



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis de la tolerancia al virus *Pepper golden mosaic virus*
(PepGMV) en accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*

Tesis que presenta

Erick Arroyo Álvarez

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de Erick Arroyo Álvarez, titulado “Análisis de la tolerancia al virus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) en accesiones de *Capsicum annum* var. *glabriusculum*”, fue realizado en el laboratorio USF10 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular en Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente:

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 14 de septiembre de 2020

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Erick Arroyo Álvarez

Septiembre de 2020

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por haberme otorgado la beca nacional No. 701540 para realizar mis estudios de maestría y la beca de movilidad nacional 2019-000017-01NACF, al Centro de Investigación Científica de Yucatán por aceptarme como alumno de posgrado, por las instalaciones y recursos prestados para realizar mi trabajo de tesis.

A la Universidad Autónoma de Baja California y al Doctor Rafael Bello Bedoy por las instalaciones y recursos que fueron utilizados para llevar a cabo parte de mi trabajo experimental.

Al Doctor Oscar Alberto Moreno Valenzuela por ser mi director de tesis y a los Doctores Blondy Canto, Cecilia Hernández, Yair Cárdenas y Doctor Hernán por ser parte de mi comité revisor.

A la maestra Yereni Minero por todo su apoyo en el laboratorio, por enseñarme técnicas nuevas, por resolver mis dudas acerca de los protocolos y sobre todo por su paciencia.

A todos mis compañeros y amigos del CICY, por su amistad, tiempo y por los ánimos que nunca faltaron en los malos momentos.

A las personas más importantes, mi familia, mi Papá y Mamá, de los que nunca he dejado de aprender, me han hecho ser una buena persona. A mis hermanos que tanto quiero, en especial a mi hermana Jesica estudiante de medicina interna, que desde que inicio la pandemia ha estado cara a cara con el virus sin fallarle a la sociedad.

Gracias a los que se toman el tiempo en leer este trabajo de tesis.

Contenido	
Abstrac.....	12
Resumen.....	12
Introducción.....	14
CAPÍTULO I. Antecedentes.....	16
<i>Capsicum annuum L. var. glabriusculum</i>	16
Aspectos taxonómicos.....	16
Geminivirus.....	20
Begomovirus.....	22
<i>Pepper golden mosaic virus</i>	24
Estrategias de defensas contra patógenos.....	26
Justificación.....	31
Hipótesis.....	31
Objetivos.....	31
Objetivo general.....	31
Objetivos específicos.....	31
Estrategia experimental.....	32
CAPITULO II. METODOLOGÍA.....	33
Material vegetal.....	33
Clonas infectivas del PepGMV.....	34
Extracción del ADN vegetal.....	36
Identificación por PCR del PepGMV en plantas inoculadas por biobalística.....	37
Evaluación de la tolerancia al PepGMV.....	37
Sintomatología.....	38
CAPITULO III. Resultados.....	40
Análisis de la integridad e infectividad de los dímeros de PepGMV.....	40
Detección molecular del PepGMV en accesiones de <i>Capsicum annuum var. glabriusculum</i>	41
Sintomatología.....	48
Tasa relativa de crecimiento.....	52
Número de hojas.....	53
Índice de clorofila.....	54
Contenido de fenoles.....	55
Análisis de la florescencia de la clorofila.....	56

CAPITULO IV. Discusión	58
Infección con el PepGMV	58
Tolerancia al PepGMV	60
CAPITULO V. Conclusiones y perspectivas	62
Perspectivas	63

Índice de figuras

Figura 1. Disminución de la diversidad genética de los cultivos actuales debidos a eventos de cuellos de botella	18
Figura 2. Organización del genoma de geminivirus	21
Figura 3. Ciclo de vida de los begomovirus.....	23
Figura 4 . Distribución mundial de PepGMV	24
Figura 5 . Mapas de organización del genoma de tres cepas del Pepper Golden Mosaic Virus (PepGMV).....	25
Figura 6. Representación gráfica de los dímeros del PepGMV A y PepGMV B.	35
Figura 7. Integridad e infectividad de los dímeros de PepGMV.....	40
Figura 8. Identificación por PCR del PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística..	41
Figura 9. Plantas inoculadas con PepGMV 14 ddi..	42
Figura 10. Identificación por PCR de PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. Saladito (SAL 276), Veracruz Santa Rosa (VERSRCH).....	43
Figura 11. Plantas inoculadas con PepGMV 14 ddi. A) Saladito (SAL 276), B) Veracruz Santa Rosa (VERSRCH)	43
Figura 12. Identificación por PCR del PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. Veracruz Ney Campo (VER NC), Campeche Siho (CAM 400), Campeche Siho casa 2 (CAM 406), Sonora la aduana (SON 260).....	44
Figura 13. Identificación por PCR del PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. Veracruz Ney Campo (VER NC), Campeche Siho (CAM 400), Campeche Siho casa 2 (CAM 406), Sonora la aduana (SON 260).....	44

Figura 14. Identificación por PCR de PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. Campeche Siho 398 (CAM 398), Sonora Parcela (SON 241), Yucatán San Bernardino (YUC SB), Campeche Siho 397 (CAM 397).	46
Figura 15. Plantas inoculadas con PepGMV 14 ddi. A) Campeche Siho 398 (CAM 398), B) Sonora Parcela (SON 241), C) Yucatán San Bernardino (YUC SB), D) Campeche Siho 397 (CAM 397).	46
Figura 16 Accesiones asintomáticas 14 días después de la inoculación por biobalística. i) VERSRCH, j) CAM 406, k) SON 223. Parte superior plantas control, parte inferior plantas positivas a PepGMV.	50
Figura 17. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de las accesiones de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i>	53
Figura 18. Efecto de la infección del virus en el número de hojas desarrolladas 28 días después de la inoculación de PepGMV.....	54
Figura 19. Efecto de la infección del virus en el contenido de clorofila. A) 7 días después de la inoculación. B) 14 días después de la inoculación. C) 21 días después de la inoculación D) 28 días después de la inoculación. Las barras indican las medias y el error estándar.	55
Figura 22. Efecto de la infección con PepGMV en la concentración de fenoles 14 días después de la inoculación. Las barras representan las medias y el error estándar.	56
Figura 23. Efecto de la infección con PepGMV sobre la tasa de transporte de electrones. a) 7 días después de la inoculación, b) 14 días después de la inoculación, c) 21 días después de la inoculación d) 28 días después de la inoculación. Las barras indican la media y el error estándar.....	57

Índice de cuadros

Cuadro 1. Patogenia de mezclas de PepGMV en <i>Capsicum annumm</i> cultivar Anaheim..	26
Cuadro 2. Listado de accesiones utilizadas en el experimento	33
Cuadro 3. Resumen del análisis de la inoculación por cada accesión.	47
Cuadro 4. Análisis de los síntomas presentados por las accesiones	48
Cuadro 5. Análisis de varianza del contenido de clorofila.	54

Resumen

El *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) es un *geminivirus* transmitido por mosquita blanca que causa pérdidas significativas en el rendimiento y la calidad del chile, además de otros cultivos hortícolas en México. El manejo de este virus se ha basado en el control químico del insecto vector. Este método no ha sido muy efectivo, es costoso y representa un riesgo biológico. Una alternativa efectiva que no representa riesgos biológicos es el uso de genotipos resistentes o tolerantes a este patógeno. En este trabajo de investigación se analizó el efecto de la infección por biobalística del PepGMV en 14 accesiones silvestres de chile *Capsicum annum var. glabriusculum* recolectadas en diferentes estados de México. Se encontraron dos accesiones potencialmente resistentes o tolerantes al virus, que pueden ser fuentes de material biológico para ser utilizadas en programas de mejoramiento genético. Las accesiones infectadas con el virus presentaron variación en la sintomatología, que difieren en la severidad con lo reportado en otros trabajos de investigación, además se observaron individuos con diferente grado de recuperación, que varió entre las accesiones. Por otra parte, se evaluaron aspectos fisiológicos, tasa relativa de crecimiento, desarrollo de hojas, contenido de clorofila, tasa de eficiencia de transporte de electrones y contenido de fenoles. Los resultados indican que el virus no afecta de manera significativa a ninguna de estas variables. Nuestros resultados sugieren que la variabilidad genética que presenta esta especie le ha permitido coevolucionar y persistir en el medio, siendo una alternativa para el desarrollo de cultivares resistentes o tolerantes al PepGMV.

Abstract

Pepper golden mosaic virus (PepGMV) is a whitefly-transmitted *geminivirus* causing significant yield and quality losses in pepper and other horticultural crops in Mexico. The management of this virus has been based mainly on the chemical control through the use of insecticides against vector insects. This method has been partially effective, costly, and represents a biohazard. An effective alternative, without bio-risk, and accepted for the integrated management of *begomovirus*, is the development of resistant or tolerant genotypes against this pathogen. Here, the effect of PepGMV biobalistic infection was analyzed in 14 wild accessions of wild pepper *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* collected in different states of Mexico. Our results suggest that two virus resistant or tolerant accessions were found, that have the potential to be used in genetic improvement programs. The virus infected accessions presented variation in the symptoms that differed from that reported in other research papers, and individuals with different degrees of recovery were observed, which varied between the accessions. On the other hand, physiological aspects as relative growth rate, leaf development, chlorophyll content, rate of electron transport efficiency and phenol content were evaluated. The results indicate that the virus does not significantly affect any of these variables. Our results suggest that the genetic variability that this species presents has allowed it to coevolution and persist in the environment, being an alternative for the development of cultivars resistant or tolerant to the PepGMV.

Introducción

México es considerado centro de domesticación y de diversificación de cultivos de importancia mundial, entre los cuales se encuentra el maíz, el frijol, la calabaza, el amaranto, el tomate verde, la vainilla, el nopal y el chile (*Capsicum* spp.). Este último es uno de los condimentos más importantes a nivel mundial. Se han reportado de 28 a 30 especies de *Capsicum*, de las cuales cinco especies son las más importantes económicamente: *C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. pubescens* y *C. baccatum*. De acuerdo con la superficie cultivada e importancia económica, *C. annuum* es la especie más importante en México y en todo el mundo (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

En nuestro país se encuentra la mayor diversidad de la especie *Capsicum annuum* L., entre los que se incluyen las variedades Jalapeño, Ancho, Guajillo, Pasilla, Serrano, Poblano, Pimiento Morrón, entre otros. Para el año 2017 se registró una producción de 3 millones 54 mil toneladas, con un valor de 22 mil millones de pesos, ubicándose en el lugar número 5 en las hortalizas de mayor exportación en México, generando un ingreso cercano a los 800 millones de dólares (SAGARPA, 2017).

En los últimos 5 años en México, la producción de chiles se ha visto afectada por la presencia de plagas y enfermedades, en especial por el patosistema mosca blanca-begomovirus, provocando pérdidas económicas que van del 20 al 80% en el rendimiento (Hernández-Espinal *et al.*, 2018). Ante esta problemática, se han desarrollado planes de control químico contra el insecto vector, que si bien han logrado contener el problema de manera parcial, no han sido los adecuados, debido a que los insecticidas utilizados son altamente tóxicos, costosos y biopeligrosos (Retes-Manjarrez *et al.*, 2016).

Una alternativa de control de begomovirus, aceptable desde el punto de vista ambiental es el uso de genotipos resistentes a este grupo de patógenos. En el cultivo de tomate, el control de begomovirus se ha llevado a cabo en todo el mundo con el uso de cultivares resistentes (Shankarappa *et al.*, 2008).

Para el caso del cultivo de chile, no se tienen variedades o híbridos con resistencia o tolerancia a begomovirus, sin embargo, se ha reportado que las variedades silvestres en general son una fuente de genes de resistencia hacia plagas y enfermedades (Retes-

Manjarrez *et al.*, 2017). Hernández-Verdugo *et al.* (2001) y Godínez-Hernández *et al.* (2001), reportaron fuentes de resistencia al begomovirus virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV), en poblaciones silvestres de *C. annuum* var. *glabriusculum* y *C. chinense*, respectivamente.

A pesar de la gran diversidad de chiles silvestres presentes en territorio mexicano, son pocos los trabajos dedicados a su conservación y uso como materiales en programas de mejoramiento genético. Actualmente, la diversidad de chiles silvestres ha ido disminuyendo por factores como la presencia de plagas, enfermedades, abandono del cultivo, introducción de variedades mejoradas y cambio de uso de suelo (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

Esta situación es alarmante ante la vulnerabilidad que presentan actualmente las variedades comerciales de *Capsicum annuum* L. frente a los begomovirus. Por ello, el análisis de tolerancia al PepGMV planteado en este trabajo de investigación pretende ser una herramienta para caracterizar aquellas accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* que tengan potencial para formar parte de programas de mejoramiento genético, aprovechando este recurso fitogenético y promoviendo su conservación.

CAPÍTULO I.

ANTECEDENTES

Capsicum annuum L. var. glabriusculum

Dentro de la especie *Capsicum annuum* L. existen dos grupos, los cultivares comerciales que se caracterizan por tener frutos grandes, *C. annuum* var. *annuum* y otro de frutos pequeños *C. annuum* var. *glabriusculum* (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010). Ésta segunda es considerada como el ancestro o progenitor de las formas cultivadas.

C. annuum var. *glabriusculum* se distribuye en Centro América, México y Suroeste de los Estados Unidos. Es una planta arbustiva, perenne, con ramificaciones, que pueden alcanzar hasta 2 metros de altura (Aguilar-Rincón *et al.*, 2010).

Aspectos taxonómicos

Una de las características más sobresalientes del género *Capsicum* es la gran diversidad que presenta en cuanto al fruto, color, forma, sabor, tamaño y contenido fitoquímico (Zhigila *et al.*, 2014). Actualmente, la clasificación de los chiles silvestres aun es compleja. Se han utilizado diferentes nombres para esta variedad: *C. annuum* L. var. *minus*, *C. annuum* L. var. *baccatum*, *C. annuum* L. var. *minimum*, *C. annuum* var. *aviculare* y *C. annuum* L. var. *glabriusculum* (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). El nombre científico aceptado hoy en día para los chiles silvestres es *C. annuum* L. var. *glabriusculum*. Una situación similar existe en su nombre común, ya que recibe diferentes nombres como chile piquín, chiltepín, chiltepillo, chilpaya, chile mashito, chile de monte y chile parado (entre otros), dependiendo las diferentes regiones de México (Lizarde *et al.*, 2011).

Zonas de distribución

El chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) crece en una gran variedad de hábitats con suelos profundos, en regiones xéricas en el desierto de Sonora o asociado con árboles nodriza y en bosques tropicales (González-Jara *et al.*, 2011). Se les puede encontrar cerca de zanjas y caminos en gran parte del territorio de Centroamérica en asociación con malezas (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). En las regiones desérticas, crece cerca de los cursos de agua y en los cañones de las zonas montañosas. Se ha observado que necesitan

estar rodeados de vegetación para aprovechar la sombra, la humedad y la fertilidad del suelo (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016).

Durante la década de los ochenta, la cosecha de chile silvestre se convirtió en una actividad económica importante, principalmente para las poblaciones rurales en el centro y norte de México (González-Jara *et al.*, 2011). El fruto del chiltepín se cosecha de las poblaciones naturales y cultivadas como una especia y también se utiliza en la medicina tradicional (Pagán *et al.*, 2010). La cosecha estacional es una actividad para mujeres, hombres, jóvenes, niños y personas mayores (Bañuelos *et al.*, 2008) y puede aumentar los ingresos familiares hasta en un 45%. Las frutas verdes del chile en el norte de México cuestan hasta \$800 por kg, mientras que las frutas rojas pueden llegar a \$2000 por kg (Montes-Hernández, 2010). Se ha estimado que la cosecha total de chiltepín es de aproximadamente 50 toneladas métricas por año (González-Jara *et al.*, 2011). Las exportaciones a California y Arizona alcanzan hasta 6 toneladas por año de frutos rojos secos. En los últimos años, su cultivo ha aumentado a monocultivos en pequeños campos tradicionales, posiblemente como resultado de la creciente demanda y la reducción de las poblaciones silvestres (González-Jara *et al.*, 2011).

Importancia de la diversidad genética en plantas

La pérdida de la diversidad genética de las especies vegetales es una amenaza para la biodiversidad. Entre los principales agentes causales de esta reducción se encuentran: los cambios en la ecología, la explotación no controlada de especies silvestres, el cultivo, manejo y domesticación de especies de interés comercial. La deriva genética asociada a los cuellos de botella poblacionales provocados por el proceso de domesticación, son consecuencia directa de la pérdida de la variación genética (González-Jara *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2017).

En los inicios de la agricultura se utilizó un número limitado de individuos por especie progenitora, con rasgos relacionados con el rendimiento en general, la cosecha y consumo. Como consecuencia, este proceso de selección produjo cuellos de botella que han resultado en una reducción en la variación genética en los cultivos actuales (Buckler *et al.*, 2001; Hamernik *et al.*, 2009) (Figura 1).

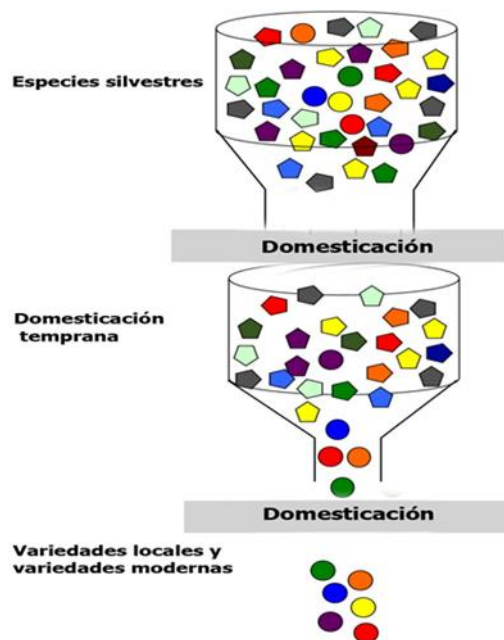


Figura 1. Disminución de la diversidad genética de los cultivos actuales debidos a eventos de cuellos de botella (Zhang *et al.*, 2017).

Algunos ejemplos de cultivos donde se ha demostrado esta disminución en la variación genética es en la soya cultivada, donde se estima que ha perdido más de la mitad de la variación genética (Zhou *et al.*, 2015). En maíz se describe una pérdida de genes de hasta un 4% durante la selección artificial (Wright *et al.*, 2005) y en arroz cultivado se ha reducido significativamente en comparación de su contraparte silvestre (Xu *et al.*, 2012).

