

ANEXO 1. Protocolo de extracción de RNA con silica

- Triturar 100 mg de tejido vegetal (fresco o congelado) en una bolsa de plástico o 25 mg (deshidratado) con 1,5 ml de tampón de extracción al que previamente se le haya añadido β - mercaptoetanol en proporción 1%.
- Transferir 500 μ l del homogeneizado a un tubo eppendorf de 1,5 ml con punta recortada.
- Añadir 100 μ l de n-lauronyl sarcosina 10% e incubar 10 minutos a 70°C (agitando los tubos de vez en cuando).
- Incubar en hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Transferir 300 μ l a un nuevo tubo y añadir 150 μ l de etanol, 300 μ l de Na I 6M y 50 μ l de silica resuspendido, e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Centrifugar 1 minuto a 6000 rpm a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante y lavar el sedimento con 1 ml de tampón de lavado.
- Centrifugar 1 minuto a 6000 rpm a temperatura ambiente
- Repetir 3 veces el paso de lavado.
- Tras el último lavado eliminar el máximo posible de tampón.
- Resuspender el pellet en 100 μ l de agua MQ estéril.
- Incubar 4 minutos a 70 °C.
- Centrifugar 3 minutos a 13000 rpm a temperatura ambiente.
- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y guardar a -20 °C hasta su próximo uso.

ANEXO 2. Protocolo de extracción del DNA total de plantas con EZNA

- Triturar 10 mg de muestra seca o 40 mg de muestra fresca o congelada en un eppendorf con ayuda de un micropistilo estéril.
- Añadir 600 μ l de tampón P1 y vortear vigorosamente. (Opcional: añadir 10 μ l de β -mercaptoetanol).
- Incubar a 65 °C al menos 5 minutos. Agitar los tubos una vez durante la incubación.
- Añadir 140 μ l de tampón P2 y vortear.
- Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm.
- Cuidadosamente pipetear 600 μ l de sobrenadante a un nuevo tubo, sin transferir restos vegetales.
- Añadir ½ volumen de tampón P3 (300 μ l) y 1 volumen de etanol absoluto (600 μ l), mezclar.
- Pasar 800 μ l a una columna HiBindDNA acoplada a un tubo colector de 2 ml.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Pasar el resto del volumen por la columna.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar el sobrenadante y el tubo colector.
- Pasar la columna a un nuevo tubo colector y añadir 750 μ l de Wash Buffer.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm y descartar sobrenadante.
- Volver a centrifugar 2 minutos a 13000 rpm para eliminar restos de alcohol de la columna.

- Transferir la columna a un nuevo tubo Eppendorf estéril y añadir 100 µl de agua PCR precalentada a 65 °C e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 minuto a 13000 rpm.
- Volver a añadir 100 µl de agua PCR precalentada, incubar 1 minuto y centrifugar.
- Se obtienen de 2 a 10 µg.

