



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

# **Búsqueda y caracterización de promotores de begomovirus endémicos de Colombia con potencial biotecnológico**

**Viviana Catalina Corredor Sáenz**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Palmira, Valle del Cauca, Colombia

2018

# **Búsqueda y caracterización de promotores de begomovirus endémicos de Colombia con potencial biotecnológico**

**Viviana Catalina Corredor Sáenz**

Tesis como requisito parcial para optar al título de:  
Magister en Ciencias Biológicas  
Línea de investigación: Biotecnología Vegetal

Director (a):  
Juan Carlos Vaca-Vaca, Biol. MSc-PhD

Codirector (a):  
Karina López-López, Ing.Bioq. PhD

Grupo de Investigación IPMA Interacción Planta- Microorganismo- Ambiente

Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Palmira, Valle del Cauca, Colombia

2018

*A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.*

*A mis padres por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.*

*Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.*

*A mi hermana por su cariño y apoyo incondicional, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias.*

*Intenta no volverte un hombre de éxito, sino volverte un hombre de valor.*

*Albert Einstein*

## **Agradecimientos**

Este proyecto es el resultado del esfuerzo conjunto de todos los que formamos el grupo de trabajo. Agradezco infinitamente al Dr. Juan Carlos Vaca Vaca y a la Dra. Karina López López, por permitirme formarme como investigadora a través de la vinculación a su grupo de investigación Interacción Planta- Microorganismo- Ambiente (IPMA), por sus valiosas enseñanzas, consejos y constante apoyo para el desarrollo de mi trabajo investigativo y formación personal.

A la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira (DIPAL) por la financiación del proyecto titulado “CARACTERIZACIÓN Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN TEJIDO ESPECÍFICO DE UN PROMOTOR GEMINIVIRAL DERIVADO DE PYMV CON POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO”. Código HERMES 31923, el cual hace parte de este trabajo de investigación.

Al Sistema Nacional de Regalias del Valle del Cauca, al Centro de Investigación e Innovación en Bioinformática y Fotónica (CIBioFi), a la empresa Hugo Restrepo y Cia SA por la financiación del Macroproyecto titulado “IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA CON BASE MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE PLAGAS EN DIFERENTES CULTIVOS PRIORITARIOS DE CLASE MUNDIAL PARA CONTRIBUIR AL DISEÑO DE PLANES INTEGRADOS DE MANEJO” código Quipo 20101001663, el cual hace parte de este trabajo de investigación.

A mi papá Filemón Corredor, mi mamá Elizabeth Sáenz, quienes inculcaron en mí el valor de la educación y me permitieron llegar a esta instancia gracias por ser un apoyo incondicional durante el desarrollo de esta Maestría. A mi hermana Soranny Corredor por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuesta a ayudarme y escucharme en todo momento.

A mis amigos de laboratorio Dyanela Betancourt, Jonathan Morales, Diana Rivera, Camila Montenegro, Andrea Corredor, Emerson Carrasco, Frenyiline Jara, Alexandra García, por la amistad que hemos construido y la colaboración recibida en el desarrollo de esta investigación

A Luis Fernando Ospina Cardona por su gran apoyo, su paciencia, por creer en mí en todo momento y no dudar de mis habilidades. Infinitas gracias Vida.

A mi amiga Diana Carolina Ramírez quien a pesar de la distancia siempre fue un apoyo fundamental para la culminación de esta tesis

A la señora Nubia Rodríguez, por su amistad, apoyo, y colaboración para realizar las diferentes actividades en el laboratorio.

A mi gran amigo Luis Fernando Saldarriaga, por su colaboración en las diferentes actividades realizadas en el laboratorio de Cultivo de Tejidos además de su valiosa amistad.