Las plantas silvestres están adaptadas al medio en el que viven, soportan los cambios en el clima, el suelo y sobre todo a los enemigos naturales. Por ello juegan un papel importante en el mejoramiento genético. El cultivo de trigo se vio afectado en 2015 por la salinidad, esto llevó a pérdidas en rendimiento. Para solucionar este problema, en Australia se generó una variedad comercial de trigo tolerante a salinidad mediante la introducción de un alelo de su contraparte silvestre *Triticum monococcum*, mostrando un incremento de 25% en suelos salinos en comparación con el cultivar comercial (Munns *et al.*, 2012). En el cultivo de maíz en Estados Unidos, la producción de grano se redujo 50% debido al tizón, esto se resolvió transfiriendo a las líneas comerciales alelos resistentes al tizón provenientes del pariente silvestre de maíz mexicano *Tripsacum dactyloides* L. (Maxted, 2009).

Otro de los cultivos importantes a nivel mundial que ha sido mejorado genéticamente a partir poblaciones silvestres es el tomate *Solanum lycopersicum*. Se han encontrado rasgos de resistencia a bacterias, virus, hongos, nematodos y plagas en sus parientes silvestres, en los que se incluyen *Solanum habrochaites*, *Solanum peruvianum*, *Solanum pennellii* y *Solanum pimpinellifolium* (Zhang *et al.*, 2017). Los ejemplos antes mencionados demuestran que existe una gran diversidad genética contenida en los parientes silvestres de diversos cultivos y en su gran mayoría no se han explorado a profundidad.

Diversidad genética de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*

La diversidad genética y los cambios alélicos entre cultivares, variedades locales y accesiones silvestres de la especie *Capsicum annuum* se han estudiado con el uso de marcadores moleculares. En estos trabajos se reporta que existe variabilidad genética entre las variedades silvestres y cultivadas, sugiriendo cambios en las frecuencias alélicas y la subsiguiente pérdida de diversidad durante el proceso de transición (González-Jara *et al.*, 2011).

Con la finalidad de contribuir a la comprensión biológica y evolución de diferentes grupos de *Capsicum*, Qin *et al.* (2014) realizaron estudios genómicos de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum*. Los autores encontraron que la selección artificial durante el proceso de domesticación y la mejora intensiva moderna, juegan un papel importante en el origen y diversidad genética de las variedades cultivadas. Se encontraron en promedio 9,825,526 variaciones de nucleótidos simples y 237,509 inserciones/delecciones en *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. De igual manera, se detectaron regiones dentro del genoma relacionadas al proceso de domesticación en la especie cultivada, que fueron utilizadas para detectar la reducción de la diversidad genética. Se identificaron un total de 115 regiones correspondientes al 2.6% del genoma, que contienen alrededor de 511 genes relacionados principalmente con la regulación de la transcripción, el estrés, las respuestas de defensa, el crecimiento y el desarrollo del fruto. De estos genes, 34 son factores de transcripción, incluida la proteína activadora (AP2), el factor de unión al elemento sensible al etileno (ERF), las familias básicas de hélice-bucle-hélice (bHLH) y 10 proteínas de resistencia a enfermedades que contienen el dominio NB-ARC. Este conjunto de genes está relacionado con las diferencias morfológicas y

fisiológicas entre los chiles cultivados y los silvestres (Qin *et al.*, 2014). Los chiles silvestres presentaron mayor diversidad genética que las variedades cultivadas (Qin *et al.*, 2014).

Geminivirus

La familia *Geminiviridae* es una de las más grandes e importantes de virus de ADN de plantas superiores, tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas de importancia económica, en las regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo. La incidencia y gravedad de las enfermedades causadas por este grupo de patógenos se ha incrementado en los últimos 20 años (Malathi, 2017).

De acuerdo con el ICTV (2020), la familia *Geminiviridae* está integrada por nueve géneros: *Begomovirus*, *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Capulavirus*, *Grablovirus*, *Becurtovirus*, *Eragrovirus*, *Topocuvirus* y *Turncurtovirus*. Todos los genomas de esta familia están compuestos por ADN monocatenario (ADNss) de 2.5-3.0 kb, que se empaqueta en viriones y ADN bicatenario en su estado replicativo (ADNds), que se transcribe en el núcleo de las células vegetales infectadas (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

De los nueve géneros, tres son agentes causales de enfermedades que causan mayores pérdidas en cultivos de importancia económica. Entre ellos están los *Mastrevirus*, los *Curtovirus* y los *Begomovirus*. Los *Mastrevirus* son transmitidos por saltadores de hoja, tienen un solo componente genómico (monopartita), infectan plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas y se distribuyen principalmente en el Viejo Mundo (Europa, África y Asia). Los *Curtovirus* comparten el mismo vector y tienen un solo componente genómico (monopartita), están limitados a plantas dicotiledóneas en el Nuevo Mundo (América) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013). Los *Begomovirus* son virus de ADN circular de cadena simple, que pueden ser monopartitas o bipartitas, que son transmitidos de manera persistente circulativa por la mosquita blanca, *Bemisia tabaci*, causando daño a cultivos básicos y ornamentales en todo el mundo (Czosnek *et al.*, 2017).

Los genomas de los geminivirus (Figura 2), se organizan con unidades de transcripción divergentes y en una región intergénica 5' que contiene el origen de la replicación del círculo rodante y dos promotores de la ARN polimerasa II. La proteína de la cubierta (CP), forma la cápside viral y participa en la transmisión del vector. La CP también funciona como la

proteína lanzadera nuclear (NSP) para los virus monopartitas y en algunos casos para los bipartitas. Todos los virus monopartitas y algunos bipartitas codifican ORFs pequeños en antisentido del virus. Las proteínas V2 y AV2 funcionan como proteínas anti-defensa de las plantas, ya que inhiben el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) del hospedero. La proteína V2 también proporciona la función de movimiento para virus monopartitas. La proteína iniciadora de la replicación (Rep), es la encargada de iniciar la replicación viral. Los curtovirus y los begomovirus codifican tres ORF adicionales. La proteína activadora de la transcripción (TrAP y la proteína C2 relacionada), interfiere con el silenciamiento transcripcional de genes (TGS) y el PTGS. TrAP también es un factor de transcripción requerido para la expresión de CP y NSP en begomovirus bipartitas. La proteína potenciadora de la replicación (REn; también conocida como C3) está involucrada en la replicación viral. C4 (o AC4 en algunos virus) contrarresta el PTGS. Los begomovirus bipartitas codifican sus proteínas de movimiento, NSP y MP en el componente B. Los betasatélites de los begomovirus monopartitas codifican β C1, que contrarresta el TGS y los alfasatélites codifican su propia Rep, que también es una proteína contra el silenciamiento viral del huésped (Roshan *et al.*, 2017).

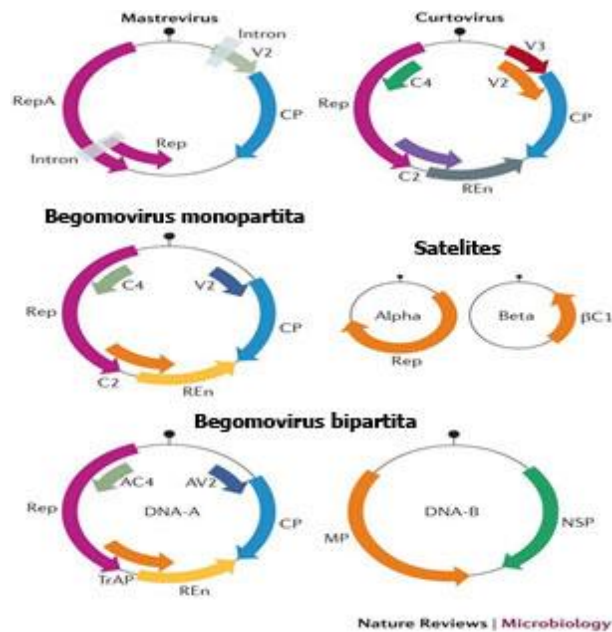


Figura 2. Organización del genoma de geminivirus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013)

Begomovirus

Son virus de ADN monocatenario circular (ADNcs), encapsulados en partículas icosaédricas geminadas. Estos virus tienen como vector específico a *Bemisia tabaci* y son transmitidos de manera persistente circulativa. Los begomovirus son el género más grande dentro de los geminivirus, con más de 468 especies (ICTV, 2020). Este género se divide en dos grupos, de acuerdo con la organización de su genoma y las relaciones filogenéticas: virus del viejo mundo (OW) (Africa, Asia, Europa, Australia), conformados por begomovirus monopartitas y virus del nuevo mundo, en su mayoría begomovirus bipartitas (NW) (hemisferio occidental, América) (Figura 2) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

El genoma de los begomovirus bipartitas consta de dos componentes de ADN de cadena sencilla circular (2.5-2.7 kb), denominados componente A y componente B. A diferencia de esto, los begomovirus monopartitas carecen del componente B, el cual codifica para las proteínas relacionadas al movimiento y la virulencia. En algunos casos están asociados a moléculas denominadas satélites, que ayudan en la etapa replicativa del virus (Roshan *et al.*, 2017).

El componente A está compuesto por 6 marcos de lectura abierta (ORF): AV1/ V1 y AV2/ V2 en un sentido y AC1/ C1, AC2/ C2, AC3/ C3 y AC4/C4 en orientación antisentido. El genoma B tiene solo dos marcos de lectura abierta (ORF): BV1 en sentido y BC1 en antisentido. Estos marcos de lectura abierta se encuentran separados por una región intergenica (IR), que tiene una región común (CR), que consiste en nucleótidos conservados entre el componente A y el componente B (Roshan *et al.*, 2017).

Ciclo de vida de los begomovirus

El ciclo de vida de los begomovirus inicia en el momento que la mosquita blanca adquiere el virus, por medio de alimentarse de una planta infectada (periodo de adquisición), a través del floema. Una vez ingerido el virus hay un periodo de latencia, donde el virus se transloca a lo largo del canal alimenticio y alcanza el esófago 10 minutos después de la ingesta, 40 minutos después llega al intestino medio, donde pasa a la hemolinfa por endocitosis a través de vesículas. En este punto el virus puede ser destruido por las proteasas y nucleasas presentes en la hemolinfa, sin embargo, la cápside viral interactúa con una proteína chaperona (GroEL) producida por las bacterias endosimbiontes *Hamiltonella* y *Rickettsia*,

que protegen al virus en su paso por la hemolinfa hasta las glándulas salivales (Rosen *et al.*, 2015; Czosnek *et al.*, 2017).

Por último, al alimentarse de una planta sana, la mosquita blanca transmite los viriones a las células asociadas al floema o células acompañantes (periodo de inoculación) (Figura 3). Una vez que las partículas virales llegan a las células acompañantes del floema, en el núcleo de la célula, el ADNmc viral se libera de la cápside y es convertido en ADN de doble cadena con ayuda de las ADN polimerasas del hospedero, utilizando oligonucleótidos de ARN para cebar la síntesis de la cadena complementaria. El ADNbc se transcribe en el nucleosoma por la ARN polimerasa II del huésped, lo que permite la producción de la Rep. Esta proteína inicia la replicación viral, que se produce mediante una combinación de replicación de círculo rodante y replicación dependiente de la recombinación. El ADNmc circular generado se empaqueta en viriones después de que se produce la CP. La infección se propaga dentro de la planta por el movimiento del ADN viral del núcleo a la siguiente célula del floema vía plasmodesmos, a través de la acción de dos proteínas de movimiento viral, la proteína NSP y la proteína MP (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013).

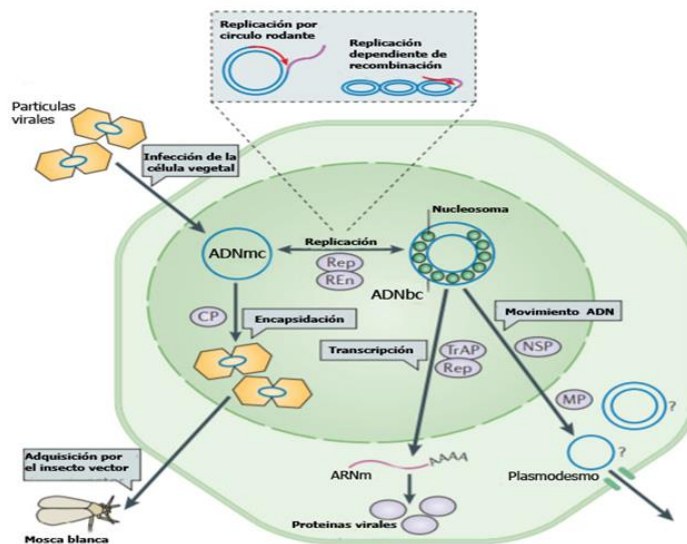


Figura 3. Ciclo de vida de los begomovirus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2013)

Pepper golden mosaic virus

El *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), es uno de los *Begomovirus* más importantes y ampliamente distribuidos en todo México e infecta cultivos de la familia *Solanaceae*, incluyendo el chile (*Capsicum annuum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y el tomatillo o tomate verde (*Physalis ixocarpa*) (Pacheco, 1996). El PepGMV se reportó por primera vez en Texas en 1990 por Stenger, conocido hasta ese momento como un geminivirus que infectaba al cultivo de chile en Texas (Texas pepper geminivirus, TPGV) en chiles jalapeños, así como en otras plantas como *Datura stramonium*, *Solanum lycopersicum*, *Lycopersicon peruvianum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii* y *Physalis wrightii*. Brown *et al.* (1990) lo describieron como el Virus del mosaico dorado del serrano (Serrano golden mosaic virus, SGMV) en cultivos de chile y tomate en el estado de Sinaloa.

Actualmente el PepGMV está presente en los estados de Arizona y Texas al sur de los Estados Unidos, en todo el territorio mexicano y en Centro América en Guatemala, Honduras, Costa Rica y Nicaragua (Figura 3) (EPPO, 2018).

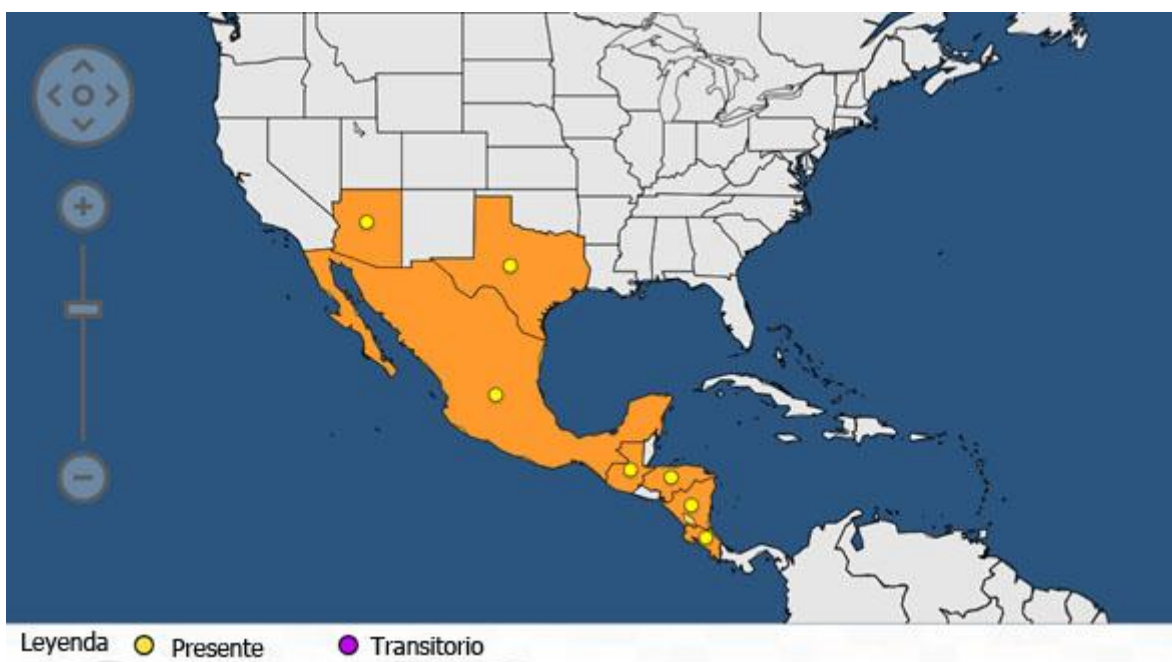


Figura 4 . Distribución mundial de PepGMV (EPPO, 2018).

La sintomatología que causa el PepGMV en la planta se describe como un mosaico amarillo brillante en las hojas, que se asocia con deformación de las hojas y los frutos, plantas atrofiadas y disminución del rendimiento (Holguín-Peña *et al.*, 2004). Brown *et al.*,(2005), aislaron tres cepas del PepGMV, PepGMV-D (Distorsión), PepGMV-Mo (Mosaic) y PepGMV-Ser (Serrano), que comparten un porcentaje de identidad en el componente A del 92-94% y 84-94% en el componente B (Figura 5). La diferencia de estas cepas se basa principalmente en la sintomatología que provocan en *Capsicum annuum* cultivar Anaheim. Las cepas PepGMV Serrano y PepGMV Mosaico, inducen un mosaico sistémico. En el caso del PepGMV-Mo el mosaico es verde-amarillo, el PepGMV-Ser induce un mosaico dorado clorótico en comparación con el mosaico causado por el PepGMV-Mo. El PepGMV-D causa distorsión de las hojas y los síntomas de deformación producidos se restringen a las hojas inoculadas (Brown *et al.*, 2005). Las plantas de pimiento inoculadas con el PepGMV-D en algunos casos presentan un fenotipo de recuperación en las hojas y en algunos casos las hojas nuevas no presentan síntomas (Brown *et al.*, 2005).

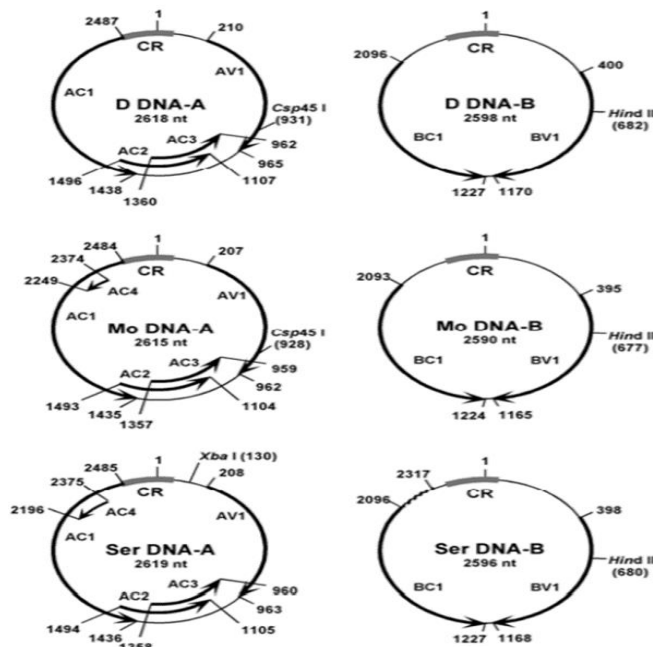


Figura 5 . Mapas de organización del genoma de tres cepas del *Pepper Golden Mosaic Virus* (PepGMV). Los mapas circulares muestran los componentes de ADN-A y ADN-B para las cepas de distorsión (D), mosaico (Mo) y Serrano (Ser) de PepGMV (Brown *et al.*, 2005).

