

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**“Análisis filogenético y distribución de Begomovirus
en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en
Sinaloa, México”**

**Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA:

Luis Alberto Hernández Espinal

DIRECTORA DE TESIS:

Dra Idalia Enríquez Verdugo

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dr José Antonio Garzón Tiznado

Culiacán, Sinaloa, México; mayo de 2018

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio en Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Doctorado en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

“Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México”

Que para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Agropecuarias

PRESENTA:

Luis Alberto Hernández Espinal

DIRECTORA DE TESIS:

Dra Idalia Enríquez Verdugo

CO-DIRECTOR DE TESIS:

Dr José Antonio Garzón Tiznado

ASESORES

Dr. Sixto Velarde Félix

Dr. Jesús Enrique Retes Manjarrez

Culiacán, Sinaloa, México; mayo de 2018

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **MC LUIS ALBERTO HERNÁNDEZ ESPINAL**, BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA

Dra. Idalia Enríquez Verdugo

CO-DIRECTOR

Dr. José Antonio Garzón Tiznado

ASESOR

Dr. Sixto Velarde Félix

ASESOR

Dr. Jesús Enrique Retes Manjarrez

CULIACÁN, SINALOA, MAYO DE 2018



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
REPOSITORIO INSTITUCIONAL

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacan, Sinaloa el día 12 del mes Julio del año 2021, el (la) que subscribe Luis Alberto Hernández Espinal alumno (a) del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 13751042, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y el Dr. José Antonio Garzón Tiznado y de acuerdo al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor, cede los derechos del trabajo intitulado “Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa México”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su publicación, difusión, edición, reedición, traducción, compilación, distribución y explotación en medios impresos y digitales, con fines académicos y de investigación, la que será titular del mismo, en forma conjunta o separada con el autor.

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de ésta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

En apego al Art. 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor Cedo el derecho de publicación, difusión, edición, reedición, traducción, compilación, distribución y explotación en medios impresos y digitales, con fines académicos y de investigación a la Universidad Autónoma de Sinaloa.


Luis Alberto Hernández Espinal

Nombre completo y firma



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRICULTURA DEL VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRICULTURA DEL VALLE DEL
CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 21 de mayo del año 2021, la que suscribe Luis Alberto Hernández Espinal, alumno del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 13751042, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y el Dr. José Antonio Garzón Tiznado y cede los derechos del trabajo titulado “Análisis filogenético y distribución de *Begomovirus* en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa México”, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE


Luis Alberto Hernández Espinal



UAS- Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial-Compartir Igual, 4.0 Internacional.

La presente investigación intitulada “Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México”, se realizó en el laboratorio de Patología y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Para el Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección de la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y el Dr. José Antonio Garzón Tiznado.

DEDICATORIA

A mi Familia

Esposa, Claudia María Melgoza Villagómez e hijos Aura Luz y Luis Isaac de quienes me siento orgulloso, quiero y admiro. Los amo.

A mi madre y abuelo

Luz María y Gabriel Santa María a quien admiro, quiero tanto y amo. Por educarme y por sus valiosos consejos que me han fortalecido y en la formación de mi persona.

A mis hermanos y sobrinas

Perla Marlene, Gabriel, Daniel, Alison Aradne y Amairani. A quienes quiero y admiro por sus logros.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT, por el apoyo brindado para realizar esta investigación, con beca para Luis Alberto Hernández Espinal para sus estudios en el Doctorado en Ciencias en Agropecuarias-FMVZ-UAS y el apoyo financiero a través del Proyecto del Programa PEI: CONACYT-GRUPO AGROINTER S. A. de C. B.-UAS-232704-2016 y a la DGIP-UAS por su apoyo mediante el Proyecto PROFAPI 2015/078.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con No. 302126, que me permitió desarrollar estudios de doctorado.

A la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA por proporcionar los recursos materiales y humanos necesarios para la formación en el posgrado.

Al Dr. José Antonio Garzón Tiznado por permitir formar parte de su grupo de trabajo, asesoría y dirección en este proyecto y por contribuir a la formación profesional. Gracias por su apoyo, confianza y amistad.

A la Dra. Idalia Enríquez Verdugo por su asesoría y dirección en este proyecto. Gracias, por brindarme su apoyo, confianza y amistad.

A los integrantes del comité tutorial, Dr. Sixto Velarde Félix y Dr. Jesús Enrique Retes Manjarrez. Por las sugerencias, consejos, apoyo y observaciones que permitieron la mejora del trabajo.

A los compañeros Mónica Inari, Cynthia Yareli, Bryanda, Elida, Sergio Gilberto e Isaías, del laboratorio de Patología y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Por su amistad.