## Resumen

Los begomovirus tienen genoma de DNA circular cadena sencilla, son transmitidos por mosca blanca *Bemisia tabaci* y afectan plantas dicotiledóneas de importancia económica. Las regiones promotoras de éstos virus fusionados a genes reporteros han mostrado una fuerte expresión tejido-específica en mesófilo y tejido vascular vegetal, lo que los convierte en excelente fuente de promotores que permitan la expresión biotecnológica diferencial de proteínas en plantas. El objetivo del presente trabajo fue buscar y caracterizar a nivel molecular, *in silico* y biológico la región promotora del gen de la proteína de la cápside (AR1) de begomovirus endémicos de Colombia con potencial biotecnológico. Se colectaron arvenses y se detectó por PCR la presencia de begomovirus. Se clonaron, secuenciaron y analizaron con herramientas bioinformáticas fragmentos virales que portan la región promotora del gen AR1. Finalmente, mediante ensayos de expresión transitoria sobre hojas de tabaco, se evaluó la expresión del promotor del gen AR1 del virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV) en presencia y ausencia de un transactivador (TrAp). Se detectó la presencia de begomovirus en 19 arvenses, de las cuales, *Sida acuta* y *Acalypha* sp, constituyen un reporte nuevo a nivel de Colombia y Latinoamérica como hospedero begomoviral. Se identificaron dos nuevos begomovirus aislados de las arvenses *Rivina humilis* y *Malvastrum* sp. El análisis de las regiones promotoras de AR1 de los begomovirus aislados de arvenses y PYMV permitió identificar 12 elementos *cis* regulatorios: Cajas I, Cajas P, cajas G, cajas W, elemento C-Repeat-DRE, elemento ABRE, elemento ERE, elemento TGACG, elemento AS-1, motivo TCT, motivo TGA y CLEs. La organización de éstos elementos *cis* regulatorios podría explicar la regulación en el tropismo de tejido observado en el gen AR1 de PYMV, la cual es específica de mesófilo y en presencia de su propia fuente de TrAP este es capaz de invadir células vasculares.

**Palabras clave:** Arvenses, begomovirus, biobalística, expresión transitoria, promotores, PYMV, transactivación homóloga

# Abstract

Begomoviruses have a single-stranded circular DNA genome, are transmitted by whitefly *Bemisia tabaci* and affect dicotyledonous plants of economic importance. The promoter regions of these viruses fused to reporter genes have shown strong tissue-specific expression in mesophyll and vascular plant tissue, which makes them an excellent source of promoters that allow the differential biotechnological expression of proteins in plants. The objective of the present work was to search and characterize at the molecular, in silico and biological level the promoter region of the capsid protein gene (AR1) of Colombian endemic begomoviruses with biotechnological potential. Weeds were collected and the presence of begomovirus was detected by PCR. Viral fragments carrying the promoter region of the AR1 gene were cloned, sequenced and analyzed with bioinformatics tools. Finally, through transient expression assays on tobacco leaves, the expression of the promoter of the AR1 gene of potato yellow mosaic virus (PYMV) was evaluated in the presence and absence of a transactivator (TrAp). The presence of begomovirus was detected in 19 weeds, of which, *Sida acuta* and *Acalypha* sp, a new level of Colombia and Latin America was reported as a begomoviral host. Two new begomoviruses was isolated from the weeds *Rivina humilis* and *Malvastrum* sp. The analysis of the AR1 promoter regions of the begomoviruses isolated from weeds and PYMV allowed the identification of 12 cis regulatory elements: Boxes I, Boxes P, Boxes G, Boxes W, element C-Repeat-DRE, element ABRE, Element ERE, element TGACG, element AS-1, motif TCT, motif TGA and CLEs. The organization of these cis regulatory elements could explain the regulation in tissue tropism observed in the AR1 gene of PYMV, which is mesophilic specific and in the presence of its own source of TrAP it is capable of invading vascular cells.