A pesar de no tener el 100% de identidad, Brown *et al.*,(2005) demostraron que al inocular por biobalística el componente A de una cepa con el componente B de otra cepa, el virus es infectivo, ocasionando síntomas en las plantas de *Capsicum annuum* cultivar Anaheim. Estas combinaciones fueron caracterizadas de igual manera por la sintomatología, como se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1. Patogenia de mezclas de PepGMV en *Capsicum annuum* cultivar Anaheim

Componente A	Componente B	Sintomatología
Distortion	Mosaic	Mosaico amarillo, enrollamiento de la hoja y venas de las hojas claras o traslúcidas.
Distortion	Serrano	Mosaico amarillo, enrollamiento de la hoja y venas de las hojas claras o traslúcidas.
Mosaic	Distortion	Enrollamiento de la hoja, mosaicos leves, distorsión de la hoja, recuperación de las plantas.
Mosaic	Serrano	Mosaico amarillo, enrollamiento de la hoja y venas de las hojas claras o traslúcidas.
Serrano	Mosaic	Mosaico amarillo, enrollamiento de la hoja y venas de las hojas claras o traslúcidas.
Serrano	Distortion	Enrollamiento de la hoja, mosaicos leves, distorsión de hojas, y recuperación de la planta.

Estrategias de defensas contra patógenos

Los patógenos ejercen una presión de selección sobre sus hospederos, disminuyen la esperanza de vida y su reproducción. No obstante, las plantas han desarrollado mecanismos de defensa para evitar ser infectadas, eliminando al patógeno o reduciendo su efecto dañino (Restif & Koella, 2004). Estos mecanismos dependen del sistema inmune de cada especie, la modificación de las superficies celulares para prevenir la infección y compensaciones durante su ciclo de vida como el crecimiento, la reproducción y supervivencia entre otras (Agnew *et al.*, 2000). Estas estrategias se agrupan en dos categorías, resistencia y tolerancia. La resistencia limita o reduce la infección, la tolerancia

disminuye o compensa el efecto dañino del patógeno, independientemente del nivel de multiplicación (Agrawal, 2011).

El concepto de tolerancia se definió por primera vez en la agricultura como la capacidad de los cultivos a sufrir pocas pérdidas en rendimiento tras la infección por patógenos (Caldwell *et al.*, 1958). Actualmente, la tolerancia es un concepto frecuente en la ecología evolutiva de las plantas. Inició con estudios de herbivoría y se expandió hasta la interacción planta-patógeno (Little *et al.*, 2010). La mayoría de estos estudios definen la tolerancia como la reducción en la severidad de síntomas, inducidos por la infección del patógeno (Pagán & García-Arenal, 2018).

El estudio de los mecanismos de tolerancia comprende tres grupos que no son mutuamente excluyentes. El primero es la tolerancia a través de la compensación de la pérdida de la actividad fotosintética debido a la infección. Se ha reportado que la infección por patógenos a menudo inhibe la fotosíntesis, dando como resultado una menor asimilación de fotosintatos. El segundo grupo es la tolerancia basada en la alteración del ciclo de vida del huésped, el cual consiste en desviar recursos de crecimiento a la reproducción (Agnew *et al.*, 2000). El tercero es la tolerancia mediante la modificación del equilibrio de fitohormonas en respuesta a la infección. Los estudios indican que los procesos de desarrollo de síntomas de la enfermedad y crecimiento del patógeno pueden desacoplarse. Por lo tanto, en muchos casos los síntomas asociados a la enfermedad representan una respuesta activa del hospedero a la presencia del patógeno, pero no influyen en su crecimiento (Xu *et al.*, 2008).

Estos mecanismos de tolerancia que han resultado de predicciones teóricas, no siempre es respaldada por la evidencia experimental, ya que cada interacción patógeno-hospedero suele ser específica. Sin embargo, con base en la literatura, se han reportado patrones en común: 1) En la mayoría de los sistemas analizados de patógenos de plantas, la tolerancia y la resistencia coexisten, indicando que estos sistemas de defensa no son excluyentes; 2) a pesar de la presencia de los alelos de la tolerancia en una población hospedera, la respuesta hacia el patógeno es específica de cada planta; 3) la tolerancia es una estrategia eficiente para reducir el efecto negativo de la infección en la aptitud del huésped y en algunos casos puede dar lugar a una compensación excesiva (es decir las plantas infectadas tienen mejor aptitud que las plantas no infectadas); 4) ante la propuesta de que la tolerancia favorece a una mayor multiplicación del patógeno, esta asociación rara vez ha

sido explorada y los pocos informes publicados no encontraron evidencia de una asociación positiva entre la aptitud positiva de la planta y el patógeno (Pagán, 2018).

Los estudios de la tolerancia en las plantas utilizan como variable dependiente la aptitud de éstas frente a los patógenos. Las variables para evaluar la aptitud física dependen del contexto (virulencia del patógeno), la pregunta abordada y las limitaciones experimentales de cada caso de estudio (Day, 2002).

Otra estrategia de defensa ante los patógenos es la resistencia. Un patógeno no es capaz de infectar a todas las especies de las plantas, esto se debe a un mecanismo llamado resistencia de no-hospedero (NHR), que es una forma de resistencia genérica y no específica, que es común en todas las plantas. Se puede dividir en tipo 1, que incluye mecanismos de defensas básicos como son los metabolitos secundarios, aumento en el grosor de las paredes celulares y el entorno y el tipo 2 que está asociado con la necrosis del tejido en el sitio de infección, que se produce una vez superada la resistencia del tipo 1 y es sintomática a diferencia de la resistencia de tipo 1, que por lo general es asintomática. En este segundo tipo, los patógenos son detectados por diferentes estructuras o proteínas asociadas a éste y el reconocimiento de estos patrones, llamados MAMPs o PAMPs, (según el origen del patógeno), induce una respuesta inmune conocida como resistencia de inmunidad desencadenada por patógeno (PTI por sus siglas en inglés) reduciendo la virulencia del patógeno y limitando su reproducción (Gouveia *et al.*, 2017).

Manejo de los begomovirus

Actualmente el manejo de los begomovirus se basa principalmente en el control químico contra los insectos vectores y la eliminación de arvenses o maleza, considerados hospederos alternos. Este método ha sido parcialmente efectivo, costoso y representa un riesgo biológico (Borah & Dasgupta, 2012). Una alternativa efectiva, sin riesgo biológico y aceptada para el manejo integrado de los Begomovirus es el desarrollo de genotipos resistentes a este grupo de patógenos (Shankarappa *et al.*, 2008).

Según Valkonen (1994), las variedades resistentes a virus tienen ventajas, ya que no requieren insumos adicionales para el control de virus/vectores y pueden aumentar la

rentabilidad en la producción a medida que aumentan los rendimientos, tanto de manera cualitativa como cuantitativa.

Los genes presentes en *Solanum peruvianum*, *S. chilense*, *S. pimpinellifolium* y *S. habrochaites* son ejemplos de resistencia contra la infección por begomovirus en tomate (Prasanna *et al.*, 2015). Se ha demostrado que la mayoría de estas fuentes de resistencia permiten la replicación de virus en las plantas. Sin embargo, el nivel de acumulación del virus es más bajo en comparación de los niveles en cultivares susceptibles. Está bien establecido que el nivel de virus en líneas de tomate que llevan Ty-1 / Ty-3 es <10% del nivel encontrado en cultivares susceptibles (Borah & Dasgupta, 2012).

Se ha reportado un amplio rango de variabilidad para los cultivos de *Capsicum annuum* y sus parientes silvestres (Hernández-Verdugo *et al.*, 2001; González-Jara *et al.*, 2011; Pacheco-Olvera *et al.*, 2012). Esto implica el potencial para utilizar dicha variabilidad en los programas de mejoramiento de cultivos, así como una fuente importante de resistencia a patógenos como los begomovirus. Los parientes silvestres de los chiles cultivados son un valioso recurso genético y se han utilizado con éxito como fuentes de resistencia a los geminivirus, como, por ejemplo, los trabajos de Trujillo-Aguirre y Díaz-Plaza (1995) y Godínez-Hernández *et al.* (2001), que encontraron resistencia al PHYVV y al PepGMV en poblaciones de *Capsicum chinense* del sureste de México. Kumar *et al.* (2006) reportaron tres fuentes de resistencia al begomovirus PepLCV y Hernández-Verdugo *et al.* (2001) y Retes-Manjarrez *et al.* (2016), encontraron resistencia al PHYVV en poblaciones silvestres de *Capsicum annuum* del noroeste de México.

Se ha demostrado que para que un rasgo agronómico esté sujeto a selección en programas de mejoramiento genético, debe tener una base genética y debe ser heredable (Retes-Manjarrez *et al.*, 2017). La heredabilidad se define como la proporción de la varianza fenotípica total de una población que es atribuible a los efectos de los genes (Shankarappa *et al.*, 2008). La heredabilidad en sentido amplio se basa en la relación entre la variación genética total y la variación fenotípica total. La heredabilidad en sentido estrecho mide la proporción de la variación que se debe a los efectos aditivos de los genes en una población específica. La heredabilidad en sentido estricto es más importante, porque proporciona una medida del valor de reproducción de una población y determina el ritmo al que la media de la población evoluciona en respuesta a la selección natural o artificial (Shukla & García-

Arenal, 2018). La respuesta a la selección observada lleva a estimar la heredabilidad en sentido estricto, también llamada "heredabilidad realizada" (h^2). El h^2 es un parámetro genético importante que cuantifica la proporción de varianza fenotípica en un rasgo atribuible solo a la variación genética aditiva generada por todas las variantes causales y por lo tanto excluye la contribución debida a la varianza dominante y epistática (Yang *et al.*, 2017). Las estimaciones de h^2 entre los rasgos pueden ayudar en la selección de estrategias de reproducción y en la selección del material parental (Wehner *et al.*, 2017).

Retes-Manjarrez *et al.* (2016) reportaron que el rasgo de resistencia al PHYVV es heredable en la primera generación en tres líneas (UAS12, UAS13 y UAS10), derivadas de poblaciones silvestres de *Capsicum annuum* del noroeste de México. Por otro lado, Retes-Manjarrez *et al.*, (2016) reportaron que este rasgo de resistencia era heredable de manera relativamente estable en las tres líneas mencionadas anteriormente, en su segunda y tercera generación de selección. Sin embargo, observaron una respuesta positiva a la selección en la línea UAS12 en su tercera generación, mientras que las líneas UAS13 y UAS10 no mostraron respuesta a su selección en esta misma generación. Por lo tanto, plantearon la hipótesis de que estas dos últimas líneas mencionadas son relativamente estables en términos de homocigosidad y la línea UAS12 todavía tiene una variación genética para continuar aplicando la selección para mejorar el rasgo resistente en este genotipo (Retes-Manjarrez *et al.*, 2017) .

Justificación

Los parientes silvestres de las plantas cultivadas son un recurso genético importante que constituye un acervo de genes primario, que puede ayudar a resolver problemas de la agricultura actual, tales como tolerancia o resistencia a plagas, enfermedades o aumentar la calidad y productividad. En este sentido, el conocimiento de la tolerancia al begomovirus PepGMV es de interés para poder caracterizar aquellas accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, potenciales para formar parte de programas de mejoramiento genético que ayude a combatir a este grupo de patógenos, aprovechando este recurso fitogenético y promoviendo su conservación.

Hipótesis

Si las plantas de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* son fuente de genes de defensa contra patógenos, entonces las accesiones silvestres presentarán variación en la respuesta a la infección con el PepGMV.

Objetivos

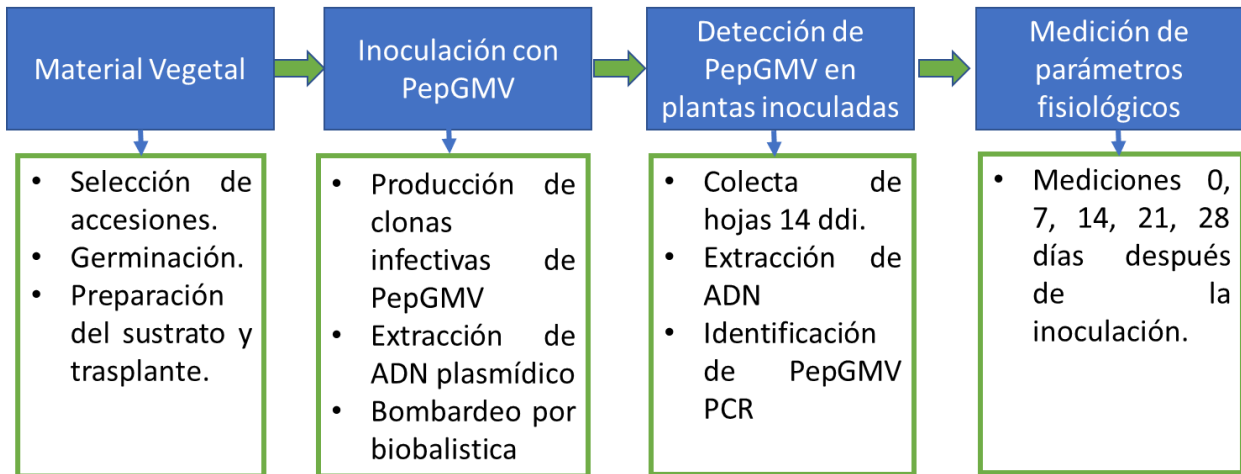
Objetivo general

Evaluar la tolerancia en accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* al PepGMV.

Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la inoculación con PepGMV en 14 accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.
- Analizar la sintomatología viral en las hojas de las 14 accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.
- Evaluar caracteres fisiológicos relacionados al crecimiento y desarrollo de la planta ante la infección del PepGMV.

Estrategia experimental



CAPITULO II.

METODOLOGÍA

Material vegetal

Se seleccionaron para este trabajo 14 accesiones de *C. annuum* var. *glabriusculum* procedentes de diferentes regiones de México (Cuadro 2), de la colección de germoplasma del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución en la Facultad de Ciencias, UABC.

Cuadro 2. Listado de accesiones utilizadas en el experimento

Región	Población	Localidad	Accesión
Noroeste	Sonora	San Javier	SON 223
Noroeste	Sonora	Parcela	SON 241
Noroeste	Sonora	La aduana	SON 260
Noroeste	Sonora	Mazocahui	MAZ 259
Noroeste	Jalisco	Chamela	JAL CHA
Noroeste	Sinaloa	Saladito	SAL 276
Sureste	Veracruz	Santa rosa	VERSRCH
Sureste	Veracruz	Santa rosa	VERSRGD
Sureste	Veracruz	Ney Camp	VER NC
Sureste	Campeche	Siho	CAM SH 400
Sureste	Campeche	Siho	CAM SH 406
Sureste	Campeche	Siho	CAM 397
Sureste	Campeche	Siho	CAM 398
Sureste	Yucatán	San Bernardino	YUC SB

Establecimiento de material vegetal

Una de las características más relevantes del chiltepín, es su baja tasa germinativa, producto de un periodo de latencia. Por lo anterior, para el proceso de germinación se aplicó un tratamiento previo con ácido giberélico a una concentración de 500 ppm, durante 24 horas para estimular la geminación (Ballina-Gómez *et al.*, 2013; Cano-Vázquez *et al.*, 2015; Hernández-Verdugo *et al.*, 2019). Las semillas de las 14 accesiones se establecieron en macetas de 750 gramos, utilizando *Peat moss* como sustrato. Tres semanas después de la germinación, se trasplantaron en macetas individuales de 250 gramos y se etiquetaron de acuerdo con su localidad, el número de planta asignado y el tratamiento, con la finalidad de mantener la identidad de estas. Las macetas se regaron diariamente para mantener la humedad. Se utilizó una mezcla de fertilizante soluble 19-19-19 N-P-K dos veces por semana, además de un monitoreo diario por plagas, para evitar la contaminación.

Inoculación de las plantas con PepGMV por biobalística

Las accesiones (5 repeticiones/accesión) se inocularon 40 días después de la siembra, cuando estas presentaron en promedio 4 hojas verdaderas. La inoculación se realizó utilizando microproyectiles de oro de 1 μm de diámetro, recubiertas de ADN viral (PepGMVAdimpBS + PepGMVBdimpBS) a una concentración de 5 microgramos del componente viral. La inoculación por bombardeo se realizó con un equipo portátil de fabricación artesanal, utilizando gas HE, a 3 cm de distancia de la planta, con un ángulo de 45° y una presión de 60 psi. La metodología para la preparación de las partículas de oro y el ADN plasmídico se describen a continuación.

Clonas infectivas del PepGMV

Las clonas utilizadas para la inoculación fueron donadas por el Dr. Rafael Rivera Bustamante, del Laboratorio de Virología Vegetal del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato y corresponden a dímeros del PepGMV construidos y descritos por Carrillo-Tripp *et al.* (2007) (Figura 6).

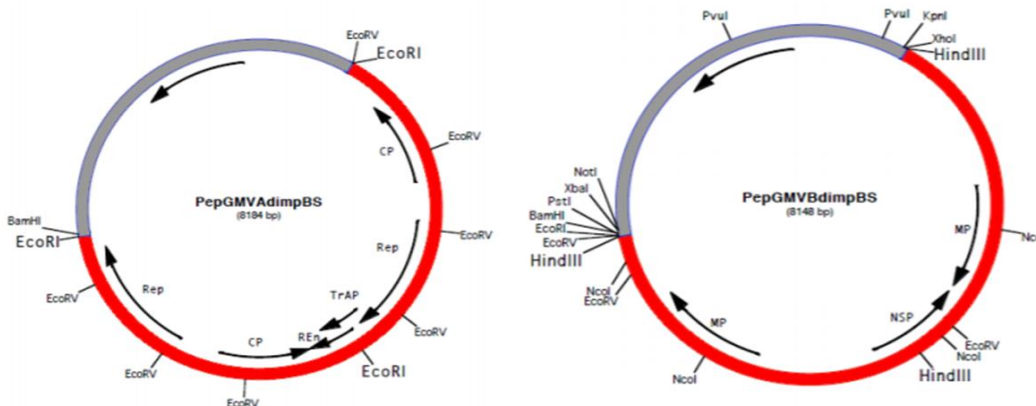


Figura 6. Representación gráfica de los dimeros del PepGMV A y PepGMV B (Carrillo-Tripp et al., 2007).