ANEXO 3. GeneJET Gel Extraction Kit de Thermo Scientific

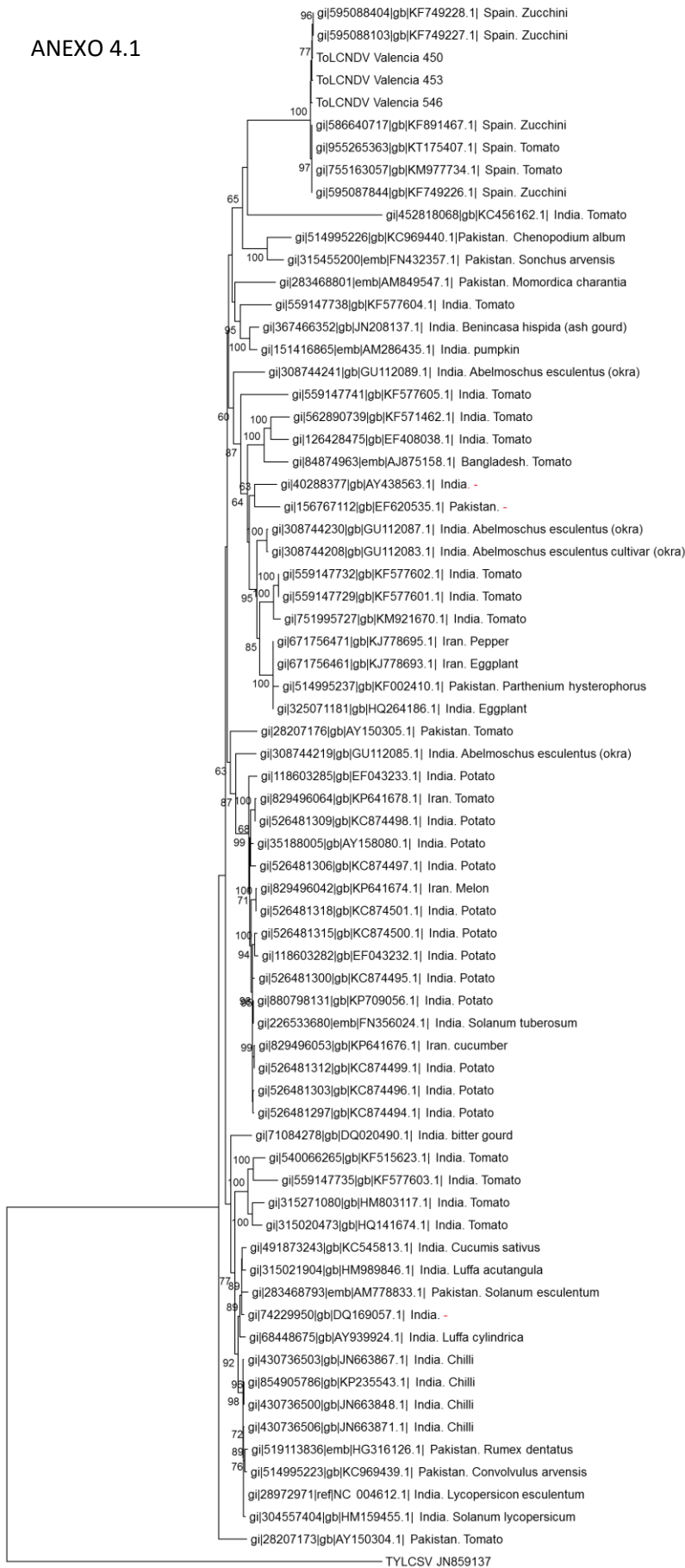
- Extraer la banda de interés del gel de agarosa con ayuda de un bisturí estéril.
- Transferir la banda a un tubo de 1,5 ml.
- Agregar 1 volumen de binding buffer (según el tamaño de la banda extraída) e incubar a 65 °C durante 15 minutos o hasta la disolución total de la agarosa.
- Transferir toda la muestra disuelta a una columna de purificación y centrifugar 30 segundos a 13000 rpm.
- Descartar el sobrenadante y volver a colocar la columna en el tubo.
- Añadir 700 µl de tampón de lavado a la columna purificación GeneJET y centrifugar durante 1 minuto. Desechar el sobrenadante y volver a colocar la columna de nuevo en el mismo tubo de recogida.
- Centrifugar de nuevo la columna de purificación durante 1 minuto para eliminar por completo el tampón de lavado residual.
- Transferir la columna de purificación a un nuevo tubo de microcentrífuga estéril 1,5 ml y añadir 50 µl de tampón de elución al centro de la membrana de la columna.
- Centrifugar durante 1 minuto a 13000 rpm. Guardar a -20°C.

ANEXO 4. Árboles filogenéticos de las secuencias de nucleótidos del DNA-A y DNA-B de ToLCNDV.