**Keywords:** Weeds, Begomovirus, Biolistic, Promoters, PYMV, Transient Expression, homologous transactivation

# Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b> .....	VII
<b>Lista de figuras</b> .....	XIV
<b>Lista de tablas</b> .....	XVI
<b>Lista de símbolos y abreviaturas</b> .....	XVII
<b>Introducción</b>	1
<b>1 Marco teórico</b> .....	<b>5</b>
1.1 Generalidades de geminivirus .....	5
1.2 Género Begomovirus .....	7
1.2.1 Organización genómica de los Begomovirus bipartitas. ....	8
1.2.2 Mecanismo de replicación de los Begomovirus .....	11
1.2.3 Ciclo infectivo de los Begomovirus .....	13
1.2.4 Tropismo de la infección por Begomovirus .....	14
1.3 Mecanismos que generan la diversidad genética de los begomovirus en nuevos hospederos.....	16
1.3.1 Mutación .....	16
1.3.2 Recombinación .....	17
1.3.3 Pseudorecombinación.....	17
1.4 Infecciones Mixtas.....	19
1.5 Begomovirus en Colombia .....	20
1.5.1 Virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV).....	22
1.6 Arvenses como reservorios de Begomovirus.....	23
1.7 Los begomovirus como herramientas biotecnológicas.....	25
1.7.1 Promotores y elementos <i>cis</i> -regulatorios en aplicaciones biotecnológicas. 26	
1.7.2 Expresión transitoria de genes virales.....	28
1.7.3 VIGS (silenciamiento génico inducido por virus) uso de begomovirus.....	31
1.7.4 Expresión de proteínas – vectores de expresión Geminiviral. ....	35
<b>2 Capítulo 1. Diversidad genética de Begomovirus presentes en arvenses asociadas al cultivo de ají en Valle del Cauca</b> .....	<b>53</b>
2.1 Materiales y métodos .....	54
2.1.1 Área de estudio .....	54



2.1.2	Colecta de arvenses e Identificación taxonómica.....	55
2.1.3	Extracción de DNA genómico total.....	55
2.1.4	Detección de Begomovirus por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	56
2.1.5	Amplificación y caracterización parcial del genoma A.....	56
2.1.6	Clonación y secuenciación parcial del genoma A Begomoviral.....	56
2.1.7	Análisis bioinformático de las secuencias parciales del componente A begomoviral .....	57
2.2	Resultados y discusión .....	57
2.2.1	Colecta de arvenses en el Valle del Cauca.....	57
2.2.2	Identificación de arvenses como reservorios de Begomovirus bipartitas....	59
<b>3</b>	<b>Capítulo 2: caracterización <i>in silico</i> de la región promotora del gen de la proteína de la cápside (AR1) de Begomovirus aislados en el Valle del Cauca. ....</b>	<b>79</b>
3.1	Materiales y métodos.....	81
3.1.1	Secuencias begomovirales empleadas en esta investigación .....	81
3.1.2	Análisis bioinformático de la región promotora.....	83
3.2	Resultados y Discusión.....	83
3.2.1	Elementos comunes presentes en todos los promotores eucarióticos. ....	85
3.2.2	Elementos <i>cis</i> regulatorios encontrados de manera diferencial en los promotores begomovirales.....	85
<b>4</b>	<b>Capítulo 3. Caracterización biológica del promotor del gen AR1 del <i>virus del mosaico amarillo de la papa</i> - PYMV empleando ensayos de expresión transitoria....</b>	<b>109</b>
4.1	Materiales y métodos.....	112
4.1.1	Plásmidos con fusiones a GUS.....	112
4.1.2	Multiplicación de los plásmidos.....	113
4.1.3	Preparación de micropartículas y cartuchos con DNA plasmídico.....	113
4.1.4	Multiplicación y preparación del material vegetal. ....	113
4.1.5	Biobalística de baja presión con la pistola de genes Helios® Gene Gun System (BioRad®) en hojas de tabaco. ....	114
4.1.6	Cuantificación de la expresión del gen reportero <i>uidA</i> (GUS) y análisis de la expresión tejido específica. ....	114
4.1.7	Análisis bioinformático del promotor de CP de PYMV:.....	115
4.2	Resultados y discusión .....	115
4.2.1	Evaluación de la capacidad de transactivación del gen AL2 (TrAP) en la actividad del promotor del gen tardío de la proteína de la cápside (AR1) de PYMV empleando su propia fuente de TrAP (transactivación homóloga). ....	115
4.2.2	Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del gen tardío de la proteína de la cápside (AR1) de PYMV para identificar posibles elementos <i>cis</i> -regulatorios que contribuyen a la actividad del promotor y a su expresión tejido específica. ....	118
4.2.3	Análisis de la expresión tejido-específico del promotor del gen AR1 (CP) de PYMV fusionado al gen reportero <i>uidA</i> (GUS), en presencia y ausencia de su propio transactivador (AL2).....	120
<b>5</b>	<b>Conclusiones y Perspectivas.....</b>	<b>135</b>

