / 1970*
LVENII-1							
LVUII-1							
LVRO-1							
LVCV-1							
LVCM-1							
LVRG-2							
LVJC-3	3	230 / 220*	350 / 370*	450 / 480*	800 / 830*		1830 / 1880*
LVLIC-1							
LVRC-2							
LVJC-4							
LVMO-4							
LVRG-1							
LVLB-1							
LVMO-1	2	230 / 220*	350 / 370*		1300 / 1300*		1830 / 1890*
LVEC-2	3	200 / 205*	350 / 341*	660 / 664*	750 / 758*		1970 / 1968*
JGB							

Tabla 7: Patrones de restricción en el fragmento B del genoma, cortados con enzima EcoRI.

Aislados bajacalifornianos de GRBV, tamaño de fragmentos obtenidos en fragmento B del genoma con enzima de restricción EcoRI. Los colores indican los aislados que comparten patrones de restricción. * Indica el tamaño de fragmento esperado de acuerdo a predicciones *in silico* de aislados reportados. Tamaño obtenido (± 50 pb)/ Tamaño esperado*.

EcoRI						
Muestra	# Cortes	Tamaño fragmentos (pb)				Total
LVEM-1	3	50 / 58*	90 / 90*	500 / 496*	1450 / 1324*	2090 / 1968*
LVCO-2						
LVRG-1						
LVCR-1						
LVVFR-1						
JGB						
LVRV-2	2	60 / 60*	90 / 90*	1800 / 1820*	1950 / 1970*	
LVENII-1						
LVUII-1						
LVRO-1						
LVCV-1						
LVCM-1						
LVRG-2						
LVJC-3						
LVRG-3						
LVLLC-1						
LVRC-2						
LVJC-4						
LVMO-4						
LVLB-1						
LVMO-1						
LVEC-2						

Tabla 8: Grupos de aislados bajacalifornianos de GRBV.

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Grupo VIII
LVEM-1	LVRV-2	LVJC-3	LVRG-3	LVRG-1	LVMO-1	LVEC-2	LVLLC-1
LVCO-2	LVENII-1	LVRC-2					
LVCR-1	LVUII-1	LVJC-4					
LVVFR-1	LVRO-1	LVMO-4					
	LVCV-1	LVLB-1					
	LVCM-1						
	LVRG-2						

Tabla 9: Patrones de restricción de aislados bajacalifornianos.

Patrones de restricción de fragmento A y fragmento B de 8 grupos de 21 aislados de GRBV. Enzimas de restricción: Alul y EcoRI. Número de cortes y tamaño de fragmentos obtenidos (pb).

Grupo I					Grupo II			
Fragmento A (CP F + Rep R)		Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)		Fragmento B (Rep F + CP R)	
Enzima	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
Alul	4	67, 85, 344, 614, 667	3	210, 480, 510, 750	3	152, 345, 614, 667	4	200, 220, 350, 450, 750
EcoRI	2	230, 441, 1111	3	58, 90, 496, 1324	3	90, 136, 441, 1111	2	60, 90, 1820

Grupo III					Grupo IV			
Fragmento A (CP F + Rep R)		Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)		Fragmento B (Rep F + CP R)	
Enzima	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
Alul	3	152, 345, 614, 667	3	220, 370, 480, 830	3	152, 345, 614, 667	3	210, 480, 510, 750
EcoRI	3	90, 136, 441, 1111	2	60, 90, 1820	3	90, 136, 441, 1111	2	60, 90, 1820

Grupo V					Grupo VI			
Fragmento A (CP F + Rep R)		Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)		Fragmento B (Rep F + CP R)	
Enzima	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
Alul	4	67, 85, 344, 614, 667	3	220, 370, 480, 830	3	152, 345, 614, 667	2	220, 370, 1300
EcoRI	2	230, 441, 1111	3	58, 90, 496, 1324	3	90, 136, 441, 1111	2	60, 90, 1820

Grupo VII					Grupo VIII			
Fragmento A (CP F + Rep R)		Fragmento B (Rep F + CP R)			Fragmento A (CP F + Rep R)		Fragmento B (Rep F + CP R)	
Enzima	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)	# Cortes	Tamaño de fragmentos (pb)
Alul	3	152, 345, 614, 667	3	205, 350, 670, 750	2	420, 660, 690	2	220, 370, 1300
EcoRI	3	90, 136, 441, 1111	2	60, 90, 1820	3	90, 136, 441, 1111	2	60, 90, 1820

Clonación de fragmentos virales

Para estudiar la biología de un virus y caracterizarlo a nivel molecular es necesario producir clonas infectivas (Boulton, 2008). El método utilizado para esto es el uso de un plásmido vector en el cual se inserta el genoma del virus. pGreen es un plásmido que se ha utilizado para clonar geminivirus, este plásmido tiene marcadores de selección; entre ellos resistencia a kanamicina y α -complementación, es decir, la bacteria es deficiente en la actividad β -galactosidasa, en el plásmido se encuentra un fragmento de la β -galactosidasa que complementa esa deficiencia. En presencia de Xgal e IPTG se forman colonias azules, pero si hay un inserto en el plásmido la complementación se interrumpe y se forman colonias blancas (Hellens et. al, 2000), esto permite la selección de colonias clonadas con el inserto deseado.

Clonar los aislados geminivirales en un plásmido binario como pGreen permitirá preservarlos para su posterior secuenciación y más adelante, caracterizarlos en un hospedero susceptible mediante la agroinoculación con *Agrobacterium tumefaciens*.

Para la clonación de los aislados encontrados se seleccionó un aislado de cada uno de los ocho grupos. Se amplificó el fragmento B del genoma mediante PCR de alta fidelidad, el cual fue usado como inserto. El fragmento B del virus fue insertado en el plásmido pGreen, el cual es resistente a kanamicina.

En medio LB con kanamicina, Xgal e IPTG se seleccionaron las colonias blancas (**Figura 22**) las cuales contenían el plásmido con el inserto de interés, en la mayoría de los intentos se obtuvieron de 1 a 2 colonias blancas. Se tomaron las colonias blancas y se estriaron, posteriormente se realizó la extracción de plásmido por miniprep (Descrito en Metodología).

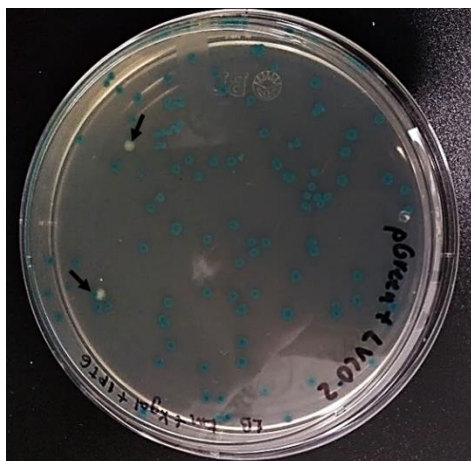


Figura 22: Ejemplo de colonias con fragmento B clonado. Colonias blancas y azules en medio LB + kanamicina + Xgal + IPTG. Las flechas señalan el crecimiento de las colonias blancas con el fragmento clonado.

Para verificar la clonación, se realizó PCR del DNA plasmídico con los primers GVGF y GVGR (producto esperado, 557 pb), los cuales amplifican una región dentro del fragmento B del genoma. En esta reacción de PCR se utilizaron 2 controles positivos, uno de ellos fue el fragmento B del genoma y el otro una muestra positiva del virus, como control negativo se utilizó el plásmido pGreen vacío, los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2% (**Figura 23**). Solo se obtuvo la clonación del fragmento B de 2 aislados, el aislado LVRG-3 y LVCO-2, carriles 4 y 5 respectivamente. Debido al tiempo y a la conclusión de mi estancia en el Laboratorio de Virología Agrícola no se probaron los demás aislados de GRBV para obtener la clonación ambos fragmentos (A y B).