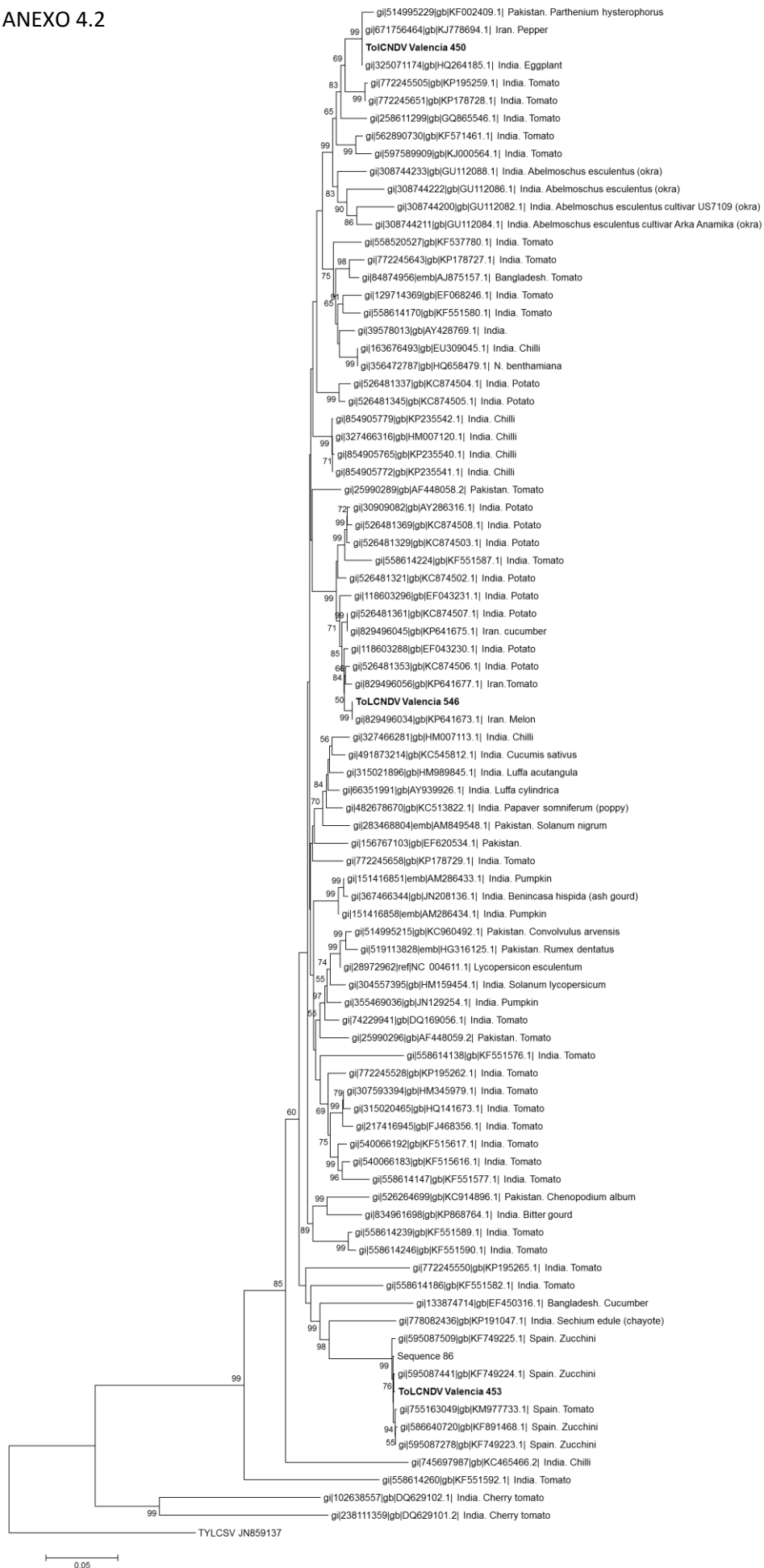
ANEXO 4.1. Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas del DNA-B de ToLCNDV basado en los alineamientos de secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) calculados según el algoritmo neighbor-Joining y el modelo Tamura-Nei implementados con 1000 pseudo-réplicas a través del programa informático Mega 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de acceso, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de acceso JN859137) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 4.2 Árbol filogenético de las secuencias nucleotídicas del DNA-A de ToLCNDV basado en los alineamientos de secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) calculados según el algoritmo neighbor-Joining y el modelo Tamura-Nei implementados con 1000 pseudo-réplicas a través del programa informático Mega 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de acceso, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de acceso JN859137) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 4.1



ANEXO 4.2



ANEXO 5. Árboles filogenéticos de las secuencias aminoacídicas de las proteínas de ToLCNDV codificadas por AC1, AC2, AC3, AC4, AV1, AV2, BC1 y BV1.

ANEXO 5.1. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AC1 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60624.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.2. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AC2 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60623.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.3. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AC3 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60622.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.4. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AC4 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60625.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.5. Análisis filogenético de la secuencia aminoacídica de la proteína AV1 basado en los alineamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Bootstrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron

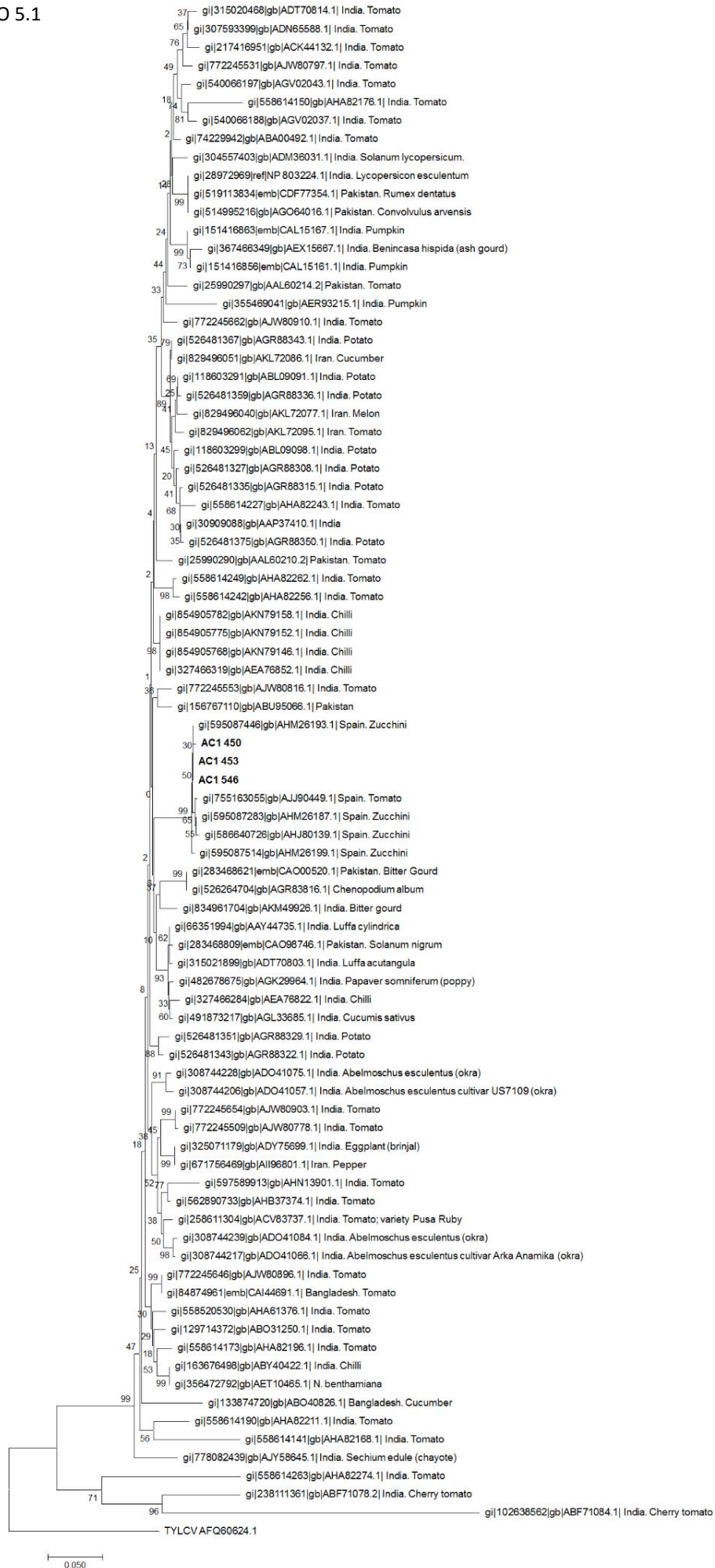
extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60621.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.6. Análisis filogenético de las secuencia aminoacídica de la proteína AV2 basado en los alinamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Boostrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de TYLCSV (Número de accesoión AFQ60620.1) como outgroup o grupo externo.