5.1	Conclusiones.....	135
5.2	Perspectivas.....	136

## Lista de figuras

	Pág.
<b>Figura 1-1. A</b> , Reconstrucción de una partícula del virus del rayado del maíz (MSV) la barra representa 10 nm. <b>B</b> , partículas purificadas de MSV teñidas con acetato de uranilo, la barra representa 50 nm. ....	6
<b>Figura 1-2.</b> Representación esquemática de un Begomovirus bipartita. ....	8
<b>Figura 1-3.</b> Esquema que representa el ciclo de replicación de DNA en begomovirus. ...	13
<b>Figura 1-4.</b> Sitios de unión de las proteínas Rep (iterones), los sitios de acción de diferentes reguladores de la transcripción (motivos, CLEs), y la estructura tallo-asa. ....	13
<b>Figura 1-5.</b> Secuencia de nucleótidos del promotor 35S del CaMV (-343 a +1) (A), Subdominios del promotor 35S (B). ....	28
<b>Figura 2-1.</b> Síntomas virales presentes en las arvenses colectadas en el Valle del Cauca .....	58
<b>Figura 2-2.</b> Amplificación viral por PCR. Detección de Begomovirus en arvenses de ají recolectadas en el municipio de Zarzal, Valle del Cauca. Muestras positivas: 2 ( <b>Z2-Sida sp</b> ) 14 ( <b>Z14 Malvastrum sp.</b> ) 16 ( <b>Z16-Malvastrum sp.</b> ) 17 ( <b>Z17- Rivina humilis</b> ) 19( <b>Z19-Acalypha sp.</b> ). Gel de agarosa 1%. M, marcador de peso molecular Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Fermentas, +, Control Positivo, -, Control negativo. ....	61
<b>Figura 2-3.</b> Arvenses positivas como hospederos alternos de Begomovirus presentes en el Valle del Cauca. ....	62
<b>Figura 2-4.</b> Caracterización molecular de Begomovirus en arvenses de ají recolectadas en el municipio de Zarzal, Valle del Cauca. Muestras positivas: 1 ( <b>Z2-Sida sp.</b> ) 2 ( <b>Z14 Malvastrum sp.</b> ) 3 ( <b>Z16-Malvastrum sp.</b> ) 4 ( <b>Z17- Rivina humilis</b> ) 5( <b>Z19-Acalypha sp.</b> ). Gel de agarosa 1%. M, marcador de peso molecular Gene Ruler 1 kb DNA Ladder Fermentas, +, Control Positivo, -, Control negativo. ....	66

**Figura 2-5.** Porcentaje de identidad de Begomovirus estrechamente relacionados con los aislados Z2, Z16 y Z17, según el programa *Sequence Demarcation Tool* versión 1.2.... 70

**Figura 2-6.** Relaciones filogenéticas de los aislados begomovirales construido a partir del gen de la proteína de la cápside (CP) y su relación con los Begomovirus más cercanos. (2000 réplicas de Bootstrap)..... 71

**Figura 3-1.** Representación gráfica de los elementos *cis*-regulatorios de la región promotora de los Begomovirus analizados (PlantCare) ..... 84

**Figura 4-1.** Primer ensayo de biobalística usando partículas de oro. Las barras indican la sumatoria del número de puntos azules obtenidos en ensayos de expresión transitoria en hojas completas de *N. tabacum* cv. Xanthi cultivadas in vitro utilizando cada uno de los tratamientos. Las barras de error representan la desviación estándar..... 115