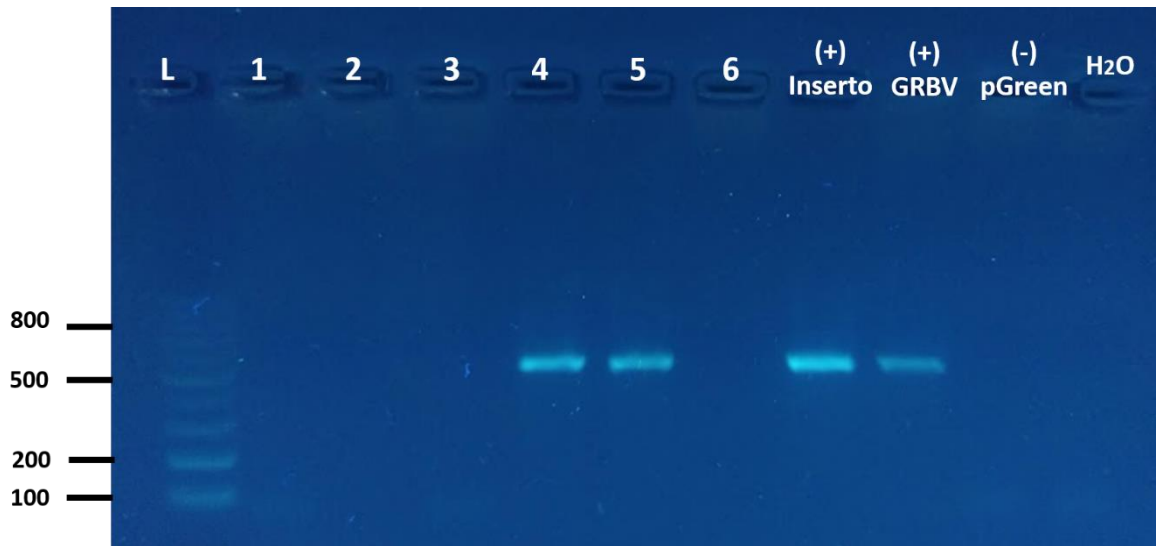


Figura 23: PCR de fragmento específico para confirmar clonaciones.

Gel de agarosa 2% teñido con HydraGreen. L: Ladder 100 pb. Carriles 1-6: Productos de PCR de DNA plasmídico de clonaciones (LVRC-2, LVMO-1, LVCM-1, LVCO-2, LVRG-3 y LVEC-2), probados con primers GVGF y GVGR (557 pb). (+) inserto: fragmento B del genoma de GRBV de un aislado, (+) GRBV: planta positiva a GRBV, (-) pGreen: plásmido pGreen vacío y control de agua. Se observa amplificación de banda esperada (557 pb) en los carriles 4 y 5, lo que confirma la clonación del fragmento B en plásmido pGreen de dos aislados.

Árbol fenético

Para hacer una aproximación de las distancias genéticas entre los aislados se realizó un árbol fenético (**Figura 24**) en el software FreeTree. Un árbol fenético permite observar las relaciones entre un grupo de organismos con base en su grado de similitud. Se realizaron 1000 árboles y se seleccionó el mejor árbol propuesto, los valores de bootstrap indican el nivel de confianza de cada nodo. El árbol fenético se realizó con los RFLP's de las enzimas AluI y EcoRI de ambas mitades del genoma, donde la presencia del corte se indicó con 1 y la ausencia del corte con 0 (ANEXO V).

Como controles se utilizaron ocho aislados de GRBV previamente reportados, 4 de ellos pertenecientes al Clado I y 4 pertenecientes al Clado II (**Figura 4**), utilizados previamente para la predicción de cortes *in silico*.

En el árbol fenético se observan dos grandes cladogramas (bootstrap = 100%), con subgrupos en cada uno de ellos. En el primer clado los aislados JCT, ONRB7 y los aislados bajacalifornianos del Grupo II se agrupan, con un valor de bootstrap de 53%. Los aislados del Grupo III y VIII no son tan lejanos genéticamente, de acuerdo al árbol fenético, con un valor de bootstrap de 69%, junto a estos aislados también se encuentra el Grupo IV. En otro de los subgrupos generados en el árbol fenético se

encuentra el Grupo VII, el aislado bajacaliforniano JGB y el Grupo IV. El grupo V pertenece a este clado, sin embargo no forma parte de ningún subgrupo.

En el segundo gran clado no se observan subgrupos tan claros, a excepción de los aislados CF214 y JRT456 que tienen una fuerte similitud. Dentro de este clado se encuentran los aislados de Canadá BCRB4, BCRB5 y el aislado NY135 de Nueva York. El único grupo de aislados bajacalifornianos que se agrupa en este clado es el Grupo I, sin embargo su ubicación respecto a los otros componentes del clado es muy incierta (bootstrap = 5%).

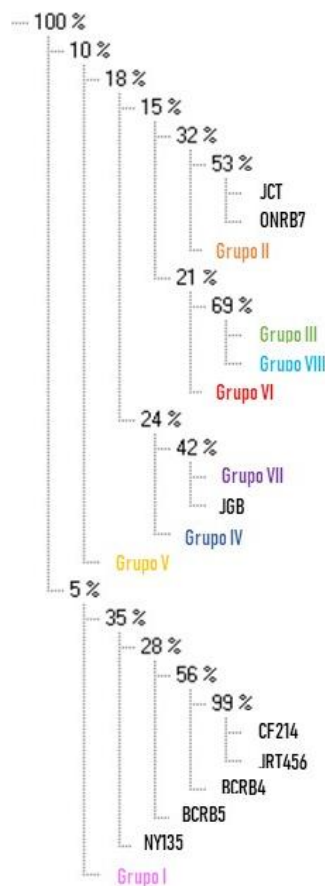


Figura 24: Árbol fenético de aislados bajacalifornianos. Árbol fenético realizado en FreeTree. Se utilizaron los patrones obtenidos con las enzimas AluI y EcoRI de ambas mitades del genoma. El árbol se realizó con el algoritmo UPGMA, valores de bootstrap de 1000 iteraciones. En colores se presentan los grupos de aislados bajacalifornianos, como controles se utilizaron 8 aislados de GRBV reportados.

Discusión

En el diagnóstico molecular de GRBV realizado por PCR, se obtuvieron resultados positivos para 21 muestras (**Figura 10**) de las 80 procesadas. Los síntomas que se tomaron en cuenta para la selección de las plantas muestreadas fueron manchas rojas en el margen y lámina de la hoja, así como enrojecimiento de venas primarias, secundarias y terciarias. Sin embargo, algunas de las muestras sintomáticas que no fueron positivas para GRBV podrían ser positivas para otros virus, como fue el caso del complejo viral GLRaV (Monroy-Corral et. al, sin publicar).

Por otra parte, los niveles de GRBV en la muestra pueden ser altamente variables, esto dependiendo del tipo de tejido que sea utilizado para realizar el diagnóstico, así como la etapa de crecimiento en la que se encuentre la planta. En un artículo publicado en el mes de noviembre del 2018 se demostró que utilizar tejido de las hojas más viejas o el peciolo puede disminuir el riesgo de falsos negativos en los diagnósticos (Setiono et. al, 2018), las muestras recolectadas para este estudio ya habían sido maceradas, en su mayoría tejido foliar, para futuros diagnósticos se recomienda tomar en cuenta lo recomendado por Setiono et. al.

Los síntomas de algunas plantas positivas para este geminivirus son similares a las reportadas en la literatura (Al Rwahnih et. al, 2013; Sudarshana et. al, 2015), sin embargo, algunos no son tan claros, por ejemplo manchas rojas como quemaduras, la nervadura central totalmente verde o la lámina de la hoja totalmente verde (**Figura 12**). Los síntomas de GRBV en algunas de las muestras pueden no ser tan evidentes debido a la fecha en que fueron recolectadas o la etapa fenológica en la que se encontraba la planta, por ello se resalta la importancia de realizar diagnóstico molecular.

Los ensayos para amplificar el genoma circular del virus GRBV por RCA no fueron exitosos. El ensayo con hexámeros al azar (usados en el laboratorio de Virología Agrícola para síntesis de cDNA) no dio resultado. La sensibilidad de las enzimas y el manejo de estas pudo haber sido un factor determinante para su funcionamiento adecuado.