Transformación de bacterias con los dimeros del PepGMV

Para la transformación y multiplicación de las clonas infectivas se utilizaron 100 µl de células competentes DH5-Alfa de *E. coli*, se adicionaron 100 ng de ADN de cada uno de los plásmidos que contienen a los componentes A y B del PepGMV y se incubó en hielo durante 20 minutos. Al término se colocó en baño María a 42° C durante 45 segundos e inmediatamente se incubó en hielo durante 2 minutos, se agregó 1 ml de medio SOC y se incubó para crecimiento durante 2 horas en agitación (200 rpm) a 37° C. Se seleccionaron colonias y se crecieron en 5 ml de medio LB durante 16 horas en agitación (200 rpm) a 37° C.

Extracción del ADN plasmídico

Se centrifugó a 13 000 rpm por 3 minutos 1.7 ml del cultivo *E. coli* DH5-Alfa conteniendo el virus en un tubo Eppendorf de 2 ml y se decantó el sobrenadante. Una vez obtenida la pastilla se le adicionó 0.25 ml de solución 1 (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCL pH 8.0) y se mezcló en vórtex hasta que la pastilla fue homogénea. Se le agregó 0.25 ml de solución 2 (75 ml de H₂O, 20 mg de NaOH [1N], 5 ml de SDS [20%] m/v), se agitó por inversión de 5 a 10 veces, después se le agregó 0.35 ml de la solución 3 (24.6 g de acetato de sodio, 40 ml de H₂O y se ajustó el pH a 8.0 con ácido acético glacial y se aforó a 100 ml con H₂O). Posteriormente se centrifugó a 13 000 rpm por 8 minutos, se transfirió

el sobrenadante a otro tubo Eppendorf, se le agregó 0.8 ml de etanol absoluto para precipitar el ADN, se centrifugó a 13 000 rpm por 8 minutos y se decantó el sobrenadante, después se le agregó 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a 13 000 rpm por 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla; finalmente el ADN se suspendió en 30 μ l de H₂O.

Preparación de las partículas de oro para la inoculación

Se pesaron 0.5 μ g de micropartículas de oro por planta, se adicionaron 15 μ l de etanol absoluto y se incubó en hielo durante 5 minutos. Se centrifugó en microfuga durante 5 segundos, y posteriormente se retiró el sobrenadante con una punta, y se adicionaron 15 μ l de agua estéril; nuevamente se centrifugó durante 5 segundos y se retiró el sobrenadante. Se adicionaron 6 μ l de agua estéril y se sonicó durante 20 segundos para eliminar grumos y homogenizar el tamaño de las partículas. Se adicionaron 5 μ g de ADN de cada uno de los componentes A y B. Se agregó 7.5 μ l de CaCl₂ (2.5 M) y 3 μ l de espermidina (0.1 M) y se incubó en hielo durante 10 min; nuevamente se centrifugó y se retiró el sobrenadante, finalmente se agregó 10 μ l de etanol absoluto.

Extracción del ADN vegetal

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo CTAB con modificaciones. El procedimiento se describe a continuación:

Partiendo de 0.01 gramos de tejido previamente macerado con nitrógeno líquido, se llevó a cabo el proceso de lisis en un tubo Eppendorf de 2 ml con el buffer de lisis CTAB (100 mM Tris-HCl pH 8, EDTA 20 mM pH 8, NaCl 1.4 M, CTAB 2% y β -mercaptoetanol al 0.1%) precalentado a 65° C. Una vez mezclados se incubaron los tubos Eppendorf durante 40 min a 65° C y posteriormente se centrifugaron a 13, 000 rpm durante 20 minutos a 4° C; en este paso se rescataron 700 μ l del sobrenadante y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1.7 ml. Se adicionaron 600 μ l de cloroformo:alcohol-isoamilico en una proporción 24:1, homogenizando vigorosamente; seguido de esto se procedió a centrifugar durante 20 minutos a 13, 000 rpm a 4° C, nuevamente se rescataron 550 μ l del sobrenadante y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.7 ml, adicionando 900 μ l de isopropanol, 100 μ l de acetato de sodio 3 M pH 5.2, mezclando por inversión e incubado a -20° C durante 40

minutos. Una vez terminado el tiempo de incubación se procedió a centrifugar por 10 minutos a 13,000 rpm a 4° C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 70% frío repitiendo esto dos veces, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió en 50 µl de RNAasa (10mg/ml) en una proporción 1:50 y se incubaron durante 30 min a 37° C, por último las muestras se almacenaron en congelador a -20°C.

Identificación por PCR del PepGMV en plantas inoculadas por biobalística

La identificación del PepGMV en las accesiones se realizó utilizando 20 ng de ADN total extraído de las hojas de plantas a los 14 ddi, utilizando el método CTAB. Las reacciones se realizaron en un termociclador (TC-412, Techne, Bibby Scientific Ltd, NJ EE. UU.), utilizando los cebadores forward 5-TGCCACTACCACCAAATCC-3 y reverse 5-CTCCTCTCGTGATACCCG-3 (155 pb) que amplifican un fragmento del gen de la proteína Rep del virus. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo a 94 ° C durante 5 min, 35 ciclos a 94 ° C durante 30 s, 58 ° C durante 30 s y 72 ° C durante 30 s, y luego 1 ciclo de extensión final 72 ° C durante 10 min.

Evaluación de la tolerancia al PepGMV

La evaluación de la tolerancia al virus se realizó a nivel fisiológico con la toma de los diferentes parámetros en los días 7, 14, 21 y 28 después de la inoculación. Se midió el índice de clorofila, altura de planta, número de hojas desarrolladas y parámetros relacionados con la fluorescencia de la clorofila, además se evaluó de manera visual la sintomatología viral. A nivel químico se realizó la cuantificación de fenoles por el método Folín-Ciocalteu. A continuación, se detallan las metodologías utilizadas para la medición de cada parámetro.

Clorofila

Se utilizó el clorofilómetro CCM-200 plus (Optisciences) para medir el índice de clorofila. Las mediciones se realizaron durante el curso temporal del experimento. Se analizaron tres hojas desarrolladas por cada planta, partiendo de la parte apical de la planta.

Altura y número de hojas

La altura de las plantas se midió de manera manual una vez por semana, empleando una regla graduada de 30 centímetros, los datos obtenidos se utilizaron para calcular la tasa relativa de crecimiento (TCR) utilizando la siguiente fórmula.

$$TCR = \frac{\ln(A_2) - \ln(A_1)}{t_2 - t_1}$$

Donde A1 y A2, se refiere a las mediciones de altura al inicio del experimento y después al final (transformados por el logaritmo natural), mientras que t2 y t1 se refiere a los tiempos 0 y 28 (días transcurridos entre las dos mediciones).

De igual manera se realizó el conteo de las hojas durante el tiempo del experimento, para analizar el efecto del virus en el desarrollo de las plantas.

Evaluación de la fluorescencia de la clorofila

Se seleccionaron 3 accesiones (VerSR, Saladito y Cam400) para evaluar el efecto del virus sobre la eficiencia del fotosistema II mediante la fluorescencia de la clorofila. Se utilizó el fluorómetro PAM-2000 para obtener los indicadores derivados de la fluorescencia de la clorofila: Rendimiento cuántico efectivo del PSII (Φ PSII), Rendimiento cuántico fotoquímico máximo del fotosistema II (F_v / F_m), Actividad potencial del PSII (F_v / F_0), Tasa de transporte de electrones (ETR) y la Disipación fotoquímica de la fluorescencia (qP), Disipación no fotoquímica (NPQ).

Sintomatología

La evaluación de los síntomas causados por el PepGMV se realizó a los 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación. Para ello se realizó un seguimiento fotográfico de todas las plantas; se utilizó la escala de severidad propuestos por Anaya-Lopez (2003), la escala consiste en 9 niveles. 0 = ausencia de síntomas; 1 = ligera distorsión en las hojas apicales y puntos amarillos visibles en las hojas expuestas a la luz; 2 = puntos amarillos visibles en parches aislados en hojas apicales; 3 = mosaicos aislados, puntos amarillos formando una red en la base de la hoja de las hojas apicales; 4 = mosaicos amarillos visibles claramente; 5 = hojas rizadas en la parte media; 6 = ligera curvatura de las hojas; 7 = hojas arrugadas

ligeramente distorsionadas; 8 = distorsión completa de la hoja; y 9 = hojas de plantas infectadas más pequeñas que las plantas de control.

Cuantificación de fenoles totales

Cada semana durante todo el experimento se colectó una hoja de cada planta inoculada y de las plantas control. Las hojas de las plantas se colectaron y prensaron inmediatamente. Las hojas se deshidrataron completamente en un horno de convección VWR a 33°C por 5 días. Una vez deshidratadas, se maceraron en tubos Eppendorf con ayuda de un pistilo. El peso total de la hoja macerada se calculó restando el peso del tubo Eppendorf al peso del tubo + las hojas maceradas. Se agregó 1 ml de metanol 80% (MeOH/H₂O 80:20 v/v). Después de 24 h, el extracto se centrifugó a 13,000 rpm por 5 min para precipitar los restos de hoja. Se utilizó el sobrenadante para la reacción Folin-Ciocalteu para cuantificación de fenoles totales. Se tomaron 20 µL del extracto hidrometanólico obtenido y se añadieron a un tubo de microcentrífuga con 1 ml de agua. Se adicionaron 100 µL del reactivo Folin-Ciocalteu. Posteriormente se agregaron 300 µL de NaCO₃, lo que provoca que la solución se tiña de un color azulado, proporcional a la cantidad de fenoles disueltos. La cantidad total de fenoles total se cuantificó utilizando un ensayo colorimétrico, utilizando el espectrofotómetro Genesys 20 (Thermo Scientific) con $\lambda=765\text{nm}$, usando ácido gálico como estándar (Ainsworth & Gillespie, 2007).

Se preparó una curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar. El ácido gálico es utilizado como un estándar debido a que es un fenol simple y está presente en una gran variedad de plantas (Lattanzio *et al.*, 2006), incluyendo *C. annuum* var. *glabriusculum* (Hayano-Kanashiro *et al.*, 2016). Las concentraciones de ácido gálico utilizadas fueron 0, 50, 100, 150, 250, 500, 1000, 1500, 2000 mg/L. Con los valores de absorbancia obtenidos y los valores de la curva estándar, se calculó la fórmula para determinar la concentración de equivalentes de ácido gálico (GAE) en las muestras procesadas.

Los valores obtenidos de concentración de ácido gálico a partir de la curva de calibración, junto con el volumen del extracto y la masa de la hoja, se utilizaron para calcular el contenido de fenoles (en mg de equivalentes de ácido gálico, GAE) por cada gramo de masa seca (Alara *et al.*, 2017; Siddiqui *et al.*, 2017).

CAPITULO III. Resultados

Análisis de la integridad e infectividad de los dímeros de PepGMV

Con el objetivo de demostrar la integridad e infectividad de los dímeros del PepGMV se realizaron digestiones de las clonas infectivas, además de la secuenciación de cada uno de los componentes genómicos. Para evaluar su infectividad se utilizaron 4 plantas de chile habanero variedad jaguar.

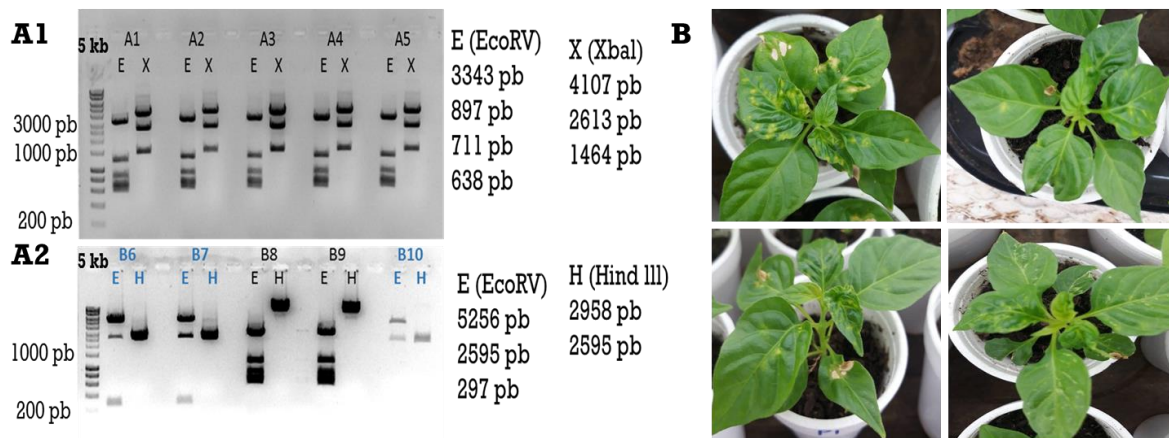


Figura 7. Integridad e infectividad de los dímeros de PepGMV. A1) Se observa en electroforesis en gel de agarosa fragmentos de ADN plasmídico del componente A de PepGMV digeridos con las enzimas EcoRV (3343 pb, 897 pb, 711 pb, 638 pb) y XbaI (4107 pb, 2613 pb, 1464 pb). A2) Fragmentos obtenidos por la digestión del componente B con las enzimas EcoRV (5256 pb, 2595 pb, 297 pb) y Hind III (2958 pb, 2595 pb). B) Plantas de chile habanero variedad jaguar 14 días después de la inoculación por biobalística.

De acuerdo con el mapa genómico de los dímeros de PepGMV generados por Carrillo-Tripp *et al.* 2007, los fragmentos observados en la digestión del componente A con la enzima EcoRV corresponden al tamaño de los 4 fragmentos esperados al igual que los tres fragmentos obtenidos por la enzima XbaI (figura 7A1). Para el componente B, se obtuvieron los fragmentos y tamaños esperados con la enzima EcoRV y Hind III (Figura 7A2). Al realizar la secuenciación de ambos componentes se demostró con la herramienta BLAST que el componente A pertenece a la cepa Mosaic y el componente B corresponde a la cepa Distortion. Al analizar la infectividad mediante el bombardeo con partículas de oro en la variedad jaguar de chile habanero se comprobó la infectividad de las clonas infectivas y la eficiencia del método inoculación. Las 4 plantas inoculadas presentaron síntomas

asociados al PepGMV y fueron positivas en pruebas de PCR al virus, 14 días después de la inoculación (Figura 7B).

Detección molecular del PepGMV en accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*.

Para determinar si las plantas de las accesiones presentaron tolerancia al PepGMV, se inocularon por bombardeo 5 plantas por cada accesión, se realizó un seguimiento fotográfico para documentar la sintomatología y se determinó la presencia del PepGMV por medio de PCR obteniendo los siguientes resultados.

La accesión Jalisco-Chamela, no presentó sintomatología viral, la planta 1 fue positiva en el diagnóstico molecular, demostró ser tolerante a la infección (Figura 8). Las plantas 7, 10 11 y 14 fueron negativas y no mostraron síntomas de la infección (Figura 9A).

En la accesión Sonora Mazocahui no se observaron síntomas de la infección (Figura 9B) y todas las plantas bombardeadas fueron negativas a la presencia del PepGMV (Figura 8).

En la accesión VERSRGD se observa la presencia de la banda correspondiente al PepGMV en 4 de las 5 plantas inoculadas (plantas 1, 8, 12, 13) (Figura 8). La planta 8 a pesar de ser positiva fue asintomática (Figura 9C, P8). Este resultado nos sugiere que esta planta es tolerante a la infección, además de que el PepGMV puede estar replicándose en las plantas sin causar síntomas.

La accesión SON 223 presentó una sola planta positiva al PepGMV (Figura 8) y al comparar el fenotipo con el control y con las otras plantas de la misma accesión que resultaron

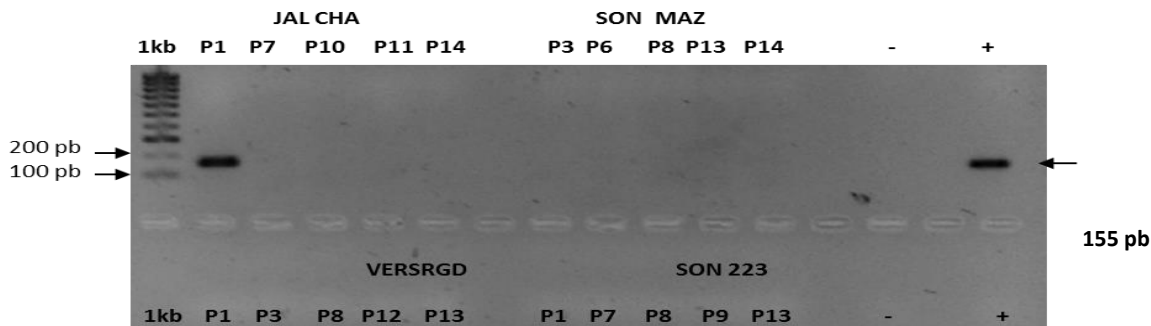


Figura 8. Identificación por PCR del PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. Jalisco Chamela (JAL CHA), Sonora Mazocahui (SON MAZ), Veracruz Santa Rosa localidad 1 (VERSRGD), Sonora San Javier (SON 223).

negativas al virus no se observan indicios de sintomatología viral, mostrando tolerancia a la infección (Figura 9D).