Al Ing. Tomas Moreno Gallegos por permitir formar parte de su grupo de trabajo y por contribuir a la formación profesional. Gracias por su apoyo, confianza y amistad.

CONTENIDO	PÁGINA
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN	1
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
1.2.1. Chile (<i>Capsicum annuum</i>).	3
1.2.2. Generalidades de los Geminivirus.	4
1.2.3. Mecanismos que generan la diversidad genética de los Geminivirus.....	19
CAPÍTULO 2. Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) en Sinaloa, México.....	22
2.1. INTRODUCCIÓN	22
2.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
2.2.1. Extracción de ADN.....	26
2.2.2. Amplificación de ADN viral por PCR.	26
2.2.3. Secuenciación y análisis.....	28
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
2.3.1. Detección de Geminivirus.	29
2.3.2. Secuenciación y análisis genético.	32
2.3.3. Análisis genético y secuenciación.....	33
2.3.4. Análisis filogenético.	35
CAPÍTULO 3. Variantes de Begomovirus que infectan al cultivo del chile en Sinaloa	38

3.1. INTRODUCCIÓN	38
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	40
3.2.1. Extracción de ADN.....	40
3.2.2. Amplificación de ADN viral por PCR.....	41
3.2.3. Amplificación por círculo rodante.....	41
3.2.4. Análisis de restricción de los componentes genómicos virales.....	42
3.2.5. Clonación e hibridación de los componentes.....	42
3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
3.3.1. Detección de Geminivirus.....	44
3.3.2. ACR y clonación de Begomovirus.....	44
CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES.....	48
CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA	49
ANEXOS 6	62
6.1. Secuencias reportadas en la base de datos GenBank de PHYVV	62
6.2. Secuencias reportadas en la base de datos GenBank de PepGMV	74
6.3. Secuencia reportada en la base de datos GenBank de TYLCV	76
6.4. Constancia de Congreso internacional	77
6.5. Estancia de investigación (Beca mixta de CONACYT)	78

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Nomenclatura, localización, sentido de la transcripción y función de los genes de Begomovirus bipartitas.	14
2	Localización geográfica de los sitios de muestreo, de tejido foliar de plantas de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) con síntomas de Geminivirus en Sinaloa, México, 2013-2016.	24
3	Detección de Geminivirus (PHVVY, PepGMV, TYLCV y otro Begomovirus) en plantas de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) sintomáticas, mediante PCR.	30
4	Porcentaje de identidad con base en las secuencias nucleotídicas de PHYVV detectadas en campos agrícolas del estado de Sinaloa, México, con lo reportado en la base de datos GenBank.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Organización Genómica del virus huasteco del chile (PHV).	12
2	Síntomas del PHV en hojas de chile tipo Jalapeño.	18
3	Detección de Begomovirus (PHYVV, PepGMV y TYLCV) en plantas de chile, mediante PCR en gel de agarosa al 1.5%.	29
4	Frecuencia de infecciones simples y mixtas causadas por Geminivirus, en base al total de muestras colectadas en el cultivo del chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) en Sinaloa, México.	32
5	Distribución de Begomovirus en el cultivo de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.), en Sinaloa, México.	33
6	Análisis filogenético basado en secuencias parciales del gen de la replicasa (Rep), región común (RC) y región intergénica (RI) del Virus PHYVV, aislados de muestras de Sinaloa, México.	37
7	ADN de genomas amplificado por ACR de muestras del cultivo de chile con síntomas de Begomovirus.	44
8	Amplicones de ACR digeridos con enzimas de restricción.	45
9	Análisis molecular por hibridación para la detección general de Begomovirus en clonas, utilizando como sonda general el fragmento del gen de la cubierta de la proteína (CP) del Pepper golden mosaic virus (PepGMV).	47