Los RFLPs obtenidos con las enzimas de restricción AluI y EcoRI de los fragmentos A y B del genoma de GRBV de las 21 muestras positivas indican la presencia de 8 aislados diferentes que varían entre ellos en regiones puntuales del genoma resultando en diferentes fragmentos de restricción. Los patrones de restricción obtenidos para el aislado JGB coinciden con el número de cortes esperados de acuerdo a las predicciones realizadas *in silico* (**Tabla 1**), esto es de gran utilidad ya que funciona como control en los ensayos de restricción, además de que nos permite hacer una comparación más real con uno de los aislados previamente reportados para el estado de Baja California.

Los 8 aislados diferentes de GRBV se encuentran distribuidos en la región vinícola de Baja California. Los aislados de los grupos I, II y III se distribuyen principalmente en la región del Valle de Guadalupe, a excepción de LVRV-2 (grupo II) y LVRC-2 (grupo III) que se encuentran en la región de San Vicente. Los aislados LVRG-3, LVRG-1, LVMO-1 y LVEC-2, de los grupos IV a VII respectivamente se encuentran en la región del Valle de Guadalupe. LVLLC-1 miembro del grupo VIII se localiza en la región vinícola de San Vicente (**Figura 25**).

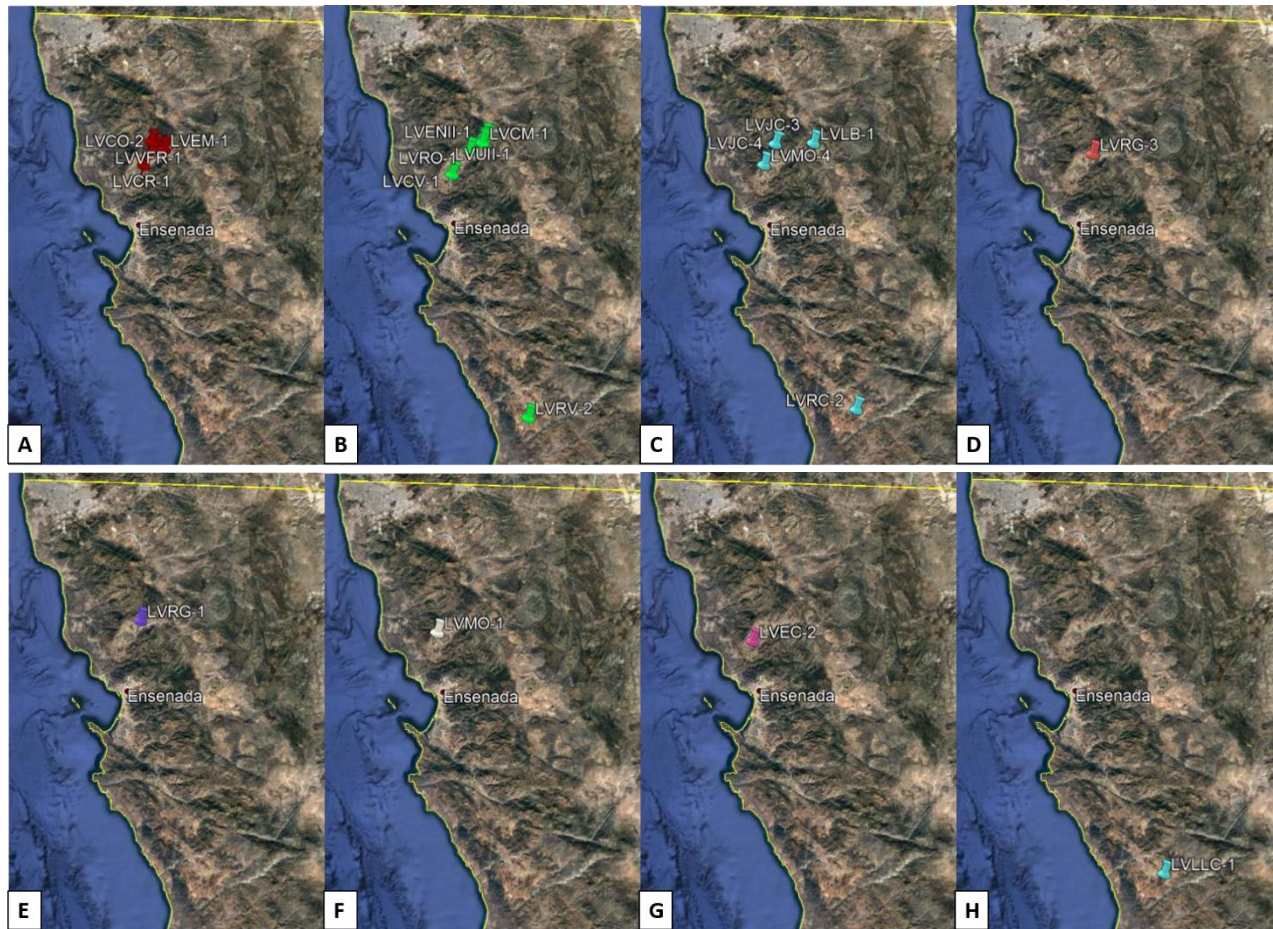


Figura 25: Distribución geográfica de 8 aislados de GRBV.

Distribución de las 21 muestras positivas de GRBV, 8 grupos de aislados. A: Aislados del grupo I. B: Aislados del grupo II. C: Aislados del grupo III. D: Aislados del grupo IV. E: Aislados del grupo V. F: Aislados del grupo VI. G: Aislados del grupo VII. H: Aislados del grupo VIII.

LVRV-2 y LVENII-1 aislados del grupo II fueron recolectados en viñedos con una distancia aproximada de 148 km entre ellos (**Figura 25 B**); que se trate del mismo aislado podría deberse a las prácticas culturales de los productores de la región, ya que es muy común compartir material vegetal propagativo, propiciando la dispersión del virus. Alternativamente, ambos productores adquirieron el material de un mismo origen.

En el grupo III, ocurre algo muy similar al ejemplo del grupo II, pues la distancia de recolección entre dos miembros de este grupo fue de 138 km aproximadamente (**Figura 25 C**), apoyando la hipótesis presentada previamente respecto a las prácticas culturales de los productores locales y la dispersión del virus.

LVEC-2 aislado único del grupo VII tiene una combinación de RFLPs similares a los reportados para Baja California y Canadá. Podría tratarse de una variante del virus de GRBV que fue importada de Europa y tiene el mismo origen genético de los aislados reportados en Canadá.

De los aislados bajacalifornianos encontrados gran parte de ellos pertenece a diferentes viñedos, sin embargo varios de los viñedos son del mismo dueño, esto apoyaría la hipótesis de que las prácticas culturales de compartir material propagativo han contribuido fuertemente a la dispersión del virus en el estado. Las muestras LVRG-1, -2 y -3 pertenecen al mismo viñedo, sin embargo los RFLPs indican que son diferentes aislados (**Figura 25D y E**). El aislado LVRG-3 es más similar a los reportados para Canadá, sin embargo el aislado LVRG-1 se parece más a un aislado reportado en California; podría tratarse de una variante de un aislado que ingresó por alguna planta o injerto importado de Canadá (LVRG-3) y de alguno proveniente de California (LVRG-1). Esto es una evidencia de las diferentes rutas de entrada del virus a Baja California. Es importante mencionar que la mayoría de los productores de vid en Baja California, Canadá y California compran material vegetativo en la misma región de Europa, por lo que podríamos estar hablando de un origen común del virus, sin embargo, es necesario realizar más análisis para comprobar o rechazar esta idea.

De acuerdo a los datos de RFLPs obtenidos con las enzimas de restricción AluI y EcoRI en ambas mitades del genoma se puede tener una idea inicial de la diversidad de aislados de GRBV que hay en los viñedos de Baja California. La mayor diversidad genética se observó en el fragmento B del genoma, en esta región se encuentra el ORF que codifica para la proteína de la cápside, lo que podría ser un factor importante en la adaptación del virus al hospedero, así como a las condiciones ambientales de Baja California. Es importante mencionar que en el fragmento B se encuentra la región intergénica mayor que incluye origen de replicación y secuencias reguladoras, además de un ORF (V1) del cual se desconoce su función y que también podrían jugar un papel en esta diversidad observada. Estos resultados resaltan la importancia de la caracterización molecular y biológica de los aislados geminivirales encontrados.