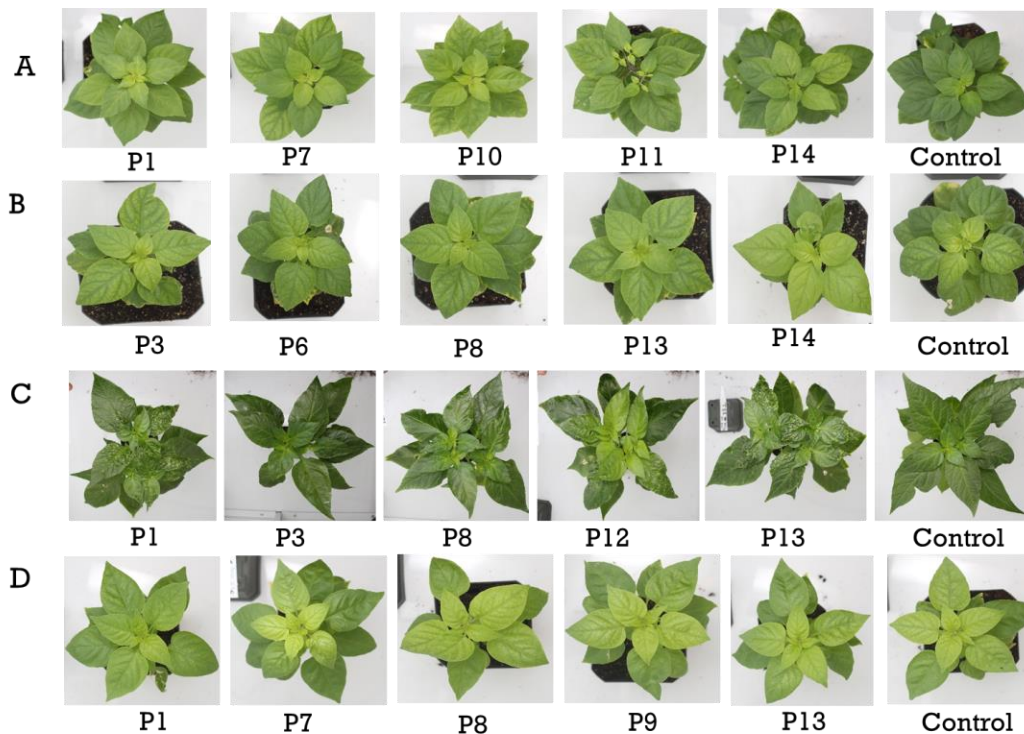


Figura 9. Plantas inoculadas con PepGMV 14 ddi. A) Jalisco Chamela (JAL CHA), B) Sonora Mazocahui (SON MAZ), C) Veracruz Santa Rosa localidad 1 (VERSRGD), D) Sonora San Javier (SON 223).

La accesión SAL 276 presentó tolerancia, dos plantas positivas en el diagnóstico molecular (plantas 7 y 9) (Figura 10) no mostraron síntomas de la infección en comparación con las plantas negativas y el control (Figura 11A). En la accesión VERSRCH tres plantas mostraron ser tolerantes, fueron positivas en el diagnóstico molecular (Figura 10) y fueron

completamente

asintomáticas

(Figura

11B).

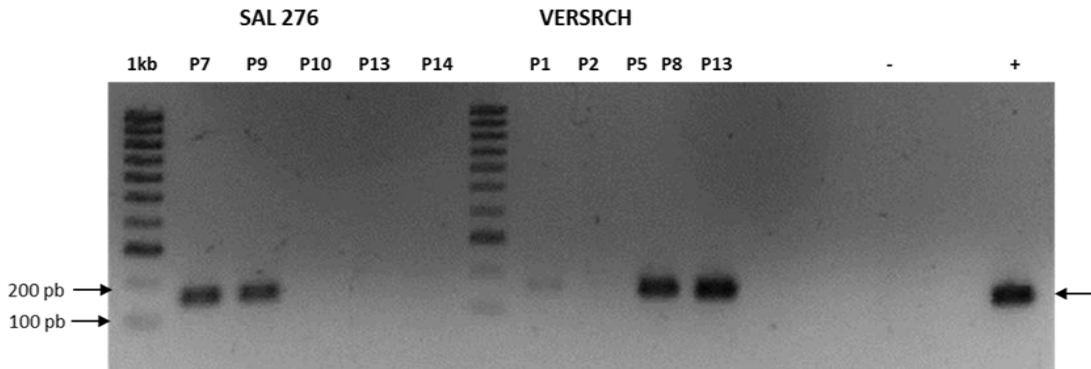


Figura 10. Identificación por PCR del PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. Saladito (SAL 276), Veracruz Santa Rosa (VERSRCH)

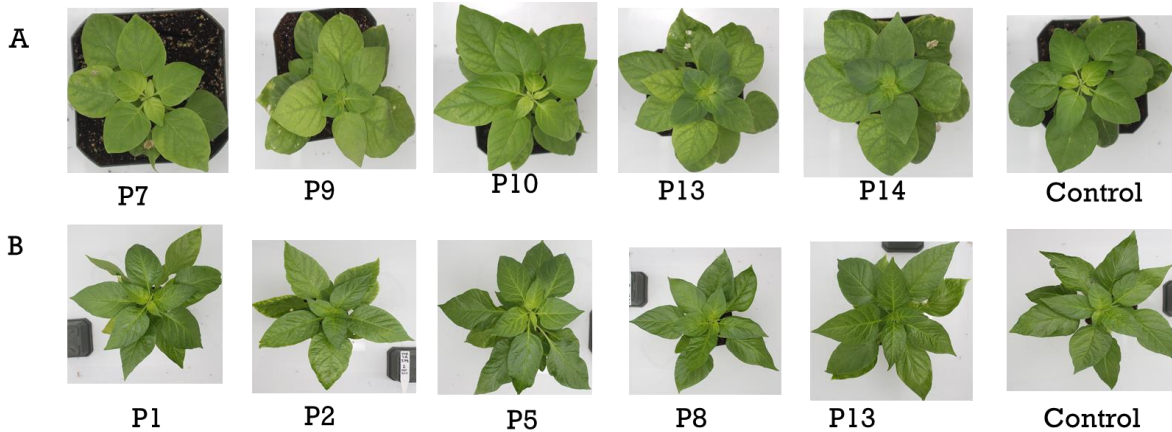


Figura 11. Plantas inoculadas con PepGMV 14 ddi. A) Saladito (SAL 276), B) Veracruz Santa Rosa (VERSRCH)

La accesión VER NC presentó una planta positiva en el diagnóstico molecular (planta 10) (Figura 12) y mostró síntomas característicos de la infección por PepGMV, las cuatro plantas restantes (P2, P3, P12, P13) resultaron negativas y no presentaron síntomas de la enfermedad (Figura 13A). En la accesión CAM 400 cuatro plantas fueron positivas en el diagnóstico molecular (Figura 12), tres de ellas fueron sintomáticas (planta 1, 2 y 8) en contraste con la planta 5 que resultó ser asintomática (Figura 13B). Para la accesión CAM 406 el diagnóstico molecular mostró que solo la planta 9 fue positiva al PepGMV y fue asintomática (Figura 12 y 13C). En la accesión SON 260 tres plantas resultaron positivas al virus y resultaron sintomáticas (P3, P7 y P10) (Figura 12, Figura 13D).

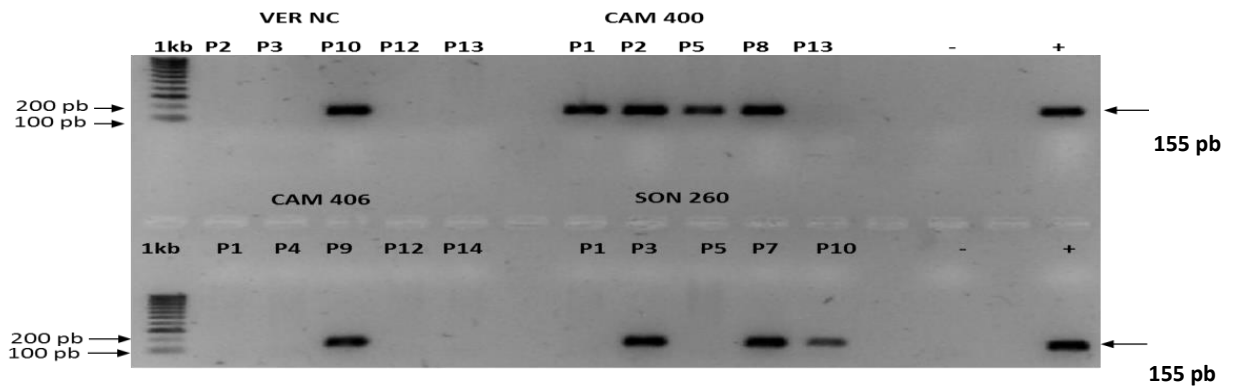


Figura 12. Identificación por PCR del PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. Veracruz Ney Campo (VER NC), Campeche Siho (CAM 400), Campeche Siho casa 2 (CAM 406), Sonora la aduana (SON 260).

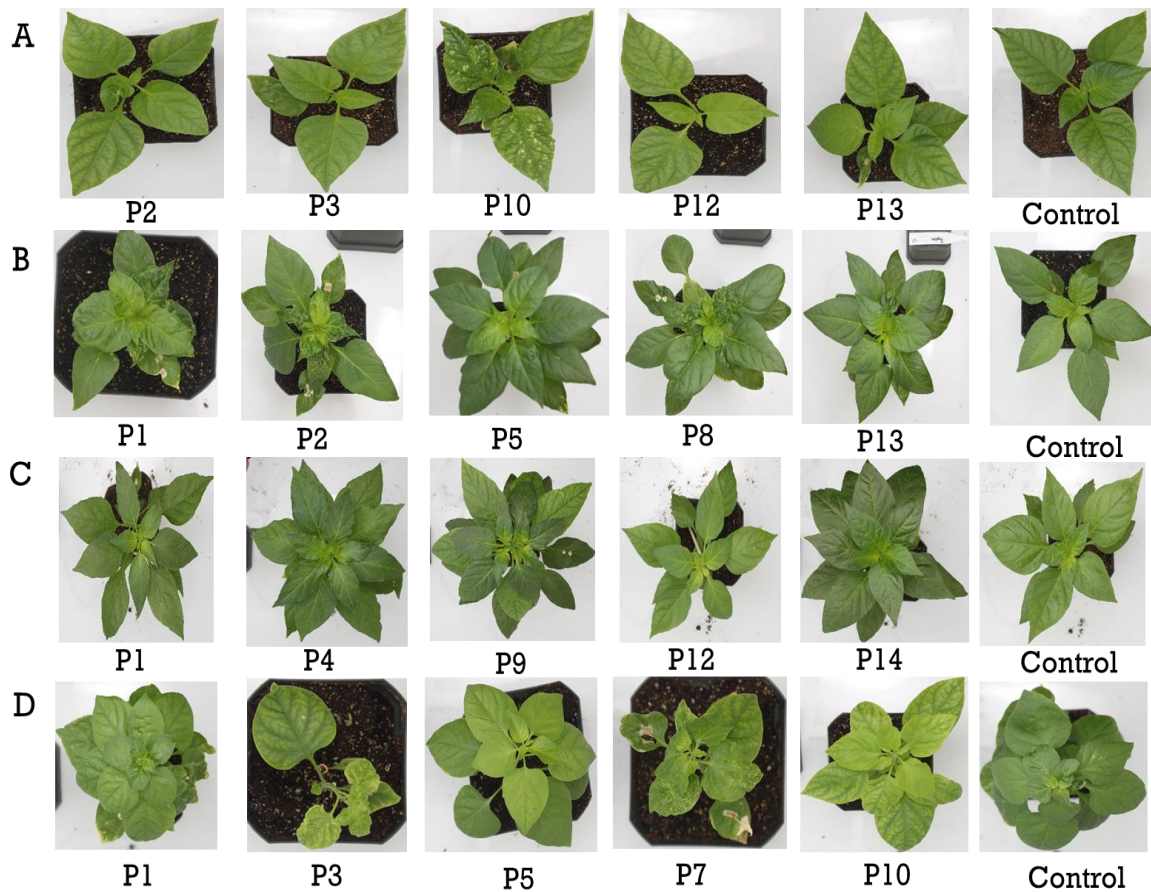


Figura 13. Identificación por PCR del PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. A) Veracruz Ney Campo (VER NC), B) Campeche Siho (CAM 400), C) Campeche Siho casa 2 (CAM 406), D) Sonora la aduana (SON 260).

En la accesión CAM 398 las plantas 3 y 14 fueron positivas a la identificación por PCR, pero resultaron ser asintomáticas. La accesión YUC SB 3 plantas (P1, P11, P13) resultaron positivas y sintomáticas a la infección (Figura 14,15C), al igual que la planta 3 de la accesión CAM 397 (Figura 15D). En la accesión SON 241 no se encontraron muestras positivas al PepGMV, además de no mostrar en ningún caso la presencia de síntomas del PepGMV (Figura 14 y 15B).

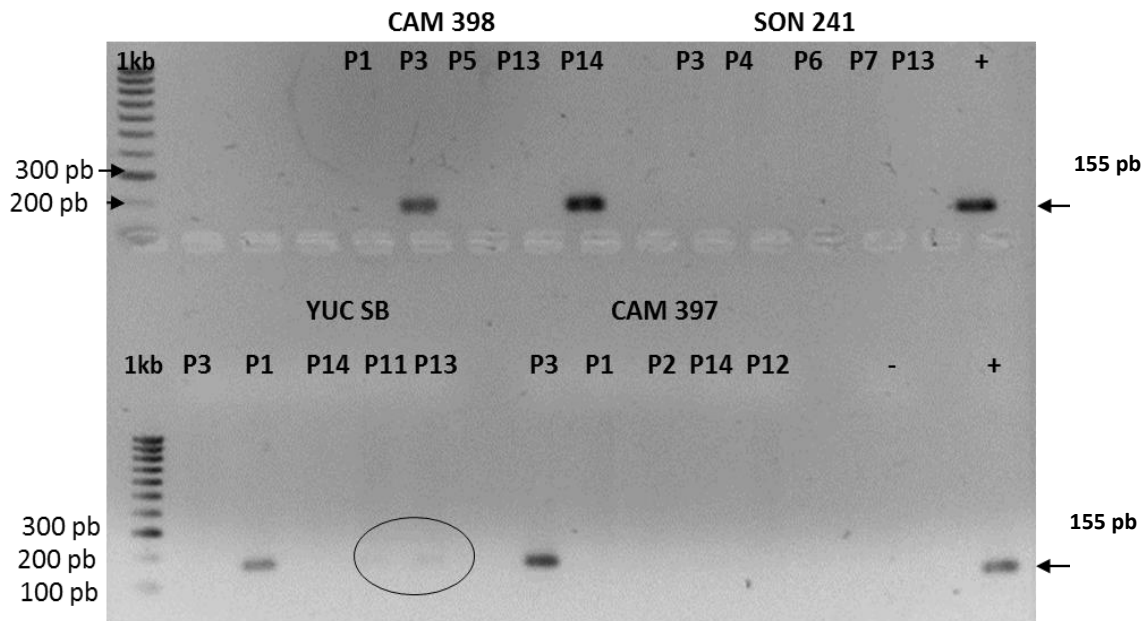


Figura 14. Identificación por PCR del PepGMV en accesiones inoculadas por biobalística. Campeche Siho 398 (CAM 398), Sonora Parcela (SON 241), Yucatán San Bernardino (YUC SB), Campeche Siho 397 (CAM 397).

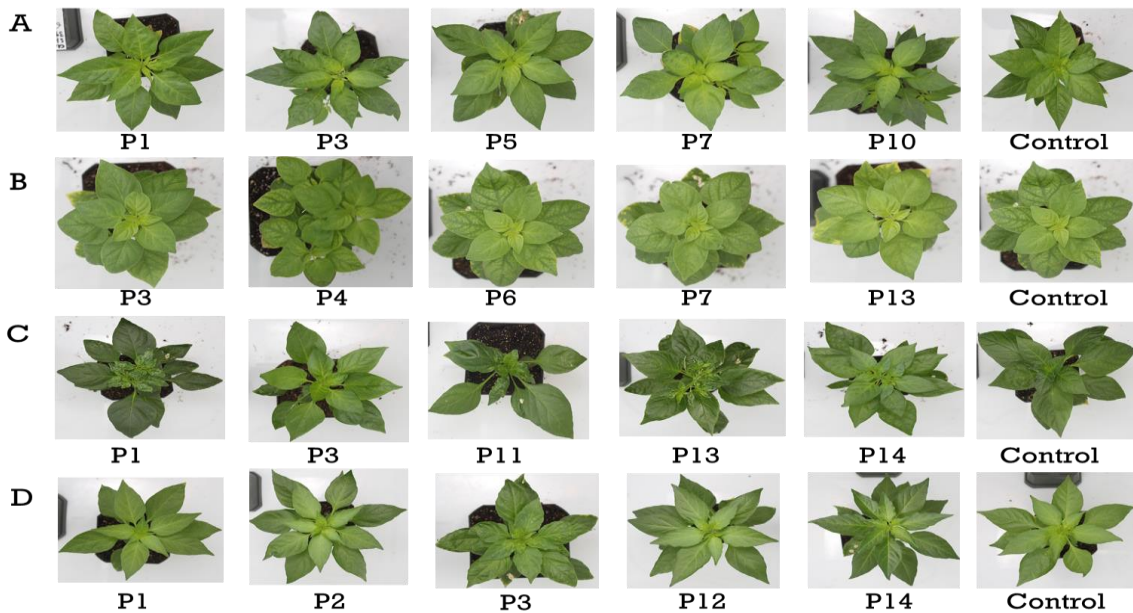


Figura 15. Plantas inoculadas con PepGMV 14 ddi. A) Campeche Siho 398 (CAM 398), B) Sonora Parcela (SON 241), C) Yucatán San Bernardino (YUC SB), D) Campeche Siho 397 (CAM 397).

Se ha descrito en la literatura que los cultivares silvestres presentan cierta resistencia o tolerancia a patógenos. En este sentido, las 70 plantas analizadas, pertenecientes a la especie *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, el 63% (44 plantas) de las plantas inoculadas con del PepGMV no mostró síntomas de infección viral y resultaron negativas al diagnóstico por PCR, mientras que el 37% (26 plantas) de las plantas resultaron positivas al virus mediante el análisis molecular, 14 plantas sintomáticas y 12 plantas asintomáticas.

Este resultado sugiere que *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* presenta variabilidad genética, basado en las diferentes respuestas al virus. Esto se puede deber en gran medida a las diferentes accesiones analizadas, donde pueden estar presentes genes de resistencia o tolerancia que se expresan en respuesta al virus y evitan que el virus se replique en las plantas o bien, que sea posible detectar al virus, pero este no causa síntomas en las plantas (cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen del análisis de la inoculación por cada accesión.

Accesión	Detección molecular (plantas +/- Plantas inoculadas)	Observaciones
JAL CHA	1/5	1 planta asintomática
MAZ 259	0/5	Plantas negativas y asintomáticas
VERSRGD	4/5	3 plantas con síntomas y 1 asintomática
SON 223	1/5	1 planta asintomática
SAL 276	2/5	2 plantas asintomáticas
VERSRCH	3/5	3 plantas asintomáticas
VER NC	1/5	1 planta sintomática
CAM 400	4/5	3 plantas sintomáticas y 1 asintomática
CAM 406	1/5	1 planta asintomática
SON 260	3/5	3 plantas sintomática
CAM 398	2/5	2 plantas asintomáticas
SON 241	0/5	Plantas negativas y asintomáticas
YUC SB	3/5	3 plantas sintomáticas
CAM 397	1/5	1 planta sintomática







Las accesiones analizadas mostraron resultados heterogéneos ante la infección por PepGMV, donde dos accesiones resultaron ser negativas y no presentaron síntomas de la infección viral (MAZ 259 y SON 241) y otras en donde el virus se replica, pero no provoca los síntomas. Estos resultados apoyan nuestra hipótesis, las accesiones presentan

variación en respuesta a la infección que difiere de cada una de ellas e incluso, se observó variación en la respuesta dentro de las accesiones.