RESUMEN

Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México

Luis Alberto Hernández Espinal

En el año 2017, el cultivo del chile en México registró una producción de 3 millones 54 mil toneladas. En los últimos cinco años, se han registrado daños económicos y pérdidas de un 20% en la producción de chile a causa de Geminivirus. El objetivo del presente estudio fue determinar la distribución y variabilidad genética de los Begomovirus que infectan al chile en las principales zonas productoras de Sinaloa. Se colectaron un total de 121 muestras de chile con síntomas de Begomovirus en los municipios de Escuinapa, Rosario, Concordia, Mazatlán, Elota, Culiacán, Guasave y Ahome. En 121 muestras se detectaron Begomovirus mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); el PHYVV se detectó en el 74.4% de las muestras, el PepGMV en el 53.7%, el TYLCV en el 5.8% y en el 12.4% no se identificó el tipo de Begomovirus. Además, se detectaron infecciones mixtas entre los Virus PHYVV, PepGMV y TYLCV con el 5.8% y en la combinación PHYVV y PepGMV con el 36.4%. Este es el primer reporte de una infección mixta bajo condiciones de campo en plantas de chile con un Begomovirus monopartita (TYLCV) y dos Begomovirus bipartitas (PHYVV y PepGMV) en los municipios del Rosario, Culiacán y Ahome del estado Sinaloa, México. Los Virus PHYVV, PepGMV y TYLCV presentaron identidad nucleotídica del 94 al 99%, con lo reportado en GenBank. TYLCV se detectó en diferentes genotipos de chile; serrano, jalapeño, morrón y ancho en los municipios del Rosario, Culiacán y Ahome, lo cual indica una amplia distribución y rango de hospedantes de este begomovirus en los diferentes genotipos de chile cultivados en Sinaloa.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, Begomovirus, distribución, análisis filogenético.

ABSTRACT

Phylogenetic analysis and distribution of Begomovirus infecting pepper crops (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa, México

Luis Alberto Hernández Espinal

The culture of the pepper, in 2017, Mexico register a production of 3 million 54 thousand tons. In the last five years, Geminivirus cause economic hurts and losses in the production of the culture of the pepper in Mexico of 20 %. The objective of the present study is to determine the distribution and genetic variability of the Begomovirus that infect pepper in Sinaloa principal producing zones. A total of 121 pepper samples were collected of peppers with symptoms of Begomovirus in municipalities of Escuinapa, Rosario, Concordia, Mazatlán, Elota, Culiacán, Guasave y Ahome. In 121 samples fragments were detected of Begomovirus by means of the technology of chain reaction of the polymerase (PCR); PHYVV detected to itself in 74.4 % of the concerned, PepGMV in 53.7 %, TYLCV in 5.8 % and 12.4 % did not detected the type of Begomovirus. Mixed infections among PHYVV, PepGMV and TYLCV viruses were detected with 5.8% and in the combination PHYVV and PepGMV with 36.4%. This is the first report of a mixed infection field conditions in plants of pepper with Begomovirus monopartite (TYLCV) and two Begomovirus bipartite (PHYVV y PepGMV) in Rosary, Culiacán and Ahome state of Sinaloa, Mexico. Sequencing and comparison of fragments PHYVV, PepGMV and TYLCV, resulted with a nucleotide identity of 94 to 99%, with that reported in GenBank. Presence was detected TYLCV infecting different genotypes of pepper; highland, jalapeño, bell and width in the municipality of the Rosario, Culiacán and Ahome, indicating a wide distribution and host range of this Begomovirus and among different genotypes of pepper this crop in Sinaloa.

keys words: *Capsicum annuum*, Begomovirus, distribution, phylogenetic analysis.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN Y REVISIÓN DE LITERATURA

1.1. INTRODUCCIÓN

Los Geminivirus constituyen la familia más grande, diversa y económicamente importante de los virus de DNA de plantas (Rojas *et al.*, 2005). Con pérdidas entre un 20 y un 100% (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Los síntomas más comunes son enanismo, mosaicos, moteados, necrosis, clorosis, deformaciones, etc. (Agrios, 2005). En México, la primera mención de una enfermedad posiblemente causada por Geminivirus se realizó durante el ciclo agrícola 1970-1971. La familia Geminiviridae se clasifica en nueve géneros definidos con base en el vector que los transmite, el hospedero que infecta y estructura genómica (Mastresvirus, Becurtovirus, Curtovirus, Topocuvirus, Turncurtovirus, Eragrovirus, Capulavirus, Grablovirus y Begomovirus) (Fauquet *et al.*, 2003; ICTV, 2017). Dentro del grupo más ampliamente diversificado y distribuido se encuentran los Begomovirus, los cuales infectan principalmente plantas dicotiledóneas y son transmitidos por la mosquita blanca. El genoma de los Begomovirus es generalmente bipartita a excepción del virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) (Lazarowitz, 1992). Los componentes genómicos son denominados como DNA-A y DNA-B con tamaño molecular que oscila entre 2.7 y 3.0 kb, respectivamente (Yadava *et al.*, 2010). Los Begomovirus se han diseminado rápidamente por el planeta debido, fundamentalmente, a la propagación de su vector, la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Anaya-López *et al.*, 2013).