La mayoría de los aislados encontrados se parecen a uno de los aislados reportados en Canadá, sin embargo, la plantas que se importan a Baja California son provenientes de Francia. Se podría deducir que la entrada inicial de GRBV a Baja California fue por la importación de alguna plántula o injerto

infectado proveniente de Francia y posteriormente el virus mutó para adaptarse a los hospederos locales. Los grupos de investigación que más han descrito aislados de GRBV son de Canadá y EUA, por lo que los aislados de Canadá y de Baja California podrían tener a Francia como origen común.

Otra hipótesis de la diversidad de aislados de GRBV en Baja California es la posible recombinación entre algunos aislados provenientes de Francia y de California, esto explicaría la similitud de algunos aislados con los aislados de Canadá y California, como los del grupo I y III de este estudio. Además la recombinación entre aislados dentro del mismo viñedo pudo haber dado origen a nuevos aislados que se han adaptado a Baja California. Posiblemente la diversidad de variedades de vid en el estado ha contribuido a que la diversidad de aislados de GRBV sea alta, pues se identificó GRBV en al menos 9 variedades diferentes de vid (**Figura 12**).

El árbol fenético (**Figura 24**) realizado es una aproximación de la distancia genética entre los aislados de Baja California a partir de los RFLP's obtenidos. En el árbol se observan dos grandes clados filogenéticos con algunos subgrupos. Los aislados bajacalifornianos reportados previamente, JGB y JCT (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018) se agruparon en el primer clado junto con el aislado ONRB7 de Canadá, además la mayoría de los grupos de aislados reportados en este estudio pertenecen este clado, a excepción del Grupo I. Esta es una evidencia más de la similitud de los aislados bajacalifornianos con los aislados que se han reportado en Canadá y su posible origen común; además los subgrupos dentro del clado podrían explicar la diversidad genética y los cambios que han experimentado los aislados para adaptarse a los hospederos locales. La topología obtenida en el árbol fenético es similar a la del árbol filogenético de secuencias completas (**Figura 4**), con la excepción del aislado NY135 que en el árbol filogenético se agrupa con los aislados del Clado I y en este no. De acuerdo a estos resultados se podría concluir que la técnica de RFLP's-fenética es útil para realizar una buena aproximación. Sin embargo, para tener una imagen más precisa de la distancia y similitud genética de los aislados de GRBV encontrados es necesario realizar la secuenciación genómica de los aislados.

Las enzimas de restricción utilizadas para la caracterización de genomas (AluI y EcoRI) se seleccionaron de acuerdo a la predicción realizada *in silico*; con otras enzimas de restricción se pueden obtener patrones distintos de acuerdo al sitio de corte de cada una. Es importante resaltar que un nucleótido diferente en la secuencia del genoma puede modificar el patrón de corte. Los patrones de restricción que se obtengan con más enzimas de restricción podrían dar una caracterización de genomas más fina.

En geminivirus como CLCuKoV (cotton leaf curl Kokhran virus) y TYLCV (tomato yellow leaf curl virus) se ha visto una tasa de sustitución nucleotídica de 2.706×10^{-4} a 4.63×10^{-4} (sust/sitio/año) respectivamente, en el gen que codifica para la proteína de la cápside (Duffy y Holmes, 2008; Saleem et. al, 2016). La secuenciación de los diferentes aislados encontrados será de gran ayuda para confirmar que se trata de nuevos aislados, así como calcular la tasa de sustitución nucleotídica que nos permita entender la variabilidad genética y el origen de los mismos.

Para futuros trabajos se proyecta completar la información obtenida con la clonación de fragmentos A y B del genoma para su posterior secuenciación y caracterización biológica mediante clonas infectivas. Las clonas infectivas son herramientas moleculares que pueden ser modificadas con relativa facilidad, lo que permite realizar estudios para identificar las funciones genéticas de los genomas virales. Además, también pueden ser utilizadas para estudiar las interacciones virus-planta-vector.

La realización de este proyecto permitió tener un panorama inicial de la diversidad de aislados geminivirales en los viñedos de Baja California. En los mismos, aún no se ha reportado la presencia del alfarero tricornudo, vector de GRBV, sin embargo antes de que esto suceda es importante conocer los aislados geminivirales que se encuentran en los viñedos para poder tomar medidas de control y evitar la dispersión del virus.

Metodología

Muestreo

Tejido foliar de plantas con síntomas de enrojecimiento fueron localizadas y muestreadas (**Figura 26**) por colaboradores del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California (CESVBC). Un total de 80 muestras se recibieron en el laboratorio de Virología Agrícola de CICESE y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento. Los datos de cada muestra se vaciaron en una base de datos interna diseñada *exprofeso*, se le asignó un código de identificación a cada una de las muestras de acuerdo al lugar de recolección (ANEXO I).

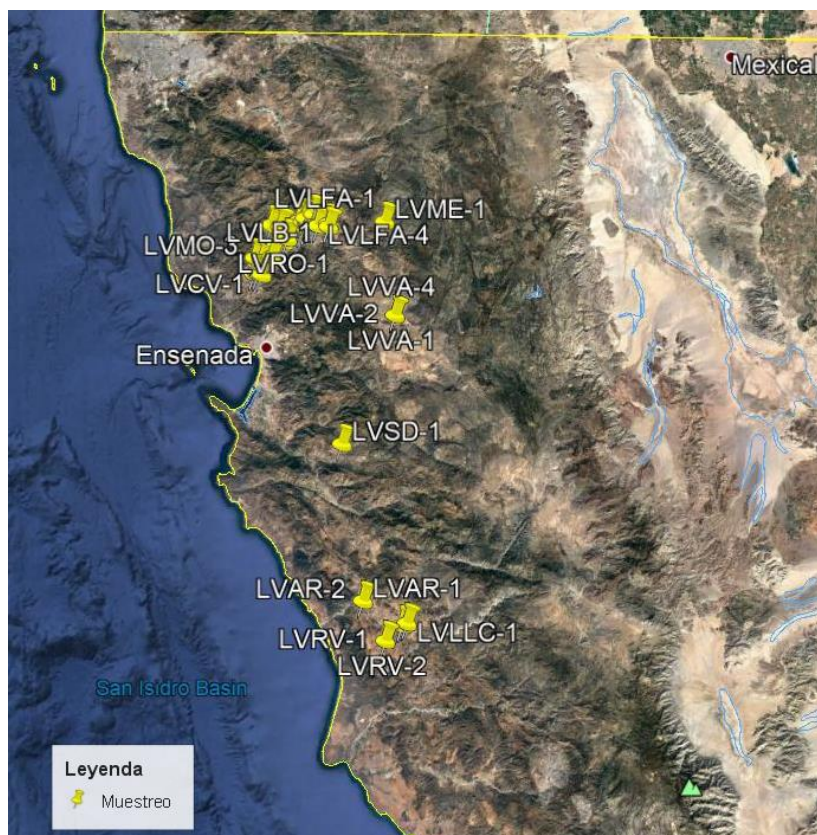


Figura 26: Mapa de muestreo en Baja California. Ochenta muestras de plantas con síntomas de enrojecimiento recolectadas. Realizado en Google Earth Pro.

Extracción de DNA

Las muestras de tejido foliar se pulverizaron en nitrógeno líquido de manera independiente; con excepción de algunas muestras (57-64, ANEXO I), las cuales se pulverizaron juntas y se usaron como una sola muestra de DNA. El tejido pulverizado se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de DNA.

Para la extracción de DNA genómico y geminiviral se utilizó un protocolo modificado de Lodhi et al, (1994). En un tubo de 2 ml se colocaron 30 mg de tejido foliar pulverizado, se añadieron 25 mg de PVP (polivinilpirrolidona) y 1 ml de buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, CTAB 2% (w/v) y β -mercaptoetanol 0.2%) se incubó durante 25 min a $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se enfrió a temperatura ambiente. Se añadieron 500 μl de cloroformo:octanol y se mezcló por inversión entre 20-25 veces. Se centrifugó a 6000 rpm por 15 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se añadieron 0.5 volúmenes de NaCl 5M y 1 volumen de etanol 96% frío. Se dejó precipitar durante 2 horas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min y posteriormente a 5000 rpm por 3 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con etanol 70% frío. Se secó la pastilla hasta eliminar completamente el etanol (Opcional: 5-10 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). La pastilla se disolvió en 80 μl de agua DEPC.