Sintomatología

Con la finalidad de evaluar el impacto del virus en cada una de las accesiones, se evaluó la sintomatología viral de plantas que resultaron ser sintomáticas, se utilizaron fotografías que corresponden a 14 días después de la inoculación con PepGMV, los resultados se presentan en cuadro 4.

Cuadro 4. Análisis de los síntomas presentados por las accesiones

Accesión	Planta sintomática/planta control	Síntomas	Severidad (1-10)
VERSRGD		Leve distorsión en las hojas y mosaicos ligeros	5
VER NC		Leve distorsión en las hojas y mosaicos dorados	6
CAM 400		Distorsión en las hojas, deformación y mosaicos amarillos ligeros	8
SON 260		Distorsión, deformación de las hojas mosaicos amarillos y clorosis.	9
YUC SB		Distorsión, deformación de las hojas y mosaicos amarillos.	8
CAM 397		Arrugamiento leve de las hojas, con curvaturas que comienza a distorsionarse y mosaicos ligeros	6

Analizando los resultados obtenidos en cuadro 4, se puede concluir que la respuesta a la infección viral depende de cada una de las accesiones, esto debido a la variabilidad genética que presentan cada una de ellas. Otro aspecto importante que se observó en este

experimento fue que incluso dentro de las accesiones, la respuesta al virus varía en cuanto a la sintomatología. Para demostrarlo se realizó un experimento de curso temporal de la enfermedad de la accesión CAM 400, observando los síntomas ocasionados por el PepGMV en las plantas inoculadas (Figura 16).

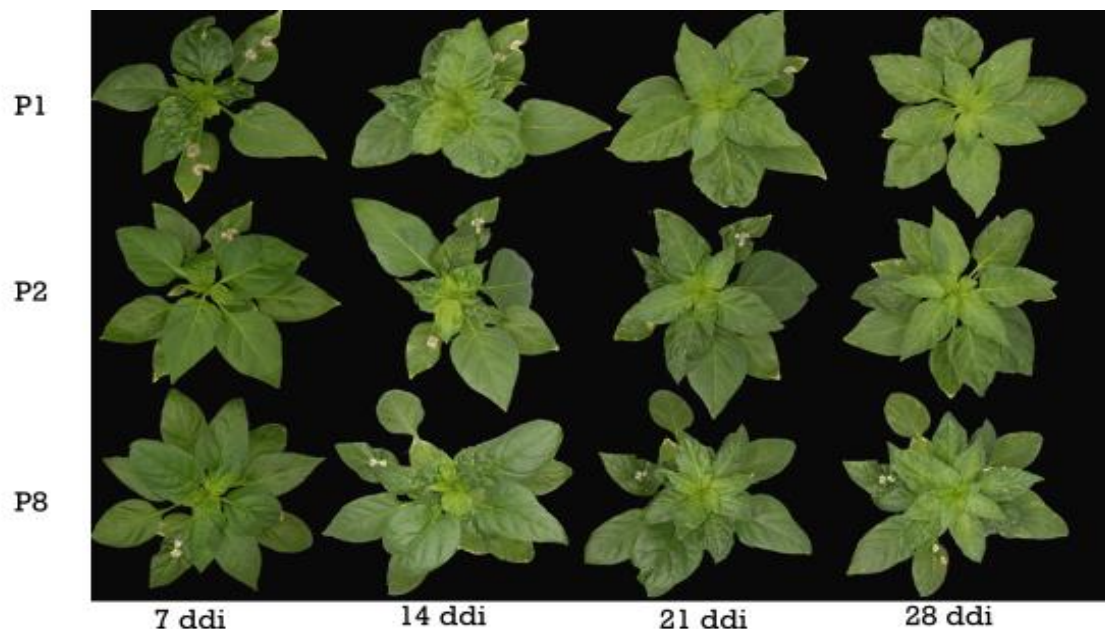


Figura 16. Progreso de la infección en plantas susceptibles a PepGMV en plantas de la accesión CAM 400. P1(planta 1), P2 (planta 2), P8 (Planta 8) en los días 7, 14, 21, 28 después de la inoculación.

En las tres plantas sintomáticas de la accesión CAM 400, los síntomas fueron diferentes en cada planta. La planta 1 mostró los síntomas más severos 7 días después de la inoculación (ddi), con distorsión en las hojas y presencia de mosaicos amarillos (severidad de 9 en la escala de 1-10 de los síntomas). A medida que transcurrieron los días, los síntomas disminuyeron, hasta llegar a 3 en la escala de síntomas en el día 21 ddi. Finalmente, al día 28 ddi se observó un fenotipo de remisión, donde los síntomas de distorsión en las hojas desaparecen por completo y solo se observaron mosaicos amarillos ligeros (Figura 16). Las plantas 2 y 8 mostraron síntomas leves a los 7 ddi, como hojas apicales ligeramente distorsionadas. Las dos presentaron la mayor severidad a los 14 ddi. Se observó distorsión en las hojas y la presencia de mosaicos amarillos. A los 28 ddi la planta 2, al igual que la planta 1, presentó un fenotipo de remisión, con la desaparición de síntoma de distorsión en

las hojas y se observaron solo puntos amarillos dispersos en las hojas. La planta 8 no presentó el fenotipo de remisión, los síntomas se observaron durante todo el curso-temporal de la enfermedad, aumentando el número de hojas con distorsión y mosaico (Figura 16).

Es importante aclarar que cada planta de cada accesión proviene de la misma planta madre, pero de diferente fruto. En la accesión CAM 400, las 3 plantas con síntomas presentaron una respuesta diferente a la infección, lo que sugiere que la progenie es heterogénea y que existe variabilidad genética dentro de la misma accesión.

Un hecho que reforzó nuestra hipótesis es que las plantas de las accesiones VERSRCH, CAM 406 y SON 223 (Figura 17 A, B y C) no presentaron síntomas durante todo el curso-temporal de la infección, lo que sugiere que las plantas analizadas de estas accesiones son tolerantes al PepGMV. En las plantas inoculadas solo con oro no se observaron síntomas (Figura 17, control).

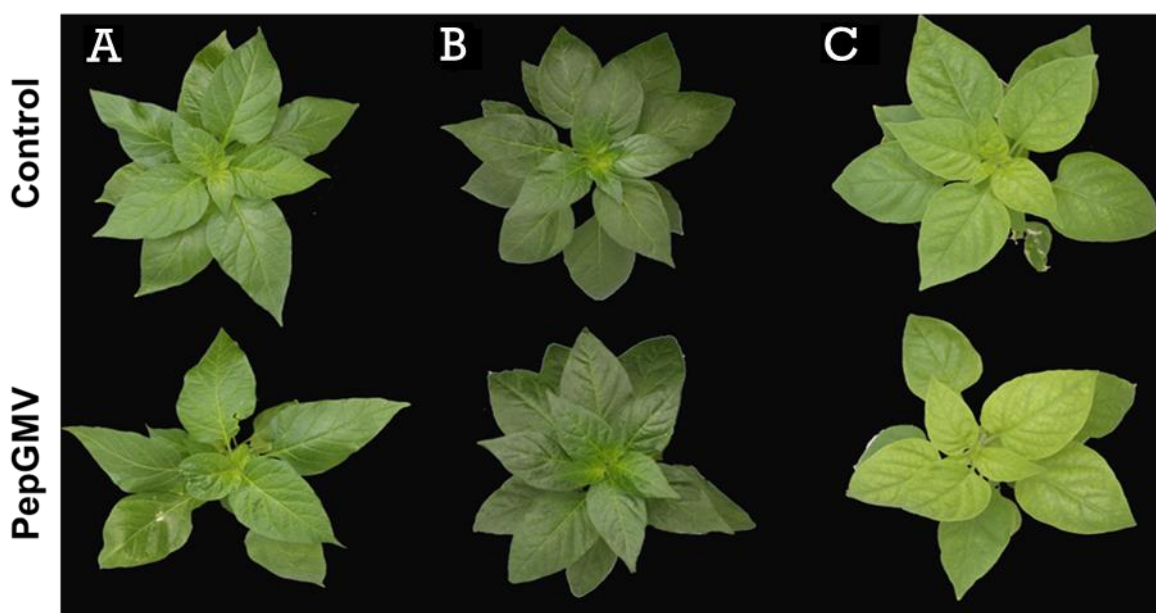


Figura 17. Accesiones asintomáticas 14 días después de la inoculación por biobalística. A) VERSRCH, B) CAM 406, C) SON 223. Parte superior plantas control, parte inferior plantas positivas a PepGMV.

Dentro de la literatura se han reportado que las plantas pueden entrar en una fase de remisión, donde los síntomas provocados por el virus suelen desaparecer, disminuir en

intensidad. Con la finalidad de identificar plantas con de estas características se realizó un seguimiento fotográfico temporal por accesiones (Figura 18).



Figura 18. Síntomas causados por el PepGMV a los 14 ddi (a, b, c, d) y a los 35 ddi (e, f, g, h) en 4 accesiones de *Capsicum annuum* var *glabrusculum*. a) SON 260 planta 5, b) YUC SB planta 11, c) VERSRGD planta 1 y d) VER NC planta 10.

En la accesión SON 260 se observó que la planta 5, a los 14 ddi mostró síntomas de arrugamiento, mosaicos y clorosis en las hojas, mientras que a los 35 ddi, los síntomas se hicieron más severos y se observaron en todas las hojas de la planta (Figura 18 a, e). En la planta 11 de la accesión YUC SB (Figura 18 b y f) se observó distorsión de las hojas y mosaicos a los 14 ddi; esta sintomatología persistió en el tiempo y a los 35 ddi la planta presentó hojas de menor tamaño debido a los síntomas de la enfermedad. En contraste la planta 1 y 10 de las accesiones VERSRG y VER NC (Figura 18 c, d, g y h) respectivamente, presentaron los síntomas característicos del PepGMV, hojas distorsionadas con mosaicos amarillos intensos a los 14 ddi y a los 35 días ddi se observó en ambas una remisión de síntomas, en donde las hojas nuevas no presentaron síntomas causados por el virus.

La sintomatología ocasionada por el PepGMV en las accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabrusculum* difirió en cada una de ellas y dentro de las mismas. Se observaron genotipos que no mostraron remisión de síntomas, mientras que en otros casos las plantas iniciaron el proceso de remisión de los síntomas, en donde las hojas nuevas no presentaron síntomas de la enfermedad. Este resultado nos sugiere que la respuesta al virus es específico de cada planta dentro de las accesiones.

Análisis de los parámetros fisiológicos

Los resultados que se presentaron en las dos secciones anteriores demostraron que el PepGMV no tiene la capacidad de infectar a todos los genotipos de *Capsicum annuum* var *glabrisculum* analizados. El experimento fue diseñado para analizar la tolerancia de todas las accesiones, con el supuesto de que todas se infectaran y mostraran síntomas de la enfermedad. En este sentido, para realizar los análisis estadísticos de los caracteres fisiológicos, se realizó la selección de accesiones con al menos tres plantas positivas al PepGMV. Las accesiones analizadas fueron CAM 400, SON 260, VERSRGD, YUC SB y VERSRCH (asintomática).

Tasa relativa de crecimiento

El virus tuvo un efecto significativo, negativo, sobre la tasa de crecimiento en la accesión SON 260 (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.011$, Figura 19), disminuyendo 47% en comparación con el control. Las accesiones CAM 400 (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.4782$) y YUC SB (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.8363$) con sintomatología viral, no presentaron un efecto significativo del virus sobre la tasa relativa de crecimiento, sin embargo, se observó un incremento de 8.7% para CAM 400, 25% para YUC SB con respecto al control. En la accesión VERSRG (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.8892$) a pesar presentar síntomas, la tasa relativa de crecimiento entre las plantas infectadas y las plantas control no varió. La accesión VERSRCH se mostró completamente asintomática, sin embargo, las plantas infectadas mostraron una tasa relativa de crecimiento menor al 8% en comparación de las plantas control, pero sin ser un efecto significativo (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.8363$).

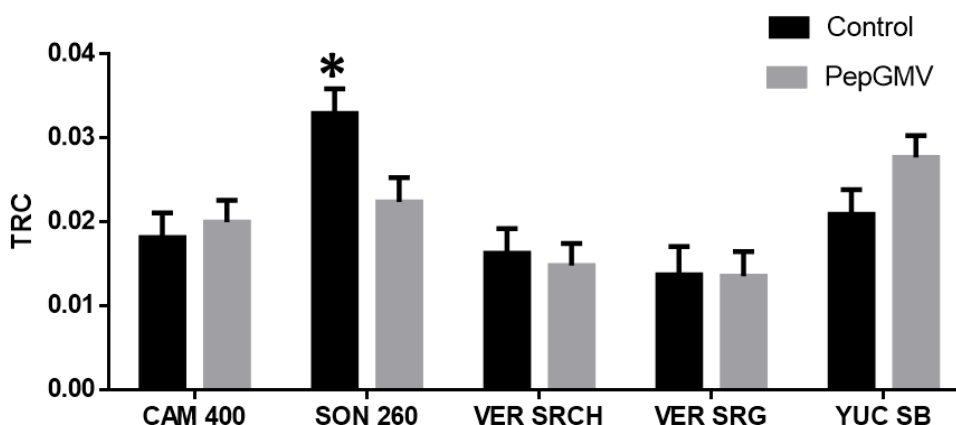


Figura 19. Tasa relativa de crecimiento (TRC) de las accesiones de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*. Barras negras muestran plantas control y barras grises plantas infectadas con PepGMV (* indica un efecto significativo).

Número de hojas

El número de hojas desarrolladas a los 28 ddi en las plantas infectadas con el PepGMV no mostró un efecto significativo en ninguna de las accesiones analizadas, con respecto a las plantas control, CAM 400 (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.3645$), YUC SB (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.4231$), SON 260 (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.7380$), VERSRCH (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.2893$), VERSRGD (ANOVA: $P < 0.05$; $P = 0.8490$).

En las accesiones CAM 400 y YUC SB, el número de hojas desarrolladas presentó una disminución de 9% y 4% respectivamente, en las plantas infectadas con el virus. En la accesión SON 260, a pesar de tener los síntomas más severos, el desarrollo de hojas tuvo un incremento de 13.15%. De igual forma, las accesiones VERSRCH y VERSRGD mostraron un incremento del 24 y 11% con respecto al control, respectivamente (Figura 20).

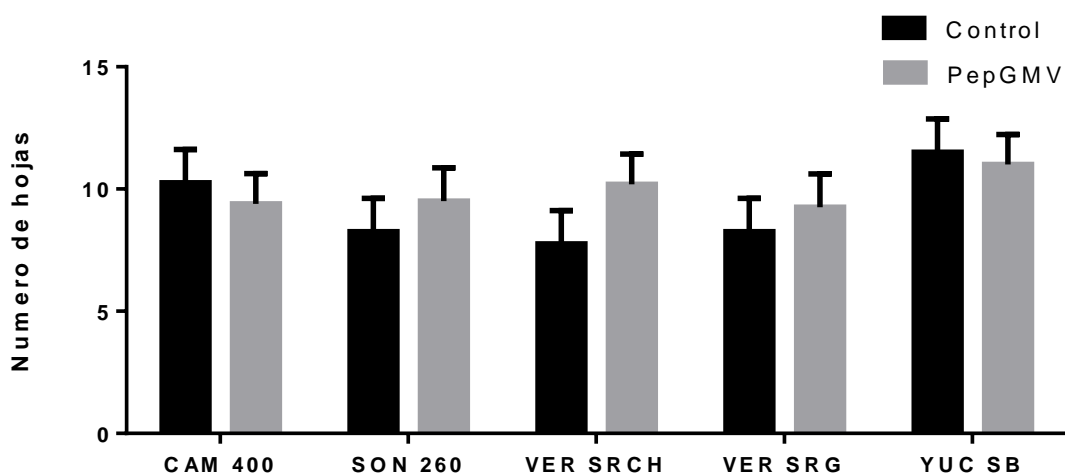


Figura 20. Efecto de la infección del virus en el número de hojas desarrolladas 28 días después de la inoculación de PepGMV. Las barras indican las medias del número de hojas y el error estándar.

Índice de clorofila

El índice del contenido de clorofila no presentó un efecto significativo en las 5 accesiones analizadas a los días 7, 14, 21 y 28 días después de la inoculación (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza del contenido de clorofila.

Accesión	7 ddi Significancia (P<0.05)	14 ddi Significancia (P<0.05)	21 ddi Significancia (P<0.05)	28 ddi Significancia (P<0.05)
CAM 400	0.0940	0.5335	0.5139	0.5447
SON 260	0.1847	0.92543	0.5526	0.6220
VER SRCH	0.7006	0.1265	0.7098	0.7712
VER SRG	0.6856	0.2823	0.5495	0.6897
YUC SB	0.5858	0.5422	0.5329	0.6320

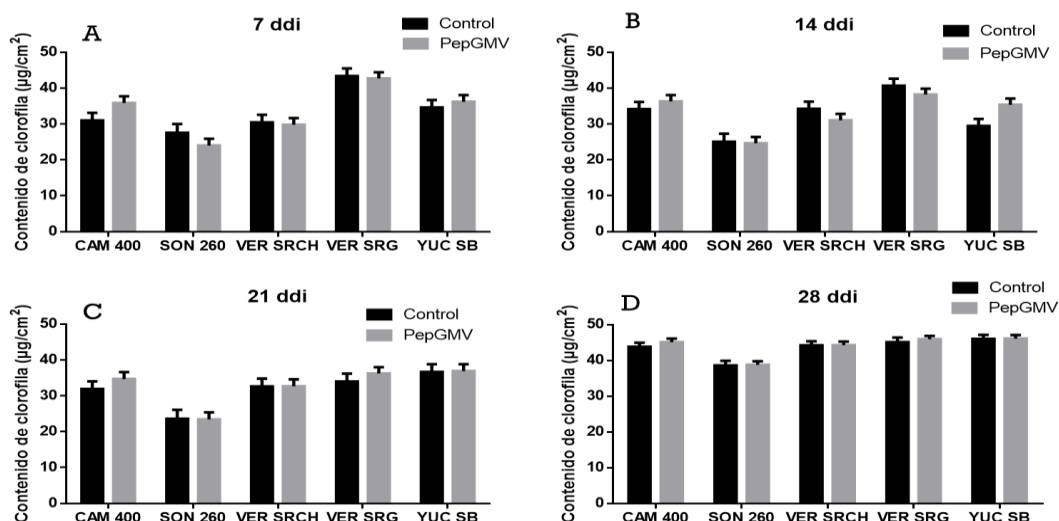


Figura 21. Efecto de la infección del virus en el contenido de clorofila. A) 7 días después de la inoculación. B) 14 días después de la inoculación. C) 21 días después de la inoculación D) 28 días después de la inoculación. Las barras indican las medias y el error estándar.