Además de las mutaciones, en los virus existe gran variación genética debida a recombinaciones y a la adquisición de genomas adicionales (Stange, 2006). Por la importancia de los Geminivirus como patógenos a escala mundial, se necesita de métodos rápidos y seguros para su detección y posterior identificación, lo cual facilita los estudios de epidemiología y de diversidad genética del grupo. Esta información podría tener consecuencias importantes para el diseño de estrategias relacionadas con la resistencia a enfermedades y el manejo integrado. La identificación precisa del virus y del vector, así como el conocimiento de la distribución del sistema patogénico puede facilitar un mejor control de la plaga (Brown, 2000). El estado de Sinaloa, es uno de los principales productores de chile tipo "morrón" y picosos como chiles tipo ancho, serrano y jalapeño, con una superficie de 15, 487 hectáreas y una producción de 697,248 toneladas, en el año agrícola 2017 (SIAP, 2018). Sin embargo, en los últimos años el problema limita la producción, causado por virus transmitidos por mosquita blanca de los cuales se desconoce su identidad y la manera que estos infectan a los cultivos, ya sea en forma independiente o infecciones mixtas. La hipótesis de la presente investigación, es posible conocer la identidad, distribución, variabilidad y agrupación filogenética de Begomovirus que infectan al cultivo de chile en Sinaloa, México. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la distribución, variabilidad genética y asociación entre los Begomovirus que infectan chile, en las principales zonas productoras de Sinaloa, México durante los periodos agrícolas 2013-2016.

1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

1.2.1. Chile (*Capsicum annuum*).

1.2.1.1. Generalidades del cultivo.

El chile es un producto con una tradición milenaria en México. La historia ha permitido conocer que existen restos arqueológicos que datan de 5,000 a 7,000 mil años A.C., en el Valle de Tehuacán; inclusive se especula haber sido el primer cultivo realizado por el hombre mesoamericano. En varios sitios arqueológicos han sido encontrados evidencias de la existencia de chile en la época prehispánica como semillas carbonizadas o partes de semillas (Laborde y Pozo, 1984).

Su origen se sitúa en América Latina en el Sur (Perú, Bolivia y Brasil) desde donde se expandió al resto de América Central y Meridional; siglos antes de la llegada de los españoles al Continente Americano el Chile era cultivado y utilizado como alimento en la dieta diaria de estos pueblos conjuntamente con el maíz, frijol y calabaza (Huerres y Caraballo, 1988).

El género *Capsicum* pertenece a la familia *Solanaceae*, está conformado por aproximadamente 30 especies y posiblemente domesticado simultáneamente en Centroamérica y Sudamérica. Hay cinco especies domesticadas: *Capsicum annuum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. baccatum*. *Capsicum annuum* es la más importante por su producción, distribución geográfica, variabilidad de formas y amplia diversidad de usos (Hernández-Verdugo *et al.*, 1999).

El género *Capsicum* se cultiva en las principales regiones tropicales, subtropicales y templadas de México. En los Estados de Puebla, Morelos y Querétaro, se encuentra la mayor diversidad de chiles cultivados y silvestres. Esta especie se cultiva de 0 hasta 2500 m de altitud y sus frutos se encuentran en el mercado todo el año para consumo fresco, seco o industrializado (Pozo *et al.*, 1991). Los frutos de *C. annuum* son una fuente importante de capsicinas (brinda la pungencia o picor al chile),

y se usan para la producción de cosméticos, esencias y medicinas (Luján y Acosta, 2004).

En relación a los problemas fitosanitarios del cultivo de chile en México se han reportado veinte de los cuarenta y tres virus fitopatógenos consignados (Barrera-Pacheco *et al.*, 2008), sin embargo se han reportado 45 virus fitopatógenos a nivel mundial, de los cuales, 13 son reportados para chile en México (Pérez y Rico, 2004; Núñez *et al.*, 1996), donde los Geminivirus ocupan un lugar relevante, causando pérdidas en la producción desde un 20 hasta el 100% (Barrera-Pacheco *et al.*, 2008).

El chile es una planta de comportamiento anual y perenne, tiene tallos erectos, herbáceos y ramificados de color verde oscuro, el sistema de raíces llega a profundidades de 0.70 a 1.20 m, y lateralmente hasta 1.20 m, la altura promedio de la planta es de 60 cm, las hojas son planas, simples y de forma ovoide alargada, las flores son perfectas (hermafroditas), formándose en las axilas de las ramas; son de color blanco y a veces púrpura, el fruto en algunas variedades se hace curvo cuando se acerca a la madurez; el color verde de los frutos se debe a las altas cantidades de clorofila acumulada, los frutos maduros toman color rojo o amarillo debido a pigmentos (licoperisina, xantofila y caroteno), la picosidad es debida al pigmento capsicina (SIAP, 2018).