Finalmente se realizó un tratamiento con RNAsa A (1 μ l por cada 100 μ l de DNA), se incubó durante 15 min a 37 °C.

Para cuantificar y checar la calidad del DNA se utilizó un Nanodrop Lite (en la opción de análisis de dsDNA); cuando la concentración de DNA resultó > 100 ng/ μ l, fue necesario hacer una dilución para evitar que la reacción de PCR se inhibiera. Adicionalmente se verificó la calidad de DNA mediante electroforésis en gel de agarosa (0.8%).

Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó PCR con los primers 18S rRNA (producto esperado, 844 pb) como control interno (Gambino et. al, 2006) y para la detección de GRBV se utilizaron los primers GVGF y GVGR (producto esperado, 557 pb) (Al Rwahnih et. al, 2013). En algunos casos se utilizaron los primers CP (producto esperado, 257 pb) y Rep (producto esperado, 318 pb) reportados por Krenz et. al, 2014 (ANEXO II y ANEXO III).

Para la reacción de PCR se utilizaron dNTPs (0.1 mM, concentración final de la reacción), DreamTaq DNA polimerasa (0.025 U/ μ l) (Thermo Scientific), 1X del buffer de reacción de la enzima, 0.5 mM de cada primer y 1 μ l de DNA (<100 ng) en un volumen final de 10 μ l. Los productos de PCR se analizaron por electroforésis en gel de agarosa (2%) teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en un fotodocumentador con luz UV.

Amplificación de genomas circulares (RCA)

Para la amplificación de los genomas completos de las muestras positivas a GRBV se adaptó un protocolo de Knierim y Maiss, 2007. Se probaron 3 juegos de enzimas (pirofosfatasa y ϕ 29 DNA polimerasa) de diferentes fuentes (**Tabla 10**). Se utilizaron 2.5 μ l de DNA (< 100 ng), hexámeros al azar exo- resistentes (10 μ M, concentración final de la reacción), pirofosfatasa (0.025 U/ μ l), dNTPs (0.8 mM) y ϕ 29 DNA polimerasa (2.5 U/ μ l) en un volumen final de 25 μ l, la reacción se incubó 20 h a 30 °C y se inactivó la enzima a 65 °C por 10 min. Como control positivo de la reacción se utilizó DNA de tomate positivo para los geminivirus PHYVV y PepGMV. Los productos de RCA se analizaron por electroforésis en gel de agarosa (0.8%) teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en fotodocumentador.

Tabla 10: Matriz de combinación de enzimas utilizadas para la reacción de amplificación por círculo rodante.

Enzimas	Phi29 1	Phi29 2	Phi29 3
Pirofosfatasa 1	x	P3	P6
Pirofosfatasa 2	P1	P4	P7
Pirofosfatasa 3	P2	P5	P8

Adicionalmente se realizó una prueba en la que la única variable fueron los hexámeros. En una de las reacciones se utilizaron 2.5 µl de DNA (< 100 ng), hexámeros al azar exo- resistentes (10 µM, concentración final de la reacción), pirofosfatasa (0.025 U/µl) (Thermo Scientific), dNTPs (0.8 mM) y φ29 DNA polimerasa (2.5 U/µl) (Thermo Scientific) en un volumen final de 25 µl. En la otra reacción se utilizaron 0.5 µl de hexámeros al azar 600 µM, estos son utilizados comúnmente para la síntesis de cDNA.

Amplificación del genoma de GRBV en mitades

El genoma de los aislados de GRBV fue amplificado en dos fragmentos (A y B) mediante PCR de alta fidelidad, se utilizó la combinación de primers CPfor – Reprev (fragmento A, ~1.8 kb) y Repfor – CPrev (fragmento B, ~1.9 kb) (Krenz et. al, 2014; Gasperin-Bulbarela et. al, 2018). Se realizaron pruebas para estandarizar la técnica modificando el programa de PCR, así como la concentración de DNA en la reacción.

Para la reacción de PCR de alta fidelidad se utilizaron dNTPs (0.1 mM, concentración final de la reacción), Phusion DNA Polymerase (0.025 U/µl) (Thermo Scientific), 1X del buffer de la enzima, 0.5 mM de cada primer y 1 µl de DNA (<100 ng) en un volumen final de 10 µl. El programa de PCR utilizado para amplificar las mitades fue el de 30 ciclos (ANEXO IV). Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa (0.8%) teñido con bromuro de etidio y se visualizaron en fotodocumentador.

Patrones de restricción *in silico*

Para hacer una predicción de los patrones de restricción (restriction fragment length polymorphism, RFLPs) esperados en cada uno de los fragmentos (A y B) del genoma, así como determinar qué enzima de restricción de las que se encuentran disponibles en el laboratorio sería de mayor utilidad para identificar diferencias en los aislados, se tomaron 12 aislados de GRBV reportados: 2 aislados de Baja California (MH557096.1, MH557095.1), 3 aislados de Nueva York (JQ901105.2,

KF147917.1, KU564256.1), 4 aislados de Canadá (KY316025.1, KX234091.1, KX234092.1, KY426921.1), un aislado de California (NC_022002.1), un aislado de Washington (MF795175.1) y un aislado de Corea (KU821056.1). Se fragmentó el genoma en mitades, de acuerdo a la combinación de primers CPfor – Reprev (fragmento A, ~1.8 kb) y Repfor – CPrev (fragmento B, ~1.9 kb) en el software Unipro UGENE v1.31.1 (Okonechnikov et. al, 2012); posteriormente, con la herramienta NEBcutter V2.0 (Vincze et. al, 2003) se simuló la digestión de cada fragmento, se utilizaron las enzimas de restricción AluI, BstUI, EcoRI y NcoI.

Patrones de restricción de aislados bajacalifornianos

Las mitades A y B del genoma amplificadas por PCR de alta fidelidad fueron cortadas con las enzimas de restricción AluI FastDigest y EcoRI FastDigest (Thermo Fisher) para obtener los patrones de restricción (RFLPs).

Para la digestión de los fragmentos, se utilizó enzima de restricción (0.7 U/ μ l, concentración final de la reacción), buffer de reacción 10X y 7 μ l de DNA (producto de PCR de alta fidelidad) en un volumen final de 10 μ l. La reacción se incubó a 37 °C durante 2 horas y se verificó el patrón de corte mediante electroforesis en gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

Clonación de fragmento B de aislados de geminivirus locales

Para la transformación del plásmido pGreen, se realizó la preparación de células competentes para transformación de choque térmico de la cepa TOP10 de *Escherichia coli*. Un día previo a la preparación de las células competentes se dejaron crecer a 37 °C en 5 ml de medio LB líquido. Para comenzar la preparación de las células se incubaron en hielo durante 30 min, posteriormente se centrifugaron durante 10 min a 5000 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 50 ml de CaCl₂ 100 mM, se incubaron en hielo durante 45 min, se centrifugaron a 5000 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 ml de CaCl₂ 100 mM, 10% glicerol. Las células competentes se almacenaron a -20 °C.

Para la transformación de las células con el plásmido pGreen (3,232 pb) (Hellens et. al, 2000), las células competentes se descongelaron en hielo. A 100 μ l de células competentes se añadieron 10 μ l de plásmido pGreen y se incubaron en hielo durante 30 min. Para el choque térmico se incubaron a 42 °C durante 2 min y posteriormente se regresaron a hielo. Se incubaron a 37 °C durante 45 min en 1 ml de medio LB líquido, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante, se

resuspendió la pastilla en 100 µl de medio LB líquido y se plaqueó en cajas Petri con medio LB + kanamicina (50 µg/ml), se incubaron a 37 °C por 24 hrs. La transformación de las células competentes TOP10 con el plásmido pGreen se observó con el crecimiento de las colonias resistentes a kanamicina (**Figura 28**).