A los días 7 y 14 después de la inoculación, donde los síntomas de mosaico fueron los más severos, se observó un incremento en el contenido de clorofila en las accesiones CAM 400 y VERSRG, del 8% y 7% respectivamente. En las accesiones SON 260, VERSRCH y YUC 407 el contenido de clorofila no mostró cambios en las plantas control con respecto a las infectadas (Figura 21).

Contenido de fenoles

El ANOVA de la concentración de fenoles totales no mostró diferencia significativa entre las plantas infectadas y las plantas control para las accesiones analizadas, a los 14 ddi, día en que se observaron los síntomas más severos de la infección. Sin embargo, se observó disminución en la concentración de fenoles en las accesiones CAM 400, VERSRG YUC SB de 11.72%, 14%, 12.5% respectivamente en comparación con la planta control, a diferencia de las accesiones VERSRCH y SON 260, que presentaron un incremento en el contenido de fenoles del 16% y del 14.8% respectivamente (Figura 22).

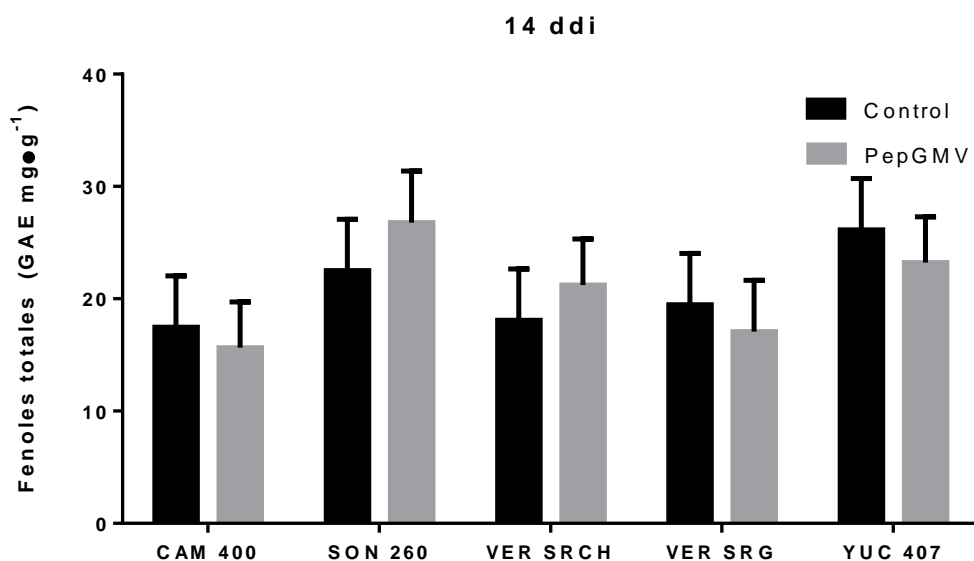


Figura 16. Efecto de la infección con PepGMV en la concentración de fenoles 14 días después de la inoculación. Las barras representan las medias y el error estándar.

Análisis de la fluorescencia de la clorofila

El análisis de la tasa de transporte de electrones fotosintéticos (ETR) a una intensidad luminosa de 320 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mostró un efecto positivo en las plantas inoculadas con el PepGMV en la accesión SAL 276, 7 ddi ($P = 0.0143$). En el día 14 ddi se observó un efecto positivo del virus en la accesión CAM 400. Estos efectos positivos se relacionan con la intensidad de los síntomas, pues SAL 276 mostró los síntomas más severos 7 ddi (Figura 23 A) y CAM 400 14 días después de la inoculación (Figura 23 b). En el caso de la accesión VERSR, fue completamente asintomática y no mostró variación en la ETR en todo el curso-temporal del experimento. Una vez pasada la etapa de síntomas severos las accesiones no mostraron variación en la tasa de transporte de electrones (Figura 23 c y d).

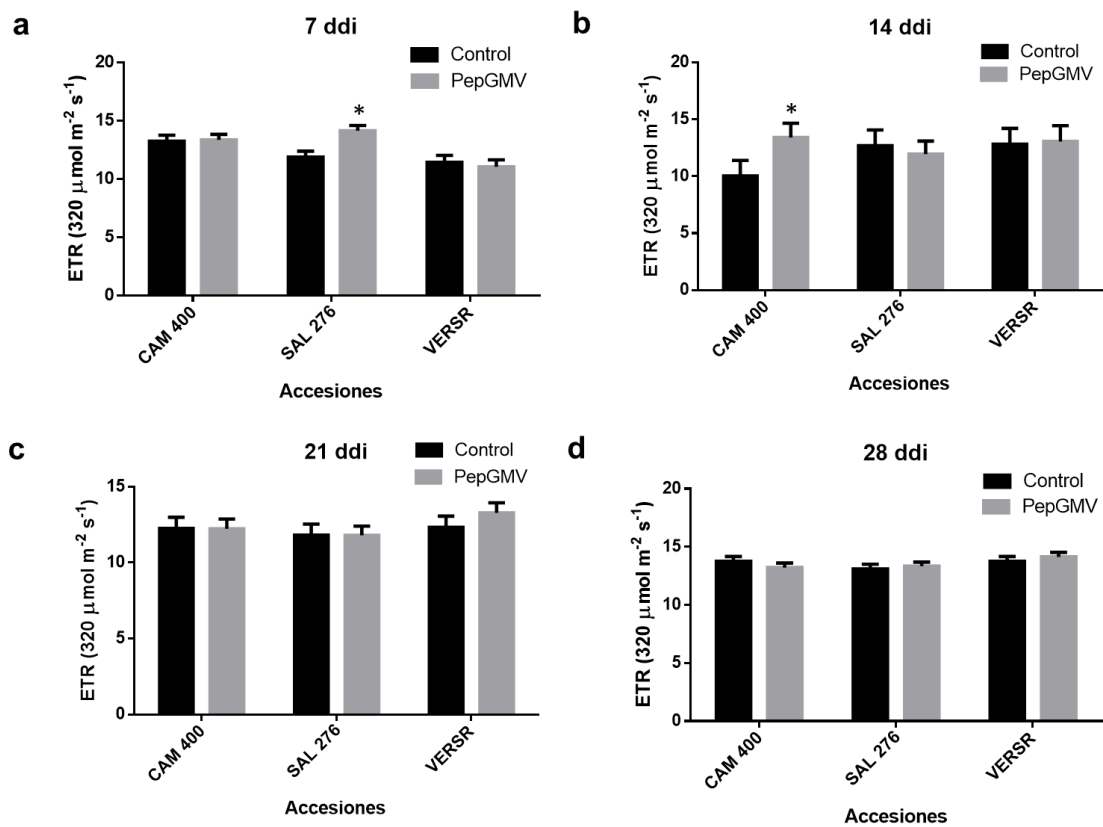


Figura 23. Efecto de la infección con PepGMV sobre la tasa de transporte de electrones. a) 7 días después de la inoculación, b) 14 días después de la inoculación, c) 21 días después de la inoculación d) 28 días después de la inoculación. Las barras indican la media y el error estándar.

CAPITULO IV.

DISCUSIÓN

Infeción con el PepGMV

A nivel laboratorio se ha demostrado que los cultivares comerciales *Capsicum annuum* cultivar Anaheim y *Capsicum annuum* cultivar San Benito son 100% susceptibles a la infección mediante bombardeo con los dímeros de PepGMV (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007) (Mejía-Teniente *et al.*, 2019). La sintomatología reportada es homogénea para ambos cultivares y coincide con lo reportado en los trabajos de Brown *et al.*, 2005 y Torres-Pacheco *et al.*, 2003.

Al analizar la infección con PepGMV en las 14 accesiones de chile silvestre *Capsicum annuum* var *glabriusculum* provenientes de diferentes localidades de México, los resultados mostraron un bajo porcentaje de infección, variación en la sintomatología y severidad, que diverge a lo citado en trabajos anteriores respecto a los cultivares comerciales de *Capsicum annuum* var *annuum* (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007; Mejía-Teniente *et al.*, 2019). Los resultados coinciden con los reportes de Torres-Pacheco *et al.*, (2001) y Hernández-Verdugo *et al.*, (2003) en infecciones simples con el PepGMV, en variedades silvestres de *Capsicum annuum* var. *annuum*, donde el virus no infecta el 100% de las accesiones, además de presentar accesiones infectadas asintomáticas. En *Capsicum chinense* Jacq se han obtenido resultados similares, con respecto a la infección, sintomatología y severidad de los síntomas. En esta especie Anaya-López *et al.*, (2013) reportaron que el 30% de las plantas inoculadas con el PepGMV mostraron síntomas virales mientras que el 70% fueron asintomáticas. En nuestro trabajo encontramos resultados similares, ya que el 37% de las plantas analizadas resultaron positivas al PepGMV de acuerdo al análisis molecular.

Los estudios de infección con el PepGMV sugieren que las accesiones silvestres del género *Capsicum* presentan una gran variabilidad genética en las diferentes poblaciones y dentro de las mismas, debido a las interacciones presentes en el holobionte. Lo anterior responde en su mayoría a que las accesiones silvestres forman parte de los ecosistemas naturales presentes en nuestro país, donde el ambiente y el bajo o nulo nivel de domesticación permiten tener una estructura genética capaz de sobrevivir al medio (Rodelo-Urrego *et al.*,

2013). Se ha demostrado que las líneas comerciales se han deteriorado genéticamente como consecuencia de los cuellos de botella que se generan en la selección masiva, como consecuencia de la selección de caracteres acorde a las necesidades de mercado, dejando de lado los caracteres relacionados a la defensa de las plantas, provocando que estas sean más susceptibles al ataque de patógenos (González-Jara *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2014).

La variabilidad genética presente en una especie o cultivo tiene un papel importante en la defensa contra patógenos (Paudel & Sanfaçon, 2018). Un ejemplo claro que la baja variabilidad genética permite a los patógenos provocar graves daños, es el cultivo de yuca *Manihot esculenta*, que presenta poca variabilidad genética debido principalmente a su forma de propagación por esquejes, donde todas las plantas son clones. En este sentido al ser atacada por el begomovirus *African cassava mosaic virus* (ACMV) ha provocado pérdidas totales y hambruna en el continente africano (Houngue *et al.*, 2019). En nuestro trabajo se analizaron poblaciones silvestres de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, donde la selección artificial ha sido nula o muy baja, además su reproducción permite la hibridación o cruzamiento con individuos cercanos que promueven la variabilidad genética de la especie. Es importante señalar que está en constante interacción con el PepGMV en el ambiente natural, por ende, la respuesta a la infección tiende a diferir en cada una de las accesiones y dentro de las mismas. Lo anterior se explica con base a la presión selectiva que genera el virus en las plantas. Esta interacción es llamada coevolución, donde la frecuencias de genes de una especie determinan la aptitud de genotipos, conduciendo a la diversidad en las defensa del hospedero (Brown & Tellier, 2011). Los trabajos de Retes-Manjarrez *et al.* (2016) y Hernández-Verdugo *et al.* (2017) en los estados de Sonora y Sinaloa muestran que las poblaciones silvestres de *Capsicum annuum* en las localidades muestreadas, divergen en respuesta a la infección de begomovirus, encontrado accesiones resistentes a la infección.

Con base en el diseño experimental utilizado en este trabajo, el efecto de la infección solo puede ser atribuido a la estructura genética de las accesiones. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia que tiene la variación ecológica a gran escala y la importancia de este recurso fitogenético como fuente de genes que pueden ser utilizados para el mejoramiento genético.

Tolerancia al PepGMV

Se ha propuesto que la tolerancia a patógenos por parte del hospedero se logra mediante la reasignación de los recursos, con el objetivo de disminuir el impacto negativo del patógeno. La inversión de los recursos a diferentes componentes de la aptitud física como el crecimiento, el desarrollo, y la reproducción son ejemplo de la tolerancia de las plantas a los patógenos (Stearns, 1976). Es importante señalar que, a pesar de no detectarse diferencias significativas, las plantas respondieron en algunos casos de manera positiva a la infección y en pocos casos de manera negativa, mostrando cierta variación entre ellas, y mostrando que la tolerancia al virus influye en la aptitud de las plantas para sobreponerse a la infección. Esto concuerda con los trabajos de Pagan *et al.* (2006, 2007) y Shukla *et al.* (2018), donde en diferentes líneas de *Arabidopsis* varían en sus respuestas a la infección viral.

Tasa relativa de crecimiento y número de hojas

Se ha reportado que los efectos de la infección viral por PepGMV producen un retraso en el crecimiento de las plantas en chiles (Hernández-Espinal *et al.*, 2018). En las accesiones analizadas solo la accesión SON 260 mostró diferencias significativas en la tasa de crecimiento, donde las plantas infectadas disminuyeron el crecimiento con respecto a las plantas control, además esta accesión fue la más afectada en sintomatología. En las accesiones restantes el virus no tuvo efecto negativo en la tasa relativa de crecimiento ni en el desarrollo de las hojas. Este es el primer trabajo donde se evalúan estas variables en la infección de PepGMV en chiles silvestres, los resultados no concuerdan con los efectos provocados por otros virus, donde se reportan disminución en el crecimiento y efecto negativo sobre el desarrollo de las plantas (Chia & He, 1999; Guo *et al.*, 2005).

Contenido de clorofila

Uno de los síntomas característicos del PepGMV es el mosaico dorado que se presenta en las hojas de las plantas infectadas, relacionado con la degradación de la clorofila (Brown *et al.*, 2005; Mejía-Teniente *et al.*, 2019). En este sentido, las accesiones analizadas no presentaron disminución en el contenido de clorofila con respecto a las plantas control. Esto sugiere que las accesiones silvestres de Chile son tolerantes a la degradación o disminución

de la clorofila. La disminución o degradación de clorofila se produce como consecuencia de la infección viral; en el caso del virus BBTv, la pérdida de clorofila está asociada a la acumulación de clorofilasa, además porque el virus utiliza el cloroplasto para la síntesis de sus proteínas, rompiendo las membranas externas (Tanuja *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2016).

Análisis de la fluorescencia de la clorofila

La tasa de transporte de electrones se vio afectada de manera significativa en las accesiones SAL 276 y CAM 400; en ambas el efecto en la disminución de transporte de electrones se relacionó con los días en donde se apreciaron los síntomas más severos de la infección. Este efecto es interesante pues la fluorescencia de la clorofila se relaciona con el contenido de clorofila y en este sentido no tuvo un cambio significativo durante el progreso de la enfermedad. En otros trabajos se ha observado una limitación de la fotosíntesis y baja asimilación de CO₂ por efecto de la fotorrespiración (Guo *et al.*, 2005). A pesar de ocurrir la infección con el PepGMV, los resultados sugieren una resiliencia en el aparato fotosintético de las accesiones silvestres que permiten la normalización de la tasa del transporte de electrones.

Contenido de fenoles

El papel de los fenoles en las infecciones virales son la señalización y la estabilización del estado redox en la célula. Se ha reportado que el contenido de fenoles incrementa en presencia las infecciones virales (Kofalvi & Nassuth, 1995; Tanguy & Martin, 1972). En este sentido solo las accesiones VERSRCH Y SON 260 mostraron un incremento en el contenido de fenoles, pero resultó no ser significativo con respecto a sus controles. Los resultados difieren de los trabajos antes mencionados, por lo tanto, el contenido de fenoles en chiles silvestres no resultaron ser causa de la recuperación en las plantas, ni de lo leve de los síntomas observados, como ha reportado Mejía-Teniente *et al.* (2019). Estos autores aplicaron peróxido de hidrógeno como preacondicionamiento antes de la infección viral por PepGMV y los niveles de compuestos fenólicos incrementaron significativamente con respecto a los tratamientos testigos y se correlacionaron positivamente con la recuperación de las plantas y la disminución en la severidad de síntomas.

CAPITULO V. Conclusiones y perspectivas

Algunas de las accesiones de chiles silvestres estudiadas resultaron ser tolerantes a la infección con el virus, ya que los parámetros fisiológicos estudiados no se ven afectados, los síntomas visibles son leves, presentan remisión de síntomas y en algunos casos son ausentes.

Se encontraron dos accesiones que pudieran ser tolerantes a la infección, Sonora Mazocahui (241) y Sonora Parcela (241), las cuales tienen un potencial para formar parte de programas de mejoramiento genético. Por otra parte, también se pudieron observar accesiones que se recuperaban de la infección (VER NC y VERSR). Con lo anterior se destaca el potencial de la diversidad genética presente en los chiles silvestres para su uso en la mejora de los materiales comerciales.

Es importante señalar que a pesar de que las plantas de cada accesión provienen de la misma planta madre, cada uno de los individuos evaluados tiene un genotipo heterogéneo, esto queda en manifiesto al presentar diferente respuesta a la infección viral. Es decir, si en algún momento se toman las mismas accesiones para repetir el experimento los resultados pueden diferir en cuanto al número de plantas infectadas esto como parte de la genética de poblaciones. Lo anterior se ha demostrado en los trabajos de Hernández-Verdugo *et al.* 2017, 2019 con el virus PHYVV, donde seleccionó progenitores que no mostraron síntomas ni presencia del virus en la primera generación, sin embargo, al tratarse de accesiones silvestres con genotipo heterogéneo, al obtener la progenie resultó que algunas plantas si se infectaban y presentaban síntomas pero con menor incidencia en comparación con los progenitores susceptibles, fue hasta la quinta generación que se logró depurar las 3 líneas a las que actualmente se les atribuye la resistencia al virus PHYVV.

Este es un trabajo exploratorio donde se evaluaron líneas de diferentes lugares de la república, se demostró que el chile silvestre tiene material genético que puede ser estudiado para obtener accesiones tolerantes o resistentes a la infección viral por PepGMV. En este sentido, se ha utilizado la genética clásica para obtener líneas resistentes, no quiere decir que no sea eficiente, sino que para realizar la selección de estos materiales se deberían utilizar marcadores genéticos que permitan identificar los individuos con las caracterizas

adecuadas para disminuir el tiempo en el proceso de selección y cribado de materiales silvestres.

Se describieron diferentes interacciones virus-planta, como se mencionó anteriormente los individuos presentan cierta heterogeneidad, muchos genes pudieran estar involucrados en esta interacción, no se podrían estudiar de una manera muy puntual o certera, estas interacciones virus-planta se han estudiado en plantas modelos como *Arabidopsis thaliana* donde se conoce todo su genoma, además de tener poca variabilidad genética por ser líneas homogéneas e incluso clones.