1.2.2. Generalidades de los Geminivirus.

1.2.2.1. Descripción y clasificación.

Los Geminivirus son virus fitopatógenos. Su nombre deriva de la morfología de su partícula, ésta semeja dos poliedros regulares idénticos unidos (gemini = gemelos). El genoma de los Geminivirus consiste de una o dos moléculas de DNA de cadena sencilla (ssDNA), covalentemente circularizada y con un tamaño entre 2.5 a 3.0 kb. Los Geminivirus se replican en el núcleo de las células vegetales infectadas mediante un intermediario de doble cadena (dsDNA) (círculo rodante) (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Gutiérrez, 2000). El dsDNA viral se ensambla en el núcleo para formar un minicromosoma, a partir del cual se transcriben los genes virales. Los Geminivirus

codifican únicamente para 4 a 6 genes entre los cuales no figura ninguna DNA polimerasa; por esa razón dependen para su replicación de las enzimas del hospedante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Gutiérrez, 2002).

La transcripción de los genes geminivirales es bidireccional, se producen transcritos tanto hacia la orientación derecha (siguiendo las manecillas del reloj) como en el sentido izquierdo o complementario (contra las manecillas). La transcripción depende de RNA polimerasas y otros factores transcripcionales del hospedero (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). En el componente A se encuentran codificadas las siguientes proteínas: Rep, indispensable para la replicación viral; REn, proteína que aumenta la replicación; TrAp, proteína que transactiva la expresión de los genes de CP y NSP; y CP, la proteína de la cápside. En el componente B se encuentran los genes de la proteína MP, necesaria para el movimiento célula-célula y la proteína NSP, responsable del transporte del genoma viral de núcleo a citoplasma (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999). La familia Geminiviridae se clasifica en nueve géneros definidos con base en el vector de transmisión, el hospedero que infecta y estructura genómica (Mastresvirus, Becurtovirus, Curtovirus, Topocovirus, Turncurtovirus, Eragrovirus, Capulavirus, Grablovirus y Begomovirus) (Fauquet *et al.*, 2003; ICTV, 2018). Dentro del grupo más ampliamente diversificado con 322 especies reportadas a la fecha y distribuido se encuentran los Begomovirus, los cuales infectan principalmente plantas dicotiledóneas y son transmitidos por la mosquita blanca. El genoma de los Begomovirus es generalmente bipartita a excepción del Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) (Lazarowitz, 1992). Los reportes sitúan a los Geminivirus transmitidos por mosquita blanca en todos los continentes: Norte, Centro y Sudamérica, Europa básicamente en la zona mediterránea, el Medio Oriente, Asia y Australia, África y la India (Markham *et al.*, 1994). En México y Latinoamérica sólo se han reportado miembros del género Begomovirus, por lo tanto, este trabajo se enfocará a dicho género (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2000).

1.2.2.2. Fitopatología geminiviral.

La sintomatología ocasionada por los Geminivirus puede ser similar a la causada por deficiencias nutrimentales y a los inducidos por otras familias de virus, principalmente los Potyvirus y los Tobamovirus, lo cual ha dificultado el diagnóstico de los Geminivirus mediante las técnicas convencionales. Estos síntomas varían enormemente dependiendo de cada hospedero, la etapa del cultivo, el Geminivirus e incluso la latitud en que se encuentre (condiciones ambientales: temperatura, humedad, entre otros). Cuando el virus ataca a plántulas recién germinadas ocasiona una pérdida total y cuando se lleva a cabo en estadios secundarios se pierde hasta un 55%. Lo anterior depende del tiempo de infección, las variedades infectadas y las variantes del virus, así como de otras características agronómicas y ambientales (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2000).

1.2.2.3. Identificación de Geminivirus en México.

En México, la primera mención de una enfermedad posiblemente causada por Geminivirus se realizó durante el ciclo agrícola 1970-1971 (Fauquet *et al.*, 2003). En uno de los primeros trabajos desarrollados por el grupo de Virología Vegetal del Cinvestav se sugirió que algunas enfermedades como el “enchinamiento” del tomate en Sinaloa y “planta atigrada” o “rizado amarillo del chile” en Tamaulipas fueron causadas por Geminivirus (Garzón-Tiznado *et al.*, 1989). Se identificaron varias secuencias virales provenientes de plantas enfermas. Dos de las secuencias correspondían a los componentes A y B de un Geminivirus bipartita. El Geminivirus identificado fue denominado virus huasteco del amarillamiento de las venas del chile (PHYVV, Pepper huasteco yellow vein virus), en alusión a la sintomatología producida en plantas de chile y a la región de “Las Huastecas” en donde fue detectado. Además, se confirmó el “rizado amarillo del chile” era una enfermedad compleja en la que podían estar involucrados hasta 4 Geminivirus diferentes. Entre éstos se podía encontrar al PHYVV ya mencionado y al Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV, Pepper golden mosaic virus), este último también caracterizado en el laboratorio (Garzón-Tiznado *et al.*, 1995; Torres-Pacheco *et al.*, 1993; 1996).