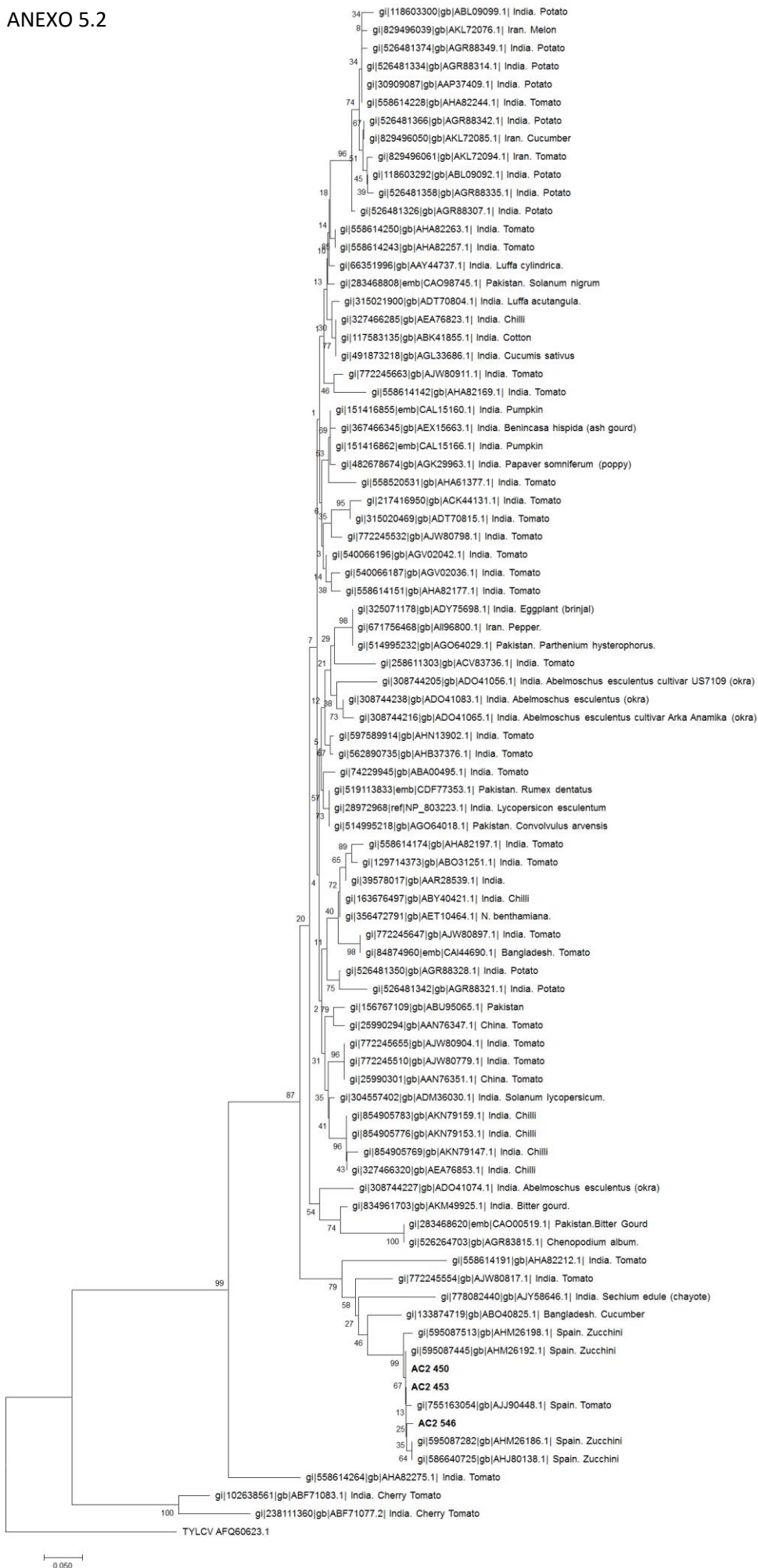
ANEXO 5.7. Análisis filogenético de las secuencia aminoacídica de la proteína BC1 basado en los alinamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Boostrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de CoMoV (Número de accesoión AJG36439.1) como outgroup o grupo externo.