**Figura 4-2.** Puntos azules presentes en tejidos bombardeados con partículas de oro. Expresión en Mesófilo. **A y B:** Construcción CP-tomate. **C:** pBI121. **D:** pCAMBIA..... 116

**Figura 4-3.** Puntos azules presentes en tejidos bombardeados con partículas de Tungsteno. Expresión en Mesófilo y vascular. **A y B:** Construcción CP-tomate. **C:** pBI121. **D:** pCAMBIA..... 117

**Figura 4-4.** Representación gráfica del promotor CP de PYMV donde se muestran los diferentes Elementos *cis*-regulatorios identificados ..... 118

**Figura 4-5.** Expresión en tejido de Mesófilo y vascular del gen reportero *uidA* (GUS) en plantas de tabaco *Nicotiana tabacum* variedad *xhanti*. **A, B y C.** Hojas bombardeadas con la construcción PYMV LCP-GUS sin PYMV-TrAP. **D, E y F.** Hojas bombardeadas con la construcción PYMV LCP-GUS en presencia de PYMV-TrAP. **G, H e I:** hojas bombardeadas con el control positivo de expresión pBI121 y pCAMBIA como control positivo de bombardeo. **J, K y L:** hojas no bombardeadas (control negativo). ..... 121

## Lista de tablas

	Pág.
<b>Tabla 1-1.</b> Clasificación taxonómica de la Familia <i>Geminiviridae</i> . Fuente: Padidam, et al., 1999; Hull, R., 2001; Ascencio, et al., 2002; ICTV, 2017.....	6
<b>Tabla 1-2.</b> Nomenclatura, localización y función de los genes de begomovirus bipartitas. Fuente: Fondong 2013; Rojas et al., 2005 .....	9
<b>Tabla 1-3.</b> Proteínas expresadas utilizando vectores derivados de begomovirus. Fuente: Chen et al., 2011.....	35
<b>Tabla 2-1</b> .Municipios de muestreo de arvenses como posibles hospederos de Begomovirus realizado en el Valle del Cauca. ....	58
<b>Tabla 2-2.</b> Listado de arvenses pertenecientes a las familias Euphorbiaceae, Malvaceae, y Phytolaccaceae como hospederos de begomovirus para Latinoamérica y el Caribe....	64
<b>Tabla 2-3.</b> Porcentajes de identidad del aislado begomoviral Z2 con los virus más relacionados según el criterio de la base de datos del ICTV .....	67
<b>Tabla 2-4.</b> Porcentajes de identidad del aislado begomoviral Z16 con los virus más relacionados según el criterio de la base de datos del ICTV .....	69
<b>Tabla 2-5.</b> Porcentajes de identidad del aislado begomoviral Z17 con los virus más relacionados según el criterio de la base de datos del ICTV. ....	69
<b>Tabla 3-1.</b> Listado de secuencias begomovirales utilizadas para realizar los análisis bioinformáticos. Se muestra Hospedero, región promotora y tamaño. ....	82