Una vez identificados los agentes patogénicos, y con base en información sobre cultivos de chile a lo largo del país presentaban síntomas similares, se realizaron estudios para la detección y la distribución de los mencionados Geminivirus. Torres-Pacheco *et al.* (1996), reportaron el virus de mayor distribución en las principales áreas productoras de hortalizas en México era el PHYVV, mientras el PepGMV y el CdTV estaban distribuidos de una manera más restringida. Posteriormente, se realizaron otros estudios en otras áreas del país para confirmar la importancia de PHYVV y PepGMV en las diferentes regiones agrícolas. En la península de Yucatán se realizó un escrutinio para analizar la distribución de Geminivirus, debido a pérdidas de hasta el 95% en cultivos de chile, los resultados obtenidos en este escrutinio fueron positivos para PHYVV y PepGMV y además, se detectaron otros Geminivirus previamente caracterizados en países vecinos: el virus del moteado del tomate (ToMoV, Tomato mottle virus), el virus del mosaico dorado del frijol (BGMV, Bean golden mosaic virus) y el virus del amarillamiento y enrollamiento de la hoja del tomate (TYLCV, Tomato yellow leaf curl virus) (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999; Díaz-Plaza *et al.*, 2002; Díaz-Plaza, 2003). Este último ya había sido reportado como causa de devastaciones en cultivos hortícolas en la zona del Mediterráneo (Israel y Europa) y más recientemente se había reportado en el Caribe, incluyendo República Dominicana y Cuba (Polston 1998; Ramos *et al.*, 1996).

1.2.2.4. Transmisión de los Begomovirus por su insecto vector.

Los Begomovirus son transmitidos por un complejo de la especie *Bemisia tabaci* (mosquita blanca). La transmisión de los Geminivirus por sus insectos vectores es del tipo circulativo, no propagativo. Este tipo de transmisión involucra el paso del virus a través del cuerpo del insecto y consiste de dos fases: primero es la adquisición del virus, en la cual pasa hasta la hemolinfa vía la pared del tracto digestivo y segundo la inoculación del virus en la planta, la cual requiere el paso del virus desde la hemolinfa hasta las secreciones salivares (Liu *et al.*, 1997; Palmer y Rybicki, 1998). Respecto a la proteína de la cápside, se ha visto que en el caso de los Begomovirus casi no hay variación entre los diferentes virus, caso opuesto al de los Curtovirus y Mastrevirus, en

donde las diferencias son mayores. La importancia de este hecho, intercambiando el gen de la proteína de la cápside entre dos virus transmitidos por diferentes vectores, consiguiendo una alteración en el patrón de transmisión, donde la proteína de la cápside puede mediar la transmisión para mosquita blanca o para chicharrita cuando es intercambiada (Briddon *et al.*, 1996). En el vector (mosquita blanca), los Geminivirus han sido observados en células epiteliales del intestino, así como en las glándulas salivales accesorias. En el caso específico de Begomovirus, éstos se han localizado por fluorescencia en los primeros dos tercios del intestino medio y no fueron encontrados ni en el esófago, la boca del intestino, ni en el último tercio del mismo (Hunter *et al.*, 1998).

La familia Aleyrodidae (orden Hemiptera) está constituida por pequeños insectos, la mayoría de sólo 1-3 mm, comúnmente conocidos como moscas blancas, porque las alas y los cuerpos de los adultos están cubiertos con una cera blanca. En la mayoría de los hospederos, las etapas inmaduras se desarrollan en la superficie abaxial de las hojas. A pesar de que son insectos principalmente tropicales, las moscas blancas se encuentran en las regiones cálidas del mundo y varias especies también son plagas graves para cultivos bajo invernadero en las zonas templadas. El daño se produce cuando la mosca blanca se alimenta de la savia del floema de las plantas, reduciendo así el vigor de las mismas. Las moscas blancas también excretan melaza, donde crecen hongos e interfiere con la fotosíntesis y puede reducir la calidad de la cosecha. En algunos hospedantes, el daño puede ser resultado de la excreción de toxinas que causan desórdenes en las plantas tales como el plateado foliar de las cucurbitáceas (Brown *et al.*, 1992) y la maduración irregular del tomate (Schuster *et al.*, 1990). Desde el punto de vista fitopatológico, sin embargo, el principal problema causado por las moscas blancas es su capacidad para transmitir virus. De los aproximadamente 1 500 especies de moscas blancas descritas (Martin *et al.*, 2004), sólo unas pocas se ha demostrado que sean vectores de virus, incluyen miembros de los géneros Begomovirus, Crinivirus, Carlavirus, Ipomovirus y Torradovirus. La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius), tiene una larga historia como grave plaga de la agricultura en el mundo. El insecto se conoce como *B. tabaci*, fue inicialmente descrito en tabaco en Grecia y nombrado *Aleyrodes tabaci* (Gennadius, 1889) y luego descrito en Florida