Perspectivas

1. Cinco accesiones mostraron individuos infectados que no presentaron síntomas de la enfermedad; con los avances en la secuenciación masiva se puede hacer un análisis del transcriptoma para identificar las causas o propiedades de las plantas que permiten la replicación del virus, pero sin presentar daño en la planta.
2. Las accesiones CAM 400 y YUC SB fueron susceptibles pero presentaron diferentes grado de recuperación. Futuros estudios transcriptómicos pueden permitir identificar los genes que estén involucrados en estas respuestas y contrastar con los transcriptomas de las accesiones resistentes.
3. En este trabajo solo se estudió la interacción virus-planta, sin embargo, de manera natural no existe tal relación, pues no incluye la participación del insecto vector, que puede tener gran influencia en la virulencia del virus y pudiera llevar a resultados diferentes. Es muy importante re-evaluar en presencia del vector las presuntas accesiones resistentes y las que permanecieron asintomáticas, para realizar un cribado mas estricto para identificar materiales que requiere la agricultura.
4. Para realizar programas de mejoramiento genético usando estas accesiones es necesario contar con marcadores moleculares para identificar a los individuos resistentes para acortar los tiempos en la selección de materiales.
5. Por último, sería de gran importancia analizar el viroma de los cultivares comerciales y silvestres para detectar sinergias virus-virus, pues todos los trabajos de selección de materiales son específicos a un virus. Se ha comprobado que en una planta enferma pueden estar presentes múltiples virus.

Referencias

- Agnew, P., C. Koella, J., & Michalakis, Y. (2000). Host life history responses to parasitism. *Microbes and Infection*, 2(8), 891–896. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00389-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00389-0).
- Agrawal, A. A. (2011). Current trends in the evolutionary ecology of plant defence. *Functional Ecology*, 25(2), 420–432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2010.01796.x>.
- Aguilar-Rincón, V. H., Corona-Torres, T., López-López, P., Latournerie-Moreno, L., Ramírez-Meraz, M., Villalón-Mendoza, H., & Aguilar-Castillo, J. A. (2010). *Los chiles de México y su distribución*.
- Ainsworth, E. A., Gillespie, K. M. 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2(4), 875–877. doi:10.1038/nprot.2007.102
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., Olalere, O. A. 2017. Ethanolic extraction of flavonoids, phenolics and antioxidants from *Vernonia amygdalina* leaf using two-level factorial design. *Journal of King Saud University - Science*, 1–10. doi:10.1016/j.jksus.2017.08.001
- Anaya-López, J. L., Godínez-Hernández, Y., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-Olvera, C., Guevara-González, R. G., Rivera-Bustamante, R. F., ... Torres-Pacheco, I. (2003). Identificación de resistencia contra infecciones simples y mixtas por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y el virus huasteco del chile en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, IX(02), 225–229. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2001.08.047>
- Ballina-Gómez, H., Latournerie-Moreno, L., Ruiz-Sánchez, E., Pérez-Gutiérrez, A., Rosado-Lugo, G. 2013. Morphological characterization of *Capsicum annuum* L. accessions from southern Mexico and their response to the Bemisia tabaci-Begomovirus complex. *Chilean journal of agricultural research*, 73(4), 329–338. doi:10.4067/S0718-58392013000400001

- Bañuelos, N., Salido, P. L., & Gardea, A. (2008). Estudios Sociales: Revista de Investigación Científica. In Estudios sociales (Hermosillo, Son.) (Vol. 16). Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-45572008000200006
- Borah, B. K., & Dasgupta, I. (2012). Begomovirus research in India: A critical appraisal and the way ahead. *Journal of Biosciences*, 37(4), 791–806. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9238-y>
- Brown, J. K. M., & Tellier, A. (2011). Plant-Parasite Coevolution: Bridging the Gap between Genetics and Ecology. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 345–367. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095301>.
- Brown, J. K., and Poulos, B. T. 1990. Serrano golden mosaic virus: A newly identified whitefly-transmitted geminivirus of pepper and tomato in the United States and Mexico. *Plant Dis.* 74:720.
- Brown, J. K., Idris, A. M., Ostrow, K. M., Goldberg, N., French, R., & Stenger, D. C. (2005). Genetic and Phenotypic Variation of the Pepper golden mosaic virus Complex. 95(10), 1217. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1217>.
- Buckler IV, E. S., Thornsberry, J. M., & Kresovich, S. (2001). Molecular diversity, structure and domestication of grasses. *Genetical Research*, Vol. 77, pp. 213–218. <https://doi.org/10.1017/S0016672301005158>
- Caldwell, R. M., Schafer, J. F., Compton, L. E., & Patterson, F. L. (1958). Tolerance to cereal leaf rusts. *Science*, 128(3326), 714–715. <https://doi.org/10.1126/science.128.3326.714>
- Cano-Vázquez, A., López-Peralta, M. C., Zavaleta-Mancera, H. A., Cruz-Huerta, N., Ramírez-Ramírez, I., Gardea-Béjar, A., González-Hernández, V. A. 2015. Variación en grados de latencia en semillas entre colectas de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*). *Botanical Sciences*, 93(1), 175. doi:10.17129/botsoci.138
- Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E., & Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Symptom Remission and Specific Resistance of Pepper Plants After Infection by *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology*, 97(1), 51–59. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0051>

- Chia, T. F., & He, J. (1999). Photosynthetic capacity in *Oncidium* (Orchidaceae) plants after virus eradication. *Environmental and Experimental Botany*, 42(1), 11–16. [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(99\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(99)00010-6)
- Czosnek, H., Hariton-Shalev, A., Sobol, I., Gorovits, R., & Ghanim, M. (2017). The incredible journey of Begomoviruses in their whitefly vector. *Viruses*, Vol. 9. <https://doi.org/10.3390/v9100273>
- EPPO. (2018). Pepper golden mosaic virus (PEPGMV)[World distribution]] EPPO Global Database. Retrieved December 10, 2019, from <https://gd.eppo.int/taxon/PEPGMV/distribution>
- González-Jara, P., Moreno-Letelier, A., Fraile, A., Piñero, D., & García-Arenal, F. (2011). Impact of Human Management on the Genetic Variation of Wild Pepper, *Capsicum annum* var. *glabriusculum*. *PLoS ONE*, 6(12), e28715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028715>
- Gouveia, B., Calil, I., Machado, J. P., Santos, A., & Fontes, E. (2017). Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. *Frontiers in Microbiology*, 7, 2139. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02139>
- Guo, D. P., Guo, Y. P., Zhao, J. P., Liu, H., Peng, Y., Wang, Q. M., ... Rao, G. Z. (2005). Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Science*, 168(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.019>
- Hamernik, A. J., Hanneman, R. E., & Jansky, S. H. (2009). Introgression of wild species germplasm with extreme resistance to cold sweetening into the cultivated potato. *Crop Science*, 49(2), 529–542. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.04.0209>
- Hanley-Bowdoin, L., Bejarano, E. R., Robertson, D., & Mansoor, S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 777–788. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3117>
- Hayano-Kanashiro, C., Gámez-Meza, N., & Medina-Juárez, L. Á. (2016). Wild Pepper *L. var.*: Taxonomy, Plant Morphology, Distribution, Genetic Diversity, Genome

Sequencing, and Phytochemical Compounds. *Crop Science*, 56(1), 1. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.11.0789>

Hernández-Espinal, L. A., Enríquez-Verdugo, I., Melgoza-Villagómez, C., Retes-Manjarrez, J. E., Velarde-Félix, S., Linares-Flores, P., & Garzón-Tiznado, J. A. (2018). Análisis filogenético y distribución de begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41, 149–157. Retrieved from <https://www.revistafitotecniamexicana.org/documentos/41-2/6r.pdf>

Hernández-Verdugo, S., Guevara-González, R. G., Rivera-Bustamante, R. F., & Oyama, K. (2001). Screening wild plants of *Capsicum annum* for resistance to pepper huasteco virus (PHV): Presence of viral DNA and differentiation among populations. In *Euphytica* (Vol. 122). Retrieved from <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FA%3A1012624830340.pdf>

Holguín-Peña, R. J., Juárez, R. V., & Rivera-Bustamante, R. F. (2004). *Pepper golden mosaic virus* Affecting Tomato Crops in the Baja California Peninsula, Mexico. *Plant Disease*, 88(2), 221–221. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.221A>

Houngue, J. A., Zandjanakou-Tachin, M., Ngalle, H. B., Pita, J. S., Cacaï, G. H. T., Ngatat, S. E., ... Ahanhanzo, C. (2019). Evaluation of resistance to cassava mosaic disease in selected African cassava cultivars using combined molecular and greenhouse grafting tools. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 105, 47. <https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2018.07.003>

ICTV. (2020). Geminiviridae - Geminiviridae - ssDNA Viruses - International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Retrieved July 21, 2020, from https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/ssdna-viruses/w/geminiviridae

Kofalvi, S. A., & Nassuth, A. (1995). Influence of wheat streak mosaic virus infection on phenylpropanoid metabolism and the accumulation of phenolics and lignin in wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 47(6), 365–377. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1995.1065>

Kumar S, Kumar S, Singh M, Singh AK, Rai M (2006) Identification of host plant resistance

to pepper leaf curl virus in chilli (*Capsicum* species). *Sci Hortic* 110:359–36

Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., Cardinali, A., Amendola, V. 2006. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. En *Phytochemistry* (Vol. 661).

Little, T. J., Shuker, D. M., Colegrave, N., Day, T., & Graham, A. L. (2010). The Coevolution of Virulence: Tolerance in Perspective. *PLoS Pathogens*, 6(9), e1001006. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001006>

Lizarde, N. A., Lizarde, E. A., & Guillermo Martínez Martínez, J. (2011). Evaluación de la germinación y crecimiento de Plántula (*Capsicum annum* L variedad glabriusculum). *Rev. Colomb. Biotecnol. Diciembre, XIII(2)*, 170–175. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752011000200016

Lizarde, N. A., Lizarde, E. A., & Guillermo Martínez Martínez, J. (2011). Evaluación de la germinación y crecimiento de Plántula (*Capsicum annum* L variedad glabriusculum). *Rev. Colomb. Biotecnol. Diciembre, XIII(2)*, 170–175. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752011000200016

Malathi, V. G. (2017). Begomovirus: An Introduction. In *Begomoviruses: Occurrence and Management in Asia and Africa* (pp. 3–9). https://doi.org/10.1007/978-981-10-5984-1_1

Maxted, N. (2009). Establishment of a global network for the in situ conservation of crop wild relatives: status and needs. *Fao.org*. Retrieved from <http://www.fao.org/3/i1500e/i1500e18d.pdf>

Mejía-Teniente, L., Durán-Flores, B. A., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Rivera-Bustamante, R. F., Feregrino-Perez, A. A., ... Guevara-González, R. G. (2019). Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annum* L.) against pepper golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106, 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.11.008>

- Montes-Hernández, S. 2010. Recopilación y análisis de la información existente de las especies del género *Capsicum* que crecen y se cultivan en México. En Inifap. doi:10.7498/aps.63.104215
- Munns, R., James, R. A., Xu, B., Athman, A., Conn, S. J., Jordans, C., ... Gilliham, M. (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na⁺ transporter gene. *Nature Biotechnology*, 30(4), 360–364. <https://doi.org/10.1038/nbt.2120>
- Pacheco, I. (1996). Detection and Distribution of Geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology*, 86(11), 1186. <https://doi.org/10.1094/Phyto-86-1186>
- Pagán, I. (2010). The diversity, evolution and epidemiology of plant viruses: A phylogenetic view. *Infection, Genetics and Evolution*, Vol. 65. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.07.033>
- Pagán, I., & García-Arenal, F. (2018, March 11). Tolerance to plant pathogens: Theory and experimental evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, Vol. 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030810>
- Paudel, D. B., & Sanfaçon, H. (2018). Exploring the diversity of mechanisms associated with plant tolerance to virus infection. *Frontiers in Plant Science*, Vol. 871. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01575>
- Prasanna, H. C., Kashyap, S. P., Krishna, R., Sinha, D. P., Reddy, S., & Malathi, V. G. (2015). Marker assisted selection of Ty-2 and Ty-3 carrying tomato lines and their implications in breeding tomato leaf curl disease resistant hybrids. *Euphytica*, 204(2), 407–418. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1357-8>
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., ... Zhang, Z. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5135–5140. <https://doi.org/10.1073/pnas.1400975111>
- Restif, O., & Koella, J. C. (2004). Concurrent evolution of resistance and tolerance to pathogens. *The American Naturalist*, 164(4), E90-102. <https://doi.org/10.1086/423713>

- Retes-Manjarrez, J. E., Hernández-Verdugo, S., Evrard, A., & Garzón-Tiznado, J. A. (2017). Heritability of the resistance to pepper huasteco yellow vein virus in wild genotypes of *Capsicum annuum*. *Euphytica*, 213(12), 275. <https://doi.org/10.1007/s10681-017-2071-5>
- Retes-Manjarrez, J. E., Hernández-Verdugo, S., Pariaud, B., María Melgoza-Villagómez, C., Pacheco-Olvera, A., Parra-Terraza, S., & Garzón-Tiznado, J. A. (2016). Detection of pepper huasteco yellow vein virus resistance and heritability in wild genotypes of *Capsicum annuum* L. (Vol. 41). Retrieved from www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST;
- Rodelo-Urrego, M., Pagán, I., González-Jara, P., Betancourt, M., Moreno-Letelier, A., Ayllón, M. A., ... García-Arenal, F. (2013). Landscape heterogeneity shapes host-parasite interactions and results in apparent plant-virus codivergence. *Molecular Ecology*, 22(8), 2325–2340.
- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Cathrin Pakkianathan, B., Farich, B. A., Santana-Magal, N., ... Ghanim, M. (2015, July 21). Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Current Opinion in Virology*, Vol. 15, pp. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.06.008>
- Roshan, P., Kulshreshtha, A., & Hallan, V. (2017). Genome Organization of Begomoviruses. In *Begomoviruses: Occurrence and Management in Asia and Africa* (pp. 11–32). https://doi.org/10.1007/978-981-10-5984-1_2
- Shankarappa, K. S., Sriharsha, Rangaswamy, K. T., Aswathanarayana, D. S., Prameela, H. A., Kulkarni, R. S., ... Maruthi, M. N. (2008). Development of tomato hybrids resistant to tomato leaf curl virus disease in South India. *Euphytica*, 164(2), 531–539. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9750-1>
- Shukla, A., Pagán, I., & García-Arenal, F. (2018). Effective tolerance based on resource reallocation is a virus-specific defence in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology*, 19(6), 1454–1465. <https://doi.org/10.1111/mpp.12629>
- Siddiqui, N., Rauf, A., Latif, A., Mahmood, Z. 2017. Spectrophotometric determination of the total phenolic content, spectral and fluorescence study of the herbal Unani drug Gul-e-

- Zoofa (*Nepeta bracteata* Benth). *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 12(4), 360–363. doi:10.1016/j.jtumed.2016.11.006
- Stearns, S.C. (1976) Life-history tactics: a review of the ideas. *Q. Rev. Biol.* 51, 3–47.
- Stenger, D. C., Duffus, J. E., and Viallon, B. 1990. Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709.
- Tanguy, J., & Martin, C. (1972). Phenolic compounds and the hypersensitivity reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. *Phytochemistry*, 11(1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89962-8](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89962-8)
- Tanuja, N., Ramanathan, A., Vanitha, S., Soorianathasundaram, K., & Kumar, K. K. (2019). Differential Biochemical Response among Banana (*Musa* spp.) Genotypes against Banana Bunchy Top Virus (BBTV). *Current Journal of Applied Science and Technology*, 1–11. <https://doi.org/10.9734/cjast/2019/v38i630416>
- Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Garzon-Tiznado, J. A., Pons-Hernandez, J. L., Guevara-González, R. G., ... Hernández-Verdugo, S. (2003). HortScience: a publication of the American Society for Horticultural Science. In *HortScience* (Vol. 38). Retrieved from <http://hortsci.ashspublications.org/content/38/2/251.abstract>
- Trujillo-Aguirre J, Díaz-Plaza R (1995) Obtención de cultivares de chile habanero con resistencia a virosis transmitida por mosca blanca. IV. Taller latinoamericano sobre moscas blancas y geminivirus, Zamorano, Honduras
- Valkonen, J. P. T. (1994). Natural genes and mechanisms for resistance to viruses in cultivated and wild potato species (*Solanum* Spp). *Plant Breed.* 112, 1–16. doi: 10.1111/j.1439-0523.1994.tb01270.x
- Wehner, T. C., Naegele, R. P., & Perkins-Veazie, P. (2017). Heritability and Genetic Variance Components Associated with Citrulline, Arginine, and Lycopene Content in Diverse Watermelon Cultigens. *HortScience*, 52(7), 936–940. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11255-16>
- Wright, S. I., Bi, I. V., Schroeder, S. C., Yamasaki, M., Doebley, J. F., McMullen, M. D., &

- Gaut, B. S. (2005). Evolution: The effects of artificial selection on the maize genome. *Science*, *308*(5726), 1310–1314. <https://doi.org/10.1126/science.1107891>
- Xu, P., Chen, F., Mannas, J. P., Feldman, T., Sumner, L. W., & Roossinck, M. J. (2008). Virus infection improves drought tolerance. *New Phytologist*, *180*(4), 911–921. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02627.x>
- Xu, X., Liu, X., Ge, S., Jensen, J. D., Hu, F., Li, X., ... Wang, W. (2012). Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markers for identifying agronomically important genes. *Nature Biotechnology*, *30*(1), 105–111. <https://doi.org/10.1038/nbt.2050>
- Yang, J., Zeng, J., Goddard, M. E., Wray, N. R., & Visscher, P. M. (2017). Concepts, estimation and interpretation of SNP-based heritability. *Nature Genetics*, *49*(9), 1304–1310. <https://doi.org/10.1038/ng.3941>
- Zhang, H., Mittal, N., Leamy, L. J., Barazani, O., & Song, B.-H. (2017). Back into the wild—Apply untapped genetic diversity of wild relatives for crop improvement. *Evolutionary Applications*, *10*(1), 5–24. <https://doi.org/10.1111/eva.12434>
- Zhao, J., Zhang, X., Hong, Y., & Liu, Y. (2016). Chloroplast in Plant-Virus Interaction. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1565. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01565>
- Zhigila, D. A., AbdulRahaman, A. A., Kolawole, O. S., & Oladele, F. A. (2014). Fruit Morphology as Taxonomic Features in Five Varieties of *Capsicum annum* L. Solanaceae. *Journal of Botany*, *2014*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2014/540868>