ANEXO 5.8. Análisis filogenético de las secuencia aminoacídica de la proteína BV1 basado en los alinamientos de las secuencias de los tres aislados estudiados (negrita) con otros recogidos de la base de datos del GenBank realizado con el software de alineamiento MUSCLE, y el algoritmo Neighbor Joining aplicando el modelo de distancia Tamura-Nei y con un valor de Boostrap de 1000 réplicas, con el programa Mega versión 6. Los aislados incluidos se identifican por los números de accesoión, el país donde fueron recogidos y el hospedante desde el que fueron extraídos. La secuencia de CoMoV (Número de accesoión AJG36438.1) como outgroup o grupo externo.

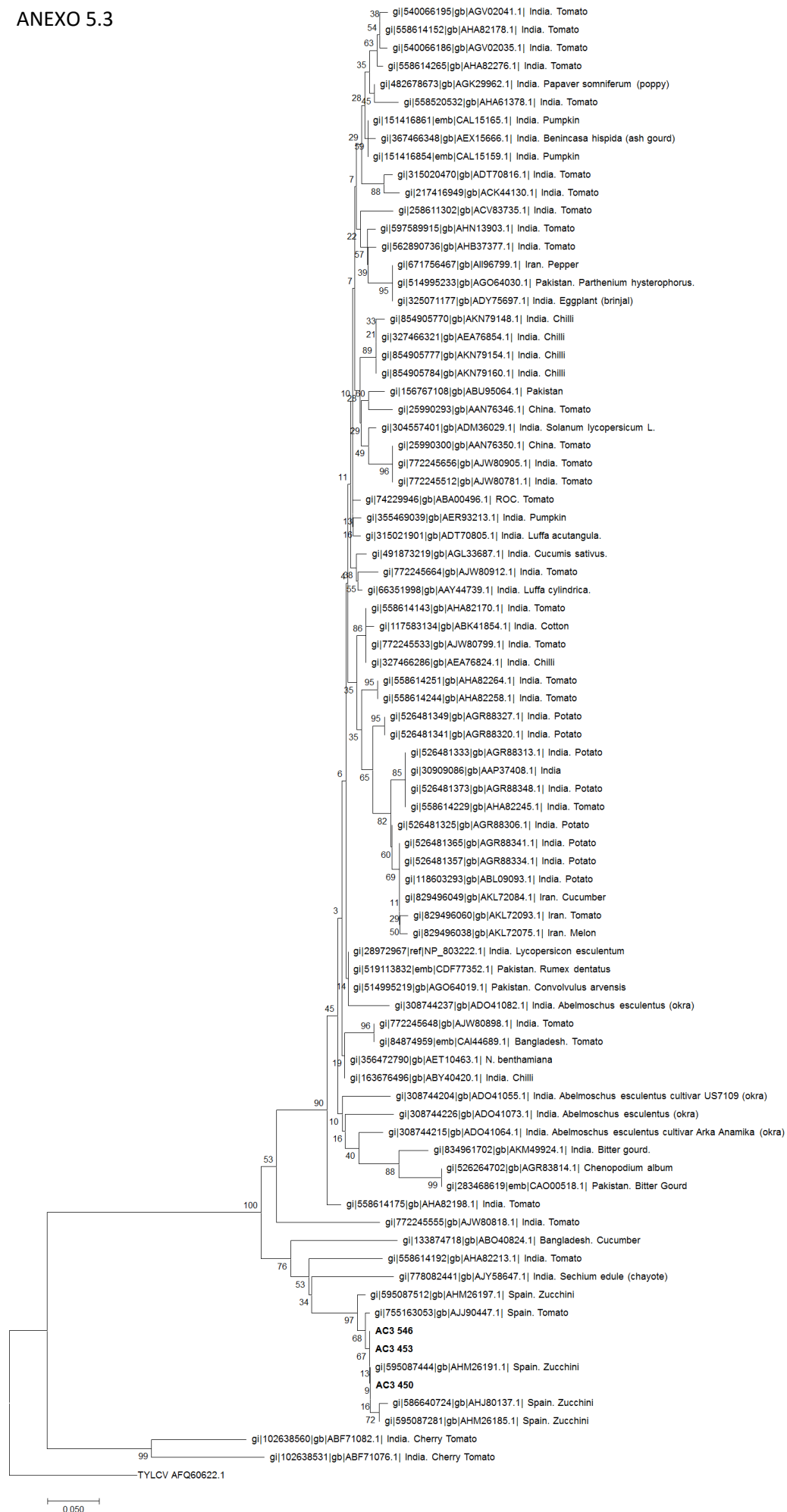
ANEXO 5.1