como *Aleyrodes incospicua* (Quaintance, 1990). La también llamada “mosca blanca del tabaco” fue posteriormente descrita como una plaga en este cultivo, siendo vector de la enfermedad del enrollamiento de la hoja del tabaco en países del este de África (Storey, 1931) e Indonesia (Thung, 1932). Al mismo tiempo, con el nombre de “mosca blanca del algodón” fue descrita en el oeste de África y Sudán, actuando como vector de la enfermedad del enrollamiento de la hoja del algodón (Golding, 1930; Kirkpatrick, 1931). En América, la presencia de *B. tabaci* se mencionó por primera vez en El Salvador (1961), México (1962) y Brasil (1968) (Stanley y Naranjo, 2010). Este insecto se alimenta de más de 1 000 especies de plantas pertenecientes a más de 100 familias vegetales, exhibe polimorfismo biótico y sus diferentes biotipos son morfológicamente indistinguibles (Jones, 2003). *B. tabaci* es un complejo de variantes genéticas o haplotipos, por lo general, se denominan biotipos (Gill y Brown, 2010). Aunque las distintas poblaciones de *B. tabaci* no pueden distinguirse por características morfológicas, ciertas variaciones genéticas y de comportamiento se han utilizado para caracterizar los distintos biotipos/haplotipos. Estas incluyen perfiles de isoenzimas, secuencia del gen de la subunidad I de la citocromo oxidasa mitocondrial (mtCOI), rasgos del ciclo biológico, gama y/o preferencia de hospedantes, capacidad de transmisión de virus, poblaciones de endosimbiontes, resistencia a insecticidas y la capacidad de producir progenie viable a partir de cruzamientos entre ellas (Brown, 2010). Estudios de la variabilidad de secuencia del gen mtCOI han sugerido que *B. tabaci* es en realidad un complejo de al menos 24 especies crípticas, es decir, indistinguibles morfológicamente (Dinsdale *et al.*, 2010). En América, la introducción del biotipo B de *B. tabaci* se describió por primera vez en Florida, en flores de pascua (*Euphorbia pulcherrima*) en 1986. Una vez introducido, el biotipo B se movió rápidamente a tomate y otros cultivos de hortalizas, provocando la transmisión de Begomovirus y causando importantes pérdidas económicas. El biotipo B también fue transportado en flores de pascua al suroeste de Estados Unidos (California, Arizona, y Texas) y al Caribe. Al final de la década de 1980, el biotipo B se había detectado en la mayoría de las regiones agrícolas tropicales y subtropicales del Nuevo Mundo, desplazando al biotipo local, denominado biotipo A (Brown *et al.*, 1995). El biotipo B se introdujo en Australia a principios de la década de 1990 y en China a mediados de la

misma década, desplazando a los biotipos locales (Liu *et al.*, 2007). En los últimos años, el biotipo Q, de origen mediterráneo, ha invadido muchas áreas en todo el mundo, incluyendo Estados Unidos, donde fue encontrado en 2004 en plantas de flor de pascua en Arizona (Dalton, 2006). La presencia del biotipo Q en el Nuevo Mundo supone un nuevo problema debido a su alta propensión a desarrollar resistencia a insecticidas, como se ha documentado en el sur de España (Nauen y Denholm, 2005). El biotipo Q también ha invadido en la última década Asia. En China, probablemente fue introducido en 2003, por la importación de plantas ornamentales (Chu *et al.*, 2006), habiéndose convertido en el biotipo predominante en los últimos años (Teng *et al.*, 2010).