Para la extracción de plásmido por miniprep se utilizaron las soluciones para lisis alcalina del kit de extracción Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega). Se tomaron colonias con el plásmido pGreen y se colocaron en un tubo de 1.5 ml hasta formar una pequeña pastilla. Se añadieron 200 µl de solución de resuspensión celular y se mezcló con vórtex, posteriormente se añadieron 200 µl de solución de lisis celular y se mezcló por inversión, se añadieron 200 µl de solución neutralizadora y se colocó en hielo. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 min a 10 °C, se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se añadió 1 ml de isopropanol frío, se centrifugó 10 min a 14000 rpm y se decantó el sobrenadante. Se añadió un 1 ml de etanol 95% y se mezcló por inversión, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante, finalmente se dejó secar la pastilla y se disolvió en 50 µl de H₂O libre de nucleasas.

Para linearizar el plásmido pGreen se realizó la digestión con la enzima de restricción de corte único SmaI FastDigest (Thermo Fisher). Se tomaron 5 µl de DNA plasmídico, 2 µl de buffer de reacción 10X, 12 µl de agua y 1 µl de enzima SmaI, se incubó la reacción a 37 °C por 25 min. Se verificó la digestión del plásmido en gel de agarosa 0.9% teñido con SYBR Safe (**Figura 28**).



Figura 27: Colonias *E. coli* resistentes a kanamicina. Crecimiento de colonias de *E. coli* TOP10 resistentes a kanamicina en medio LB.

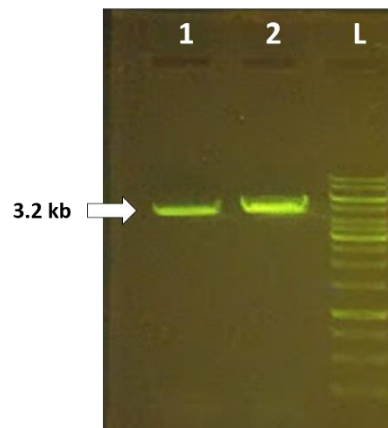


Figura 28: Linearización de plásmido pGreen. Gel de agarosa 1% teñido con SYBR Safe. L: Ladder O' Gene Ruler. Carriles 1 y 2 plásmido pGreen cortado con enzima de restricción SmaI.

Para la clonación de los fragmentos en el plásmido pGreen, se realizó la ligación del fragmento B con el plásmido linearizado. Para la reacción de ligación se utilizaron 2 µl de plásmido, 10 µl de inserto, 4 µl de buffer de reacción 5X y 1 µl de T4 DNA ligasa (5 U/µl) (Thermo Scientific) en un volumen final de 20 µl. La reacción se dejó incubar toda la noche a temperatura ambiente.

Para la transformación, las células competentes se descongelaron en hielo. A 100 µl de células competentes se añadieron 20 µl de la reacción de ligación y se incubaron en hielo durante 30 min. Para el choque térmico se incubaron a 42 °C durante 2 min y posteriormente se regresaron a hielo. Se incubaron a 37 °C durante 45 min en 1 ml de medio LB líquido, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 100 µl de medio LB líquido. Se plaqueó en cajas Petri con medio LB + kanamicina (50 µg/ml) + Xgal (50 µg/ml) e IPTG (200 µM), se incubaron a 37 °C por 24 hrs. Se seleccionaron las colonias blancas obtenidas y se estriaron en cajas Petri con medio LB + kanamicina (50 µg/ml) + Xgal (50 µg/ml) e IPTG (200 µM). Se incubaron a 37 °C por 24 hrs. Se realizó la extracción de DNA plasmídico por miniprep como fue descrito previamente.

Para confirmar la clonación, se realizó PCR con los primers GVGR y GVGF (producto esperado, 557 pb) propuestos por Al Rwahnih et. al, (2013), el programa de amplificación utilizado fue el descrito en el ANEXO III.

Árbol fenético

Para hacer una aproximación de las distancias genéticas y la similitud de los aislados de GRBV encontrados en los viñedos de Baja California se realizó un árbol fenético.

Los datos de RFLP's obtenidos con ambas enzimas de restricción (AluI y EcoRI) en ambas mitades del genoma de GRBV se vaciaron en una matriz binaria (ANEXO V). El árbol fenético se realizó en el programa Free Tree (Hamp et. al, 2001), la matriz de distancia/similitud se realizó mediante el algoritmo de Nei y Li / Dice y el algoritmo para la construcción del árbol fue UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages). Se realizaron 1000 iteraciones y se seleccionó el mejor árbol propuesto.

Referencias

1. Al Rwahnih M, Dave A, Anderson M, Rowhani A, Uyemoto, J, Sudarshana M (2013) Association of a DNA Virus with Grapevines Affected by Red Blotch Disease in California. *Phytopathology* 103(10):1069–1076.
2. Al Rwahnih M, Alabi OJ, Westrick NM, Golino D, Rowhani A (2017) Description of a Novel Monopartite Geminivirus and Its Defective Subviral Genome in Grapevine. *Phytopathology* 107(2):240–251.
3. Ali MM, et al. (2014) Rolling circle amplification: A versatile tool for chemical biology, materials science and medicine. *Chem Soc Rev*. doi:10.1039/c3cs60439j.
4. Almanza-Merchán PJ (2011) Determinación del crecimiento y desarrollo del fruto de vid (*Vitis vinifera* L.) bajo condiciones de clima frío tropical. *Esc Posgrados*. doi:10.13140/RG.2.1.4606.4485.
5. Asensio M (2000) Caracterización de variedades de *Vitis vinifera* L. cultivadas en Extremadura, mediante estudios morfológicos, agronómicos y bioquímicos. *Tesis de doctorado*. Universidad Politécnica de Madrid.
6. Bahder BW, Zalom FG, Jayanth M, Sudarshana MR (2016) Phylogeny of Geminivirus Coat Protein Sequences and Digital PCR Aid in Identifying *Spissistilus festinus* as a Vector of Grapevine red blotch-associated virus. *Phytopathology*. doi:10.1094/PHYTO-03-16-0125-FI.
7. Baltimore D (1971) Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev*.
8. Breitbart M, Rohwer, F (2005) Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol* 13(6):278-284. doi:10.1016/j.tim.2005.04.003.
9. Boulton MI (2008) Construction of infectious clones for DNA viruses: Mastreviruses. *Methods Mol Biol*. doi:10.1007/978-1-59745-102-4_34.
10. Caetano-Anollés D (2013) Polymerase Chain Reaction. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01186-4.
11. Calvi BL (2011) Effects Of Red-leaf Disease On Cabernet Sauvignon At The Oakville Experimental Vineyard And Mitigation By Harvest Delay And Crop Adjustment. *MSc. Thesis. University of California*.
12. CESVBC (2018) Programa de trabajo de la campaña contra piojo harinoso de la vid. Reporte interno.
13. Creasy GL, Creasy LL (2009) *Grapes*.
14. Díaz-Muñoz SL (2017) Viral coinfection is shaped by host ecology and virus–virus interactions across diverse microbial taxa and environments. *Virus Evol*. doi:10.1093/ve/vex011.
15. Duffy S, Holmes EC (2008) Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *J Virol*. doi:10.1128/jvi.01929-07.
16. Flores M (2015) Evaluación de variedades de vid (*Vitis vinifera* L.) y fuentes de fertilización en la producción de hoja para consumo humano. *Tesis de Doctorado*. Universidad Autónoma de Nuevo León.
17. Fuchs M, Perry KL, Golino DA (2016) Biology and spread of grapevine red blotch-associated virus. *Proc. Pierce's Disease Symposium. California Department of Food and Agriculture, December 14, San Diego, CA*.
18. Franks T, Botta R, Thomas MR, Franks J (2002) Chimerism in grapevines: Implications for cultivar identity, ancestry and genetic improvement. *Theor Appl Genet*. doi:10.1007/s001220100683.
19. Gaeta A (2006) Productividad de la vid en función del aprovechamiento de agua subterránea en el Valle de Guadalupe 1994-2004. *Tesis de Maestría*. El Colegio de la Frontera Norte, Tijuana B.C.