## Lista de Símbolos y abreviaturas

<b>aa</b>	Aminoácido
<b>ABA</b>	Elementos de respuesta al ácido abscísico
<b>AbMV</b>	Abutilon mosaic virus
<b>AC4</b>	Proteína determinante de patogenicidad
<b>ACMV</b>	African cassava mosaic virus
<b>AJ</b>	Ácido jasmónico
<b>AS</b>	Ácido abscísico
<b>BCTV</b>	Beet curly top virus
<b>BDMV</b>	Bean dwarf mosaic virus
<b>BGMV</b>	Bean golden mosaic virus
<b>BGYMV</b>	Bean golden yellow mosaic virus
<b>BLCrV</b>	Bean leaf crumple virus
<b>bp</b>	Pares de bases
<b>CaLCuV</b>	Cabbage leaf curl virus
<b>CaMV</b>	Cauliflower mosaic virus
<b>CdTVTo</b>	Chino del Tomate Virus aislado Sinaloa
<b>CLEs</b>	Elementos conservados tardíos (Conserved Late Elements)
<b>CoYSV</b>	Corchorus yellow spot virus
<b>CP</b>	Proteína de la cápside
<b>DiYMoV</b>	Dicliptera yellow mottle virus
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAds</b>	Doble cadena de DNA
<b>DNAss</b>	Cadena sencilla de DNA
<b>EACMV-UG</b>	East African cassava mosaic virus
<b>EuMV</b>	Euphorbia mosaic virus
<b>ICTV</b>	Comité Internacional de taxonomía de Virus
<b>MeJA</b>	Metil jasmonatos
<b>MerMPRV</b>	Merremia mosaic Puerto Rico virus
<b>MLA</b>	Marco de lectura abierto
<b>MP</b>	Proteína de movimiento
<b>MSV</b>	Maize streak virus
<b>MYMV</b>	Mungbean Yellow Mosaic Virus
<b>NSP</b>	Proteína de transporte de DNA viral
<b>nt</b>	nucleótido
<b>OYMV</b>	Okra yellow mosaic Mexico virus

<b>PepGMV</b>	Pepper Golden mosaic virus
<b>pGem</b>	Plásmido pGem
<b>PHYVV</b>	Pepper huasteco yellow vein virus
<b>PHYVV</b>	Pepper huasteco yellow vein virus
<b>PLDV</b>	Passion fruit leaf distortion virus
<b>PSLDV</b>	Passion fruit severe leaf distortion virus
<b>PYMV</b>	Potato yellow mosaic virus aislado en Trinidad y Tobago
<b>PYMV</b>	Potato yellow mosaic virus
<b>PYMV-Ma</b>	Ma Potato yellow mosaic virus aislado Martinique
<b>RC</b>	Región común de los Geminivirus
<b>REn</b>	Proteína potenciadora de replicación
<b>REP</b>	Proteína asociada a la replicación
<b>RhGMV/Sb</b>	Rhynchosia golden mosaic virus
<b>RI</b>	Región intergénica de los Geminivirus
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>SiGMV</b>	Sida golden mosaic virus
<b>SiMoV/Rho</b>	Sida mottle virus-Brazil
<b>SiYBV</b>	Sida yellow blotch virus
<b>SiYVV</b>	Sida yellow vein virus
<b>SoMBoV</b>	Solanum mosaic Bolivia virus
<b>TGMV</b>	Tomato golden mosaic virus
<b>TMV</b>	Tobacco mosaic virus
<b>ToLDV</b>	Tomato leaf distortion virus
<b>ToMoTV</b>	Tomato mottle taino virus
<b>ToVEV</b>	Tomato Venezuela virus
<b>ToYMV</b>	Tomato yellow mosaic virus
<b>TrAP</b>	Proteína transactivadora
<b>TYLCCNV</b>	Tomato yellow leaf curl China virus
<b>TYLCSV</b>	Tomato yellow leaf curl Sardinia virus
<b>TYLCV</b>	TYLCV Tomato yellow leaf curl virus
<b>yvTGMV</b>	Tomato golden mosaic virus-yellow vein virus