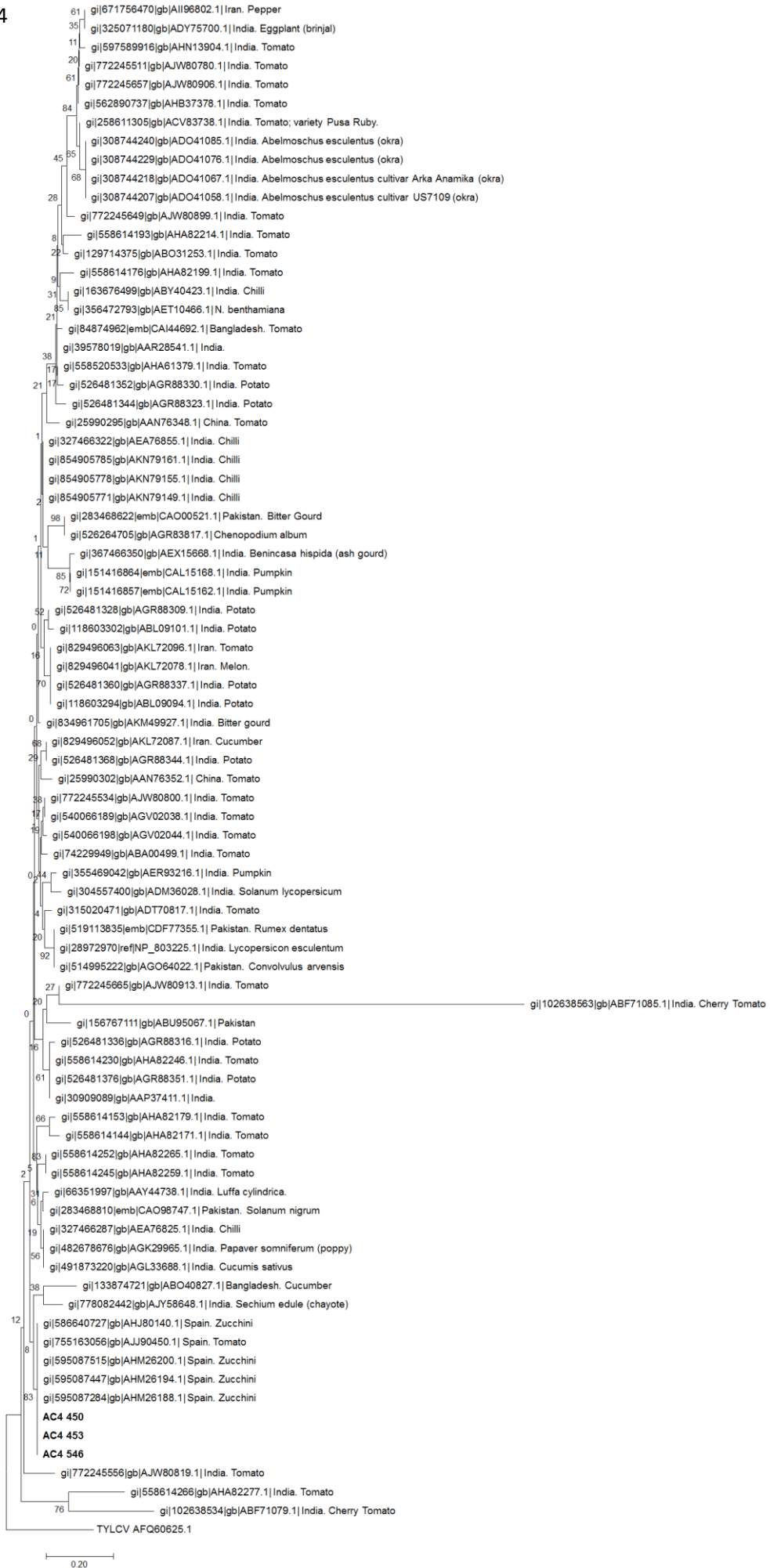
ANEXO 5.2



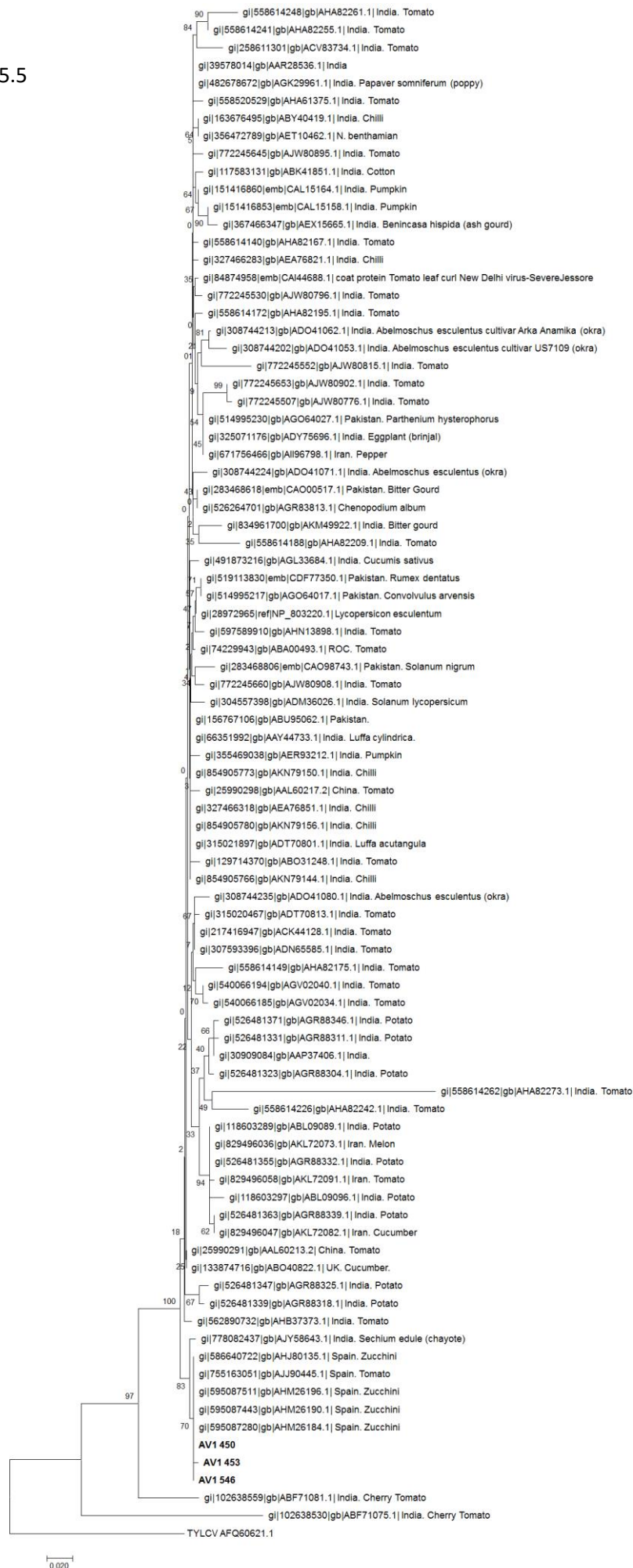
ANEXO 5.3



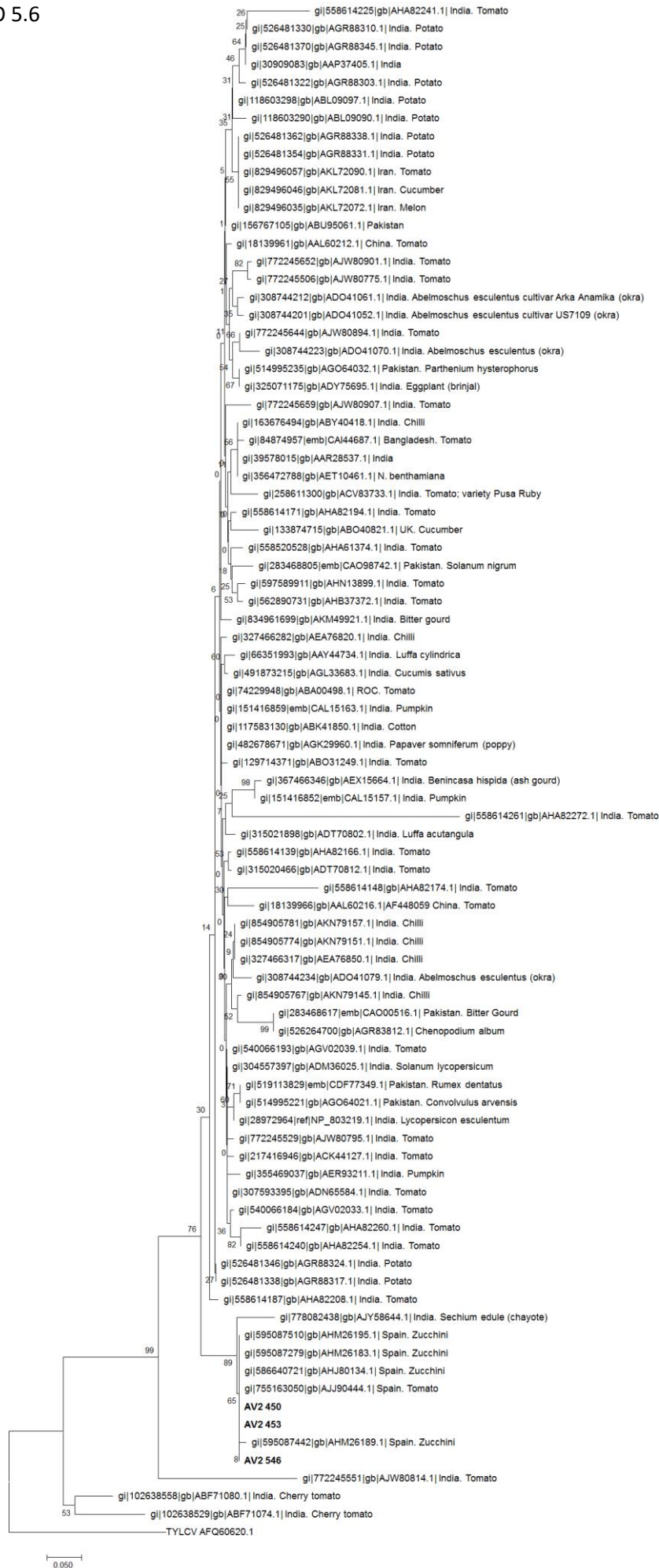
ANEXO 5.4



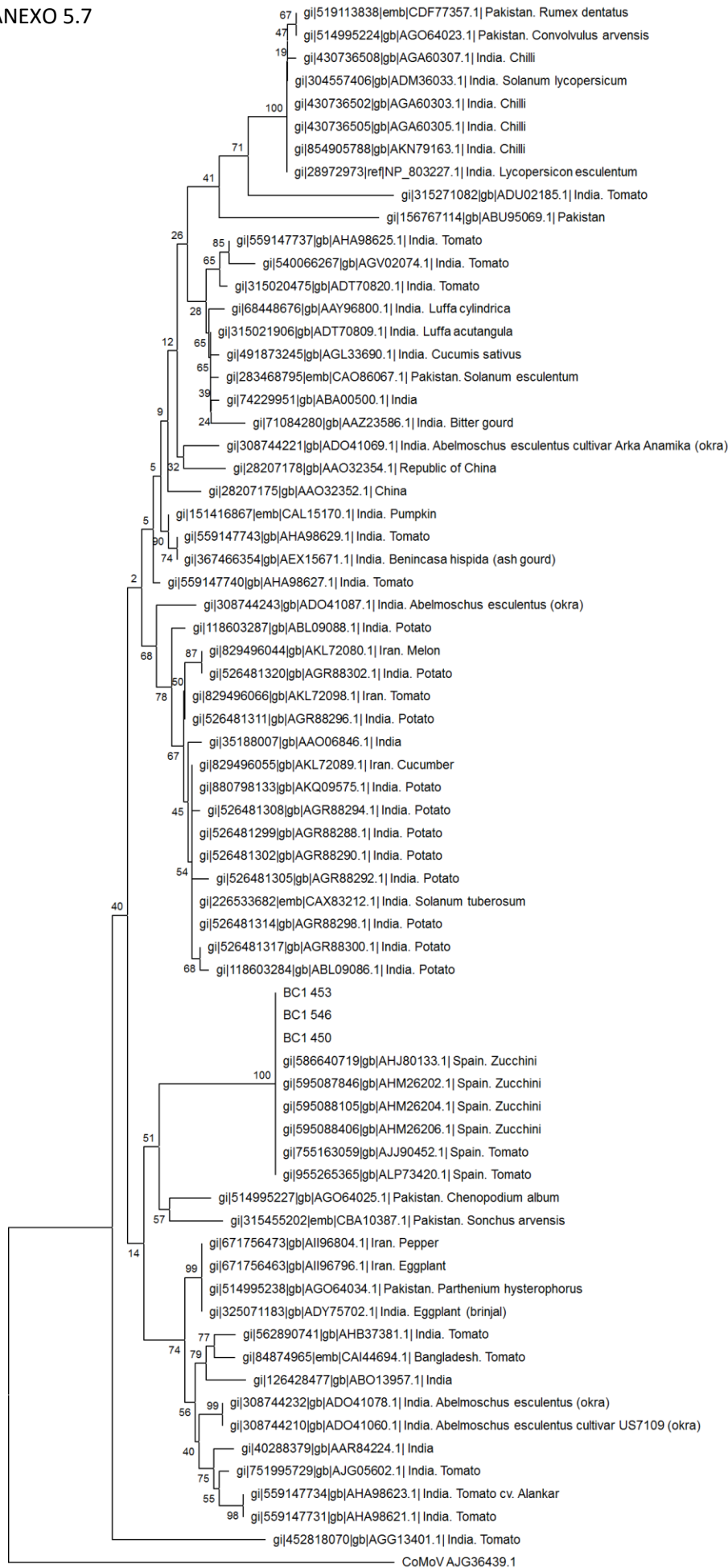
ANEXO 5.5



ANEXO 5.6



ANEXO 5.7



ANEXO 5.8