20. Gambino G, Gribaudo I (2006) Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control. *Phytopathology* 96(11):1223–1229.
21. Garcia-Ruiz H (2019) Host factors against plant viruses. *Mol Plant Pathol* 0(0). doi:10.1111/mpp.12851.
22. Gasperin-Bulbarela J, Licea-Navarro AF, Pino-Villar C, Hernandez-Martinez R, Carrillo-Tripp J (2018) First report of grapevine red blotch virus in Mexico. *Plant Dis*. doi:10.1094/PDIS-07-18-1227-PDN.
23. Gonzales-Andrade S, Fuentes-Flores NA (2013) Matriz de insumo-producto vitivinícola de Baja California, México. *Rev Econ XXX*(81):57–88.
24. Grimes DJ (2006) Koch's Postulates — Then and Now. *Microbe Mag*. doi:10.1128/microbe.1.223.1.
25. Gutierrez C (1999) Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s000180050433.
26. Hanley-Bowdoin L, Settlege SB, Orozco BM, Nagar S, Robertson D (1999) Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *CRC Crit Rev Plant Sci* 18(1):71-106. doi:10.1016/S0735-2689(99)00383-4.
27. Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S (2013) Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nat Rev Microbiol* 11:777.
28. Hampl V, Pavlíček A, Flegr J (2001) Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program FreeTree: Application to trichomonad parasites. *Int J Syst Evol Microbiol*. doi:10.1099/00207713-51-3-731.
29. Hellens RP, Anne Edwards E, Leyland NR, Bean S, Mullineaux PM (2000) pGreen: A versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol*. doi:10.1023/A:1006496308160.
30. Hesketh EL, et al. (2018) The 3.3 Å structure of a plant geminivirus using cryo-EM. *Nat Commun*. doi:10.1038/s41467-018-04793-6.
31. Hull R (2009) *Comparative Plant Virology*. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
32. Johne R, Müller H, Rector A, van Ranst M, Stevens H (2009) Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol*. doi:10.1016/j.tim.2009.02.004.
33. Knierim D, Maiss E (2007) Application of Phi29 DNA polymerase in identification and full-length clone inoculation of tomato yellow leaf curl Thailand virus and tobacco leaf curl Thailand virus. *Arch Virol*. doi:10.1007/s00705-006-0914-9.
34. Komínek P, Glasa M, Komínková M (2009) Analysis of multiple virus-infected grapevine plant reveals persistence but uneven virus distribution. *Acta Virol* 53(4):281–285. doi:10.4149/av-2009-04-281
35. Krenz B, Thompson JR, Fuchs M, Perry KL (2012) Complete Genome Sequence of a New Circular DNA Virus from Grapevine. *J Virol* 86(14):7715–7715.
36. Krenz B, Thompson JR, McLane H, Fuchs M, Perry KL (2014) Grapevine red blotch-associated virus is widespread in the United States. *Phytopathol* 104:1232–1240. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-14-0053-R>
37. Lewsey M, Palukaitis P, Carr JP (2009) Plant-Virus Interactions: Defence and Counter-Defence. *Annual Plant Reviews, Molecular Aspects of Plant Disease Resistance* doi:10.1002/9781444301441.ch6.
38. Lodhi M, Ye G-N, Weeden N, Reisch B (1994) A Simple and Efficient Method for DNA Extraction from Grapevine Cultivars, Vitis Species and Ampelopsis. *Plant Mol Biol Report* 12(1):6–13.
39. Mahmoudabadi G, Phillips R (2018) A comprehensive and quantitative exploration of thousands of viral genomes. *Elife*. doi:10.7554/eLife.31955.
40. Martos S (2008) El decaimiento de la vid, enfermedades de la madera relacionadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae. *Tesis de doctorado*. Universidad Autónoma de Barcelona.

41. Meraz L, Valderrama J, Maldonado S (2012) La ruta del vino en el Valle de Guadalupe, Baja California, México. Perspectiva frente al cambio climático: Una primera aproximación. *Globalización y agricultura. Nuevas perspectivas en la sociología rural*.
42. Mullins MG, Bouquet A, Williams LE (1992) *Biology of the grapevine* doi:10.1007/978-94-017-2308-4_13.
43. Nelson JR, et al. (2002) TempliPhi, ϕ 29 DNA polymerase based rolling circle amplification of templates for DNA sequencing. *Biotechniques*.
44. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS) (2011). Estudio estadístico sobre producción de uva en Baja California. *Secretaría de Fomento Agropecuario*.
45. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS) (2011). Análisis estadístico de las precipitaciones en la zona costa con datos de SIMARBC. *Secretaría de Fomento Agropecuario*
46. Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable (OEIDRUS) (2016). Ficha técnica Uva. *Secretaría de Fomento Agropecuario*.
47. Okonechnikov K, et al. (2012) Unipro UGENE: A unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. doi:10.1093/bioinformatics/bts091.
48. Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. (2017). Aspectos de la coyuntura mundial, Abril 2017.
49. Poojari S, Alabi OJ, Fofanov VY, Naidu RA (2013) A Leafhopper-Transmissible DNA Virus with Novel Evolutionary Lineage in the Family Geminiviridae Implicated in Grapevine Redleaf Disease by Next- Generation Sequencing. 8(6). doi:10.1371/journal.pone.0064194.
50. Poojari S, Lowery DT, Rott M, Schmidt AM (2017) Incidence , distribution and genetic diversity of Grapevine red blotch virus in British Columbia. *Can J Plant Pathol* 0(0). doi:10.1080/07060661.2017.1312532.
51. Ricketts KD, et al. (2017) Mitigating the economic impact of grapevine red blotch: Optimizing disease management strategies in U.S. vineyards. *Am J Enol Vitic* 68(1):127–135.
52. SAGARPA (2016). Uva mexicana. *Planeación agrícola nacional 2017-2030*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
53. Saleem H, et al. (2016) Diversity, mutation and recombination analysis of cotton leaf curl geminiviruses. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0151161.
54. Setiono FJ, Chatterjee D, Fuchs M, Perry KL, Thompson JR (2018) The distribution and detection of grapevine red blotch virus in its host depends on time of sampling and tissue type. *Plant Dis* 10(November):PDIS-03-18-0450-RE.
55. Sharma N, Ruhel R (2019) Rolling Circle Replication and Transcription Processes in Geminiviruses BT - Geminiviruses: Impact, Challenges and Approaches. ed Kumar RV (Springer International Publishing, Cham), pp 17–38.
56. Sudarshana MR, Perry KL, Fuchs MF (2015) Grapevine Red Blotch-Associated Virus, an Emerging Threat to the Grapevine Industry. *Phytopathology*. doi:10.1094/PHYTO-12-14-0369-FI.
57. This P, Lacombe T, Thomas MR (2006) Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet* 22(9):511–519.
58. Varma A, Malathi VG (2003) Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Ann Appl Biol* 142(2):145–164. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2003.tb00240.x>
59. Varsani A, et al. (2017) Capulavirus and Grablovirus: two new genera in the family Geminiviridae. *Arch Virol* 162(6):1819–1831. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3268-6>
60. Vázquez N (2011), Asociación agrícola de productores de uva de mesa, modelo de la agricultura moderna en México en el siglo XXI. *Programa elaboración de casos de éxito de innovación en el sector agroalimentario*.
61. Velásquez-Valle R, Galindo-Reyes M, González-Gaona E, Reveles-Torres L (2013) Presencia y manejo de los virus hoja de abanico y enrollamiento de la hoja en viñedos de

Aguascalientes. *Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias*. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

62. Vincze T, Posfai J, Roberts RJ (2003) NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkg526..
63. Yepes LM, Cieniewicz E, Krenz B, McLane H, Thompson J, Perry KL, Fuchs M (2018) Causative Role of Grapevine Red Blotch Virus in Red Blotch Disease. *Phytopathology* 108(7):902–909.
64. Zúñiga-Vega C, Ramírez P (2001) Los geminivirus, patógenos de importancia mundial. *J Biol Chem* (64):25–33.

ANEXO I

Datos de 80 muestras utilizadas para diagnóstico de geminivirus y de controles negativos utilizados (81 - 83). Los datos de recolección de las muestras utilizadas (viñedo y coordenadas) no se publican por cuestiones de confidencialidad de los dueños de los viñedos.