## Bibliografía

- Argüello-Astorga, G. R., Guevara-González, R. G., Herrera-Estrella, L. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1994). Geminivirus Replication Origins Have a Group-Specific Organization of Iterative Elements: A Model for Replication. *Virology*, *203*(1), 90–100. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1458>
- Badillo, A., & Corona, J. (2009). Manual del Laboratorio de Cultivos de Tejidos. *Academia de Biotecología*, 1–27.
- Benfey, P. N., Ren, L., & Chua, N. H. (1989). The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue-specific expression patterns. *The EMBO Journal*, *8*(8), 2195–2202. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16453896>
- Berger, M. R., & Sunter, G. (2013). Identification of sequences required for AL2-mediated activation of the tomato golden mosaic virus-yellow vein BR1 promoter. *Journal of General Virology*, *94*(PART 6), 1398–1406. <https://doi.org/10.1099/vir.0.050161-0>
- Betancur Pérez, J. F. (2012). Identificación y caracterización molecular de virus transmitidos por mosca blanca bemisia tabaci que infectan tomate en la región andina de Colombia. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/9137/>
- Bieri, S., Potrykus, I., & Fütterer, J. (2002). Geminivirus sequences as bidirectional transcription termination/polyadenylation signals for economic construction of stably expressed transgenes. *Molecular Breeding*, *10*(1/2), 107–117. <https://doi.org/10.1023/A:1020391827306>
- Broothaerts, W., Mitchell, H. J., Weir, B., Kaines, S., Smith, L. M. A., Yang, W., ... Jefferson, R. A. (2005). Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature*, *433*(7026), 629–633. <https://doi.org/10.1038/nature03309>
- Cazzonelli, C. I., Burke, J., & Velten, J. (2005). Functional characterization of the geminiviral conserved late element (CLE) in uninfected tobacco. *Plant Molecular Biology*, *58*(4), 465–481. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-6589-x>
- Govindarajulu, M., Elmore, J. M., Fester, T., & Taylor, C. G. (2008). Evaluation of Constitutive Viral Promoters in Transgenic Soybean Roots and Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(8), 1027–1035. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-8-1027>
- Haley, A., Zhan, X., Richardson, K., Head, K., & Morris, B. (1992). Regulation of the activities of African cassava mosaic virus promoters by the AC1, AC2, and AC3 gene



- products. *Virology*, 188(2), 905–909. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1585657>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT". *Nucl. Acids. Symp.* Retrieved from <http://brownlab.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Hung, H.-C., & Petty, I. T. D. (2001). Functional equivalence of late gene promoters in bean golden mosaic virus with those in tomato golden mosaic virus. *Journal of General Virology*, 82(3), 667–672. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-3-667>
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13), 3901–3907. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3327686>
- Kim, K.-S., & Key-Woon Lee. (1992). Geminivirus-induced microtubules and their suggested.PDF.
- Lacatus, G., & Sunter, G. (2008). Functional analysis of bipartite begomovirus coat protein promoter sequences. *Virology*, 376(1), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.03.012>
- Laloum, T., De Mita, S., Gamas, P., Baudin, M., & Niebel, A. (2013). CCAAT-box binding transcription factors in plants: Y so many? *Trends in Plant Science*, 18(3), 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.07.004>
- Lam, E., Benfey, P. N., Gilmartin, P. M., Fang, R. X., & Chua, N. H. (1989). Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(20), 7890–7894. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.20.7890>
- Lemaux, P. G. (2008). Genetically Engineered Plants and Foods: A Scientist's Analysis of the Issues (Part I). *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 771–812. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.103840>
- Lescot, M., Déhais, P., Thijs, G., Marchal, K., Moreau, Y., Van de Peer, Y., ... Rombauts, S. (2002). PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 30(1), 325–327. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11752327>
- Lewin, B. (2009). Genes IX.pdf.
- López-López, K., Rodríguez-Mora, D. M., Vaca-Vaca, J. C., & Vaca-Vaca, J. C. (2013). Optimización de las condiciones de inoculación por biobalística de un Begomovirus en tomate y tabaco. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 8. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41261>
- Mazithulela, Sudhakar, Heckel, Mehlo, Christou, Davies, & Boulton. (2000). The maize streak virus coat protein transcription unit exhibits tissue-specific expression in transgenic rice. *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*, 155(1), 21–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10773336>
- Morra, M. R., & Petty, I. T. (2000). Tissue specificity of geminivirus infection is genetically