Registro	# Extracción DNA	Fecha de recolección	Código	Variedad
1	1	07/08/2018	LVLT-1	Uva de mesa
2	2	07/08/2018	LVEG-1	Merlot
3	3	07/08/2018	LVEG-2	Malbec
4	4	08/08/2018	LVEM-1	Sauvignon Blanc
5	5	08/08/2018	LVEM-2	Sauvignon Blanc
6	6	08/08/2018	LVEM-3	Chardonnay
7	7	08/08/2018	LVDE-1	Nebbiolo
8	8	08/08/2018	LVUA-1	Tempranillo
9	9	08/08/2018	LVUB-1	Tempranillo
10	10	09/08/2018	LVCSA-1	Petit Verdot
11	11	09/08/2018	LVCSA-2	Chardonnay
12	12	09/08/2018	LVCSA-3	Chardonnay
13	13	09/08/2018	LVUII-1	-
14	14	09/08/2018	LVAH-1	Cabernet Sauvignon
15	15	09/08/2018	LVUII-2	Tempranillo
16	16	10/08/2018	LVME-1	Merlot
17	17	10/08/2018	LVLFA-1	Chardonnay
18	18	10/08/2018	LVLB-1	Petit Verdot
19	19	10/08/2018	LVEN-1	Viognier
20	20	10/08/2018	LVGO-1	-
21	21	06/08/2018	LVRC-1	-
22	22	06/08/2018	LVRC-2	Thompson
23	23	06/08/2018	LVLLC-2	Nebbiolo
24	24	06/08/2018	LVLLC-1	Nebbiolo
25	25	06/08/2018	LVRDO-1	Ascopa
26	26	06/08/2018	LVRV-1	Nebbiolo
27	27	07/08/2018	LVRV-2	Nebbiolo
28	28	07/08/2018	LVAR-2	-
29	29	07/08/2018	LVAR-1	Nebbiolo
30	30	08/08/2018	LVSD-1	Nebbiolo
31	31	07/08/2018	LVRG-3	Zinfandel
32	32	07/08/2018	LVRG-1	Zinfandel
33	33	07/08/2018	LVRG-2	Nebbiolo
34	34	07/08/2018	LVRO-1	Cabernet
35	35	07/08/2018	LVRD-1	Nebbiolo
36	36	08/08/2018	LVCV-1	Sauvignon Blanc
37	37	08/08/2018	LVCR-1	Malbec
38	38	08/08/2018	LVEC-2	Zinfandel

39	39	08/08/2018	LVEC -1	Gamay	
40	40	08/08/2018	LVDT-1	Grenache	
41	41	09/08/2018	LVCC-1	Merlot	
42	42	24/08/2018	LVOSA-1	Tempranillo	
43	43	15/08/2018	LVCM-1	Grenache	
44	44	15/10/2018	LVLFA-2	-	
45	45	15/10/2018	LVLFA-3	-	
46	46	15/10/2018	LVCSA-4	-	
47	47	15/10/2018	LVCSA-5	-	
48	48	15/10/2018	LVLFA-4	-	
49	49	15/10/2018	LVCSA-6	-	
50	50	22/10/2018	LVENII-1	Nebbiolo	
51	51	29/10/2018	LVEC-3	Gamay	
52	52	30/10/2018	LVVA-1	P. Syrah	
53	53	05/11/2018	LVVA-2	-	
54	54	05/11/2018	LVVA-3	-	
55	55	05/11/2018	LVVA-4	-	
56	56	18/06/2018	LVGO-1	-	
57	57	58	28/06/2018	LVGO-2	-
58			28/06/2018	LVGO-3	-
59	59	60	28/06/2018	LVGO-4	-
60			28/06/2018	LVGO-5	-
61	61		28/06/2018	LVGO-6	-
62			28/06/2018	LVGO-7	-
63	62		28/06/2018	LVJC-1	Uva de temporal
64			28/06/2018	LVJC-2	Uva de temporal
65	63		28/06/2018	LVJC-3	Uva de temporal
66	64		28/06/2018	LVJC-4	Uva de temporal
67	65		18/06/2018	LVCO-1	-
68	66		18/06/2018	LVCO-2	-
69	67		28/06/2018	LVMO-1	Uva de mesa
70	68		28/06/2018	LVMO-3	Uva de mesa
71	69		28/06/2018	LVMO-4	Uva de mesa
72	70		06/07/2018	LVFA21-1	Chardonnay
73	71		20/06/2018	LVVR1-1	Nebbiolo
74	72		07/08/2018	LVYA-1	Crimson
75	73		08/08/2018	LVYA-2	Tempranillo
76	74		08/08/2018	LVSA-1	Chardonnay
77	75		08/08/2018	LVLA-1	Mision
78	76		09/08/2018	LVRF-1	Merlot
79	77		09/08/2018	LVVFR-1	-
80	CN1		10/08/2018	CN1	Sauvignon Blanc
81	CN2		10/08/2018	CN2	Nebbiolo
82	CN3		10/08/2018	CN3	Merlot

ANEXO II

Primers utilizados para amplificación de fragmentos del genoma de GRBV.

Primer	Secuencia 5'-3'	Tamaño de fragmento	Referencia
16Sfor	TGCTTAACACATGCAAGTCGGA	105 pb	Krenz et. al, 2014
16Srev	AGCCGTTTCCAGCTGTTGTTC		
CPfor	AGCGGAAGCATGATTGAGACATTGACG	257 pb	
CPrev	AACGTATGTCCACTTGCAGAAGCCGC		
Repfor	CAAGTCGTTGTAGATTGAGGACGTATTGG	318 pb	
Reprev	AGCCACACCTACACGCCTTGCTCATC		
18Sfor	CGCATCATTCAAATTTCTGC	844 pb	Gambino y Gribaudo, 2006
18Srev	TTCAGCCTTGCGACCATACT		
GVGF1	CTCGTCGCATTTGTAAGA	557 pb	Al Rwahnih et. al, 2013
GVGR1	ACTGACAAGGCCTACTACG		

ANEXO III

Programas de PCR utilizados para amplificación de fragmentos del genoma de GRBV o controles internos de la planta.

Programa de amplificación para 16S, CP y Rep (Krenz et. al, 2014)

Tapa		100° C		
40 ciclos	Inicio	95° C	3 min	
	Desnaturalización	95° C	15 seg	
		Alineamiento	55° C	15 seg
			Elongación	72° C
		Extensión	72° C	1 min
Conservar		12° C		

Programa de amplificación para 18S (Gambino & Gribaudo, 2006)

		Tapa	100° C
40 ciclos	{	Inicio	94° C 4 min
		Desnaturalización	94° C 30 seg
		Alineamiento	58° C 30 seg
		Elongación	72° C 1 min
		Extensión	72° C 1 min
		Conservar	12° C

Programa de amplificación para GVGF1 y GVGR1 (Al Rwahnih et. al, 2013)

		Tapa	100° C
40 ciclos	{	Inicio	94° C 2 min
		Desnaturalización	94° C 30 seg
		Alineamiento	55° C 30 seg
		Elongación	72° C 1 min
		Extensión	72° C 5 min
		Conservar	12° C

ANEXO IV

Programas de PCR-High Fidelity utilizados para amplificación de genoma viral en dos fragmentos.

1.-

Programa de amplificación para CPfor-RepPrev y Repfor-CPPrev (Gasparin-Bulbarela et. al, 2018)

		Tapa	100° C
40 ciclos	{	Inicio	98° C 30 seg
		Desnaturalización	98° C 10 seg
		Alineamiento y elongación	72° C 1 min
		Extensión	72° C 10 min
		Conservar	12° C

2.-

Programa de amplificación para CPfor-Repv y Repfor-CPv (Gasperin-Bulbarela et. al, 2018)

Tapa		100° C	
30 ciclos	Inicio	98° C	30 seg
	Desnaturalización	98° C	10 seg
	Alineamiento y elongación	72° C	1 min
	Extensión	72° C	10 min
Conservar		12° C	

ANEXO V

Matriz de datos utilizados para generación del árbol fenético.

Tamaño (pb)	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Grupo VIII	JGB	JCT	CF214	ONRB7	NY135	JRT456	BCRB4	BCRB5
1800	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1
1450	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1300	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
830	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
750	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0
700	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
670	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
660	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
630	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
501	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
500	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1
470	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
450	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
440	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0
380	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
350	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
231	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
230	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
200	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0
170	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
160	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1
91	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
90	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
61	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
60	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0