- determined. *The Plant Cell*, 12(11), 2259–2270. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11090223>
- Petty, I. T. D., Miller, C. G., Meade-Hash, T. J., & Schaffer, R. L. (1995). Complementable and Noncomplementable Host Adaptation Defects in Bipartite Geminiviruses. *Virology*, 212(1), 263–267. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1481>
- Podevin, N., & du Jardin, P. (2012). Possible consequences of the overlap between the CaMV 35S promoter regions in plant transformation vectors used and the viral gene VI in transgenic plants. *GM Crops & Food*, 3(4), 296–300. <https://doi.org/10.4161/gmcr.21406>
- Pulido-Rendón, A. J. (2014). EVALUACION TRANSITORIA DEL PROMOTOR DEL GEN DE LA PROTEINA DE LA CAPSIDE DEL Virus del mosaico amarillo de la papa (PYMV) - COLOMBIA EN PLANTAS DE TABACO.
- Pulido Rendón, A., Vaca-Vaca, J. C., & Lopez-lopez, K. (2014). Evaluación transitoria del promotor del gen de la proteína de la capsida del virus del mosaico amarillo de la papa (pymv) - Colombia en plantas de tabaco. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/14432/>
- Reuveni, M., Debbi, A., Kutsher, Y., Gelbart, D., Zemach, H., Belausov, E., ... Lapidot, M. (2015). Tomato yellow leaf curl virus effects on chloroplast biogenesis and cellular structure. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 92, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2015.08.001>
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting Chinks in the Plant's Armor: Evolution and Emergence of Geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 361–394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>
- Rothenstein, D., Krenz, B., Selchow, O., & Jeske, H. (2007). Tissue and cell tropism of Indian cassava mosaic virus (ICMV) and its AV2 (precoat) gene product. *Virology*, 359(1), 137–145. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.09.014>
- Ruiz-Medrano, R., Guevara-González, R. G., Argüello-Astorga, G. R., Monsalve-Fonnegra, Z., Herrera-Estrella, L. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1999). Identification of a sequence element involved in AC2-mediated transactivation of the pepper huasteco virus coat protein gene. *Virology*, 253(2), 162–169. <https://doi.org/10.1006/viro.1998.9484>
- Sarah, & Rushton. (2005). Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? *Trends in Biotechnology*, 23(6), 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.04.009>
- Sunitha, S., Mahajan, N., & Veluthambi, K. (2012). The TrAP/REn monodirectional promoter of Mungbean yellow mosaic geminivirus (MYMV) displays root-specific expression in transgenic tobacco. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109(3), 535–545. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0120-2>
- Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1991). Transactivation in a geminivirus: AL2 gene product is

- needed for coat protein expression. *Virology*, 180(1), 416–419. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90049-H](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90049-H)
- Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1997a). Regulation of a Geminivirus Coat Protein Promoter by AL2 Protein (TrAP): Evidence for Activation and Derepression Mechanisms. *Virology*, 232(2), 269–280. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8549>
- Sunter, G., & Bisaro, D. M. (1997b). Regulation of a Geminivirus Coat Protein Promoter by AL2 Protein (TrAP): Evidence for Activation and Derepression Mechanisms. *Virology*, 232(2), 269–280. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8549>
- Sunter, G., Stenger, D. C., & Bisaro, D. M. (1994). Heterologous Complementation by Geminivirus AL2 and AL3 Genes. *Virology*, 203(2), 203–210. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1994.1477>
- Vaca Vaca, J., Pulido-Rendón, A. J., & Lopez-Lopez, K. (2014). Optimización de las condiciones de biobalística de baja presión para análisis de expresión transitoria de genes heterólogos en hojas de tabaco cultivadas in vitro. *Acta Agronómica*, 64(2), 146–155. <https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43928>
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., & Baulcombe, D. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 33(5), 949–956. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12609035>
- Xie, Y., Zhu, Z., Liu, Y., Wu, Q., & Xu, H. (2000). Coat protein promoter from cotton leaf curl virus is not a tissue-specifically expressed promoter. *Chinese Science Bulletin*, 45(20), 1869–1874. <https://doi.org/10.1007/BF02886296>
- Zuñiga-Vega, C., & Ramirez, P. (2002). Los geminivirus, patógenos de importancia mundial, 2–0. Retrieved from <http://www.sidalc.net/repdoc/A2040E/A2040E.PDF>