1.2.2.5. Daños y distribución de Geminivirus en México.

Los Geminivirus probablemente se encuentran distribuidos en todas las áreas hortícolas del país. En muchos casos se ha ampliado su zona de influencia, debido a la mosquita blanca ha invadido regiones y hospederos que normalmente no frecuentaba (zonas altas del Valle de México, por ejemplo), arrastrando consigo la presencia de estos devastadores agentes infecciosos. Se han encontrado a los Geminivirus en altitudes de alrededor de 2000 m sobre el nivel del mar, aunque hay evidencias de que tal vez no se trate de *Bemisia* sino de *Trialeurodes*, la mosquita que está transmitiendo Geminivirus en esa zona (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Torres-Pacheco *et al.*, (1996), reportaron la presencia de Geminivirus en chile, tomate, tabaco, calabaza y tomatillo (*Physalis* spp.) con una distribución en los estados de Baja California Sur, Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Oaxaca, Chiapas, Coahuila, Tamaulipas, Guanajuato, San Luis Potosí, Puebla, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo. Recientes muestreos han detectado la presencia de Geminivirus en los estados de Hidalgo, Tlaxcala, Guerrero, Chihuahua y Morelos, en diferentes cultivos (Ascencio-Ibáñez, De la Torre-Almaraz, García-Sánchez, datos no publicados). También se ha localizado ya al TYLCV, devastador Geminivirus del tomate, en la península de Yucatán (Ascencio- Ibáñez *et al.*, 1999). Lo anterior indica el nivel de inóculo así como su diseminación están incrementándose y si no se consiguen

métodos de control apropiados, o al menos una concientización de los productores para implementar el manejo integral de sus cultivos, el daño que los Geminivirus van a producir a la horticultura nacional será devastador (Ascencio- Ibáñez *et al.*, 2000).

1.2.2.6. Organización genómica.

Los genomas geminivirales están conformados por uno o dos componentes de DNA circular de cadena sencilla, de 2.5 a 3.0 kb de tamaño cada uno (Palmer y Rybicki, 1998). Cuando los Geminivirus son bipartitas, sus componentes genómicos son llamados DNA A y DNA B. En el DNA A se encuentran funciones necesarias para replicación, transcripción y encapsidación, mientras en el DNA B son codificadas funciones de movimiento (Sudarshana *et al.*, 1998; Noueir *et al.*, 1994). Cada componente contiene unidades de transcripción divergentes, separadas por una región intergénica (RI) de aproximadamente 300 bases. En la región intergénica se localiza una secuencia denominada Región Común (RC) de aproximadamente 200 nt, idéntica para ambos componentes de un mismo Geminivirus pero diferente entre distintos Geminivirus. Esta RC contiene un elemento de 30 nt con el potencial termodinámico de formar una estructura en horquilla, rica en G-C en el tallo y una secuencia conservada rica en A-T en el asa, la cual contiene el sitio de inicio de la replicación. Además, en la RI se encuentran las regiones reguladoras las cuales permiten la expresión coordinada temporal y espacial de los genes. El genoma viral se empaqueta dentro de su estructura proteica solamente como una hebra circular de DNA de cadena sencilla que se considera como positiva o de sentido del virión. Los genes de los Geminivirus se nombran por su posición. Los genes en sentido del virión se denotan con una V y los genes en sentido de la cadena complementaria con una C, seguido de un número secuencial. Para el caso de los Geminivirus bipartitas, el nombre de cada gen es antecedido por la letra A o B dependiendo del componente genómico en que se encuentre (Figura 1) (Torres-Pacheco *et al.*, 1993).

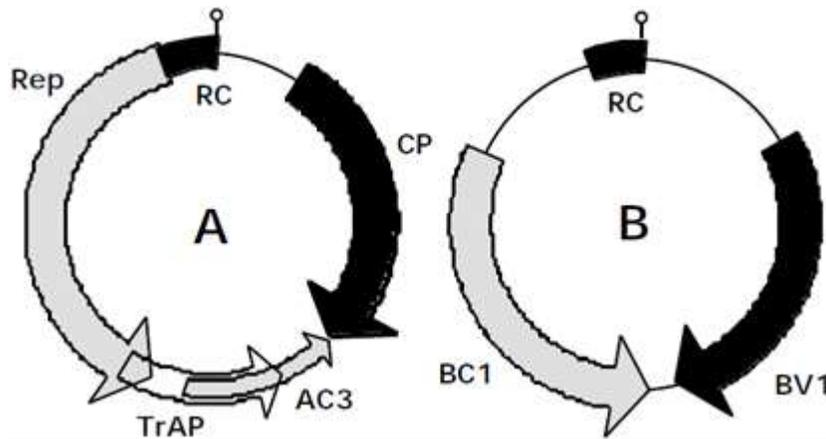


Figura 1. Organización Genómica del virus huasteco del Chile (PHV). El genoma del virus está compuesto por dos moléculas de DNA de cadena sencilla (componentes A y B). Ambos componentes son heterólogos entre sí. Únicamente comparten una región con alto porcentaje de identidad (>95%) de alrededor de 180 nucleótidos denominada Región común (RC). Parte de la RC tiene la capacidad de formar una estructura tipo horquilla (tallo-asa) (Torres-Pacheco *et al.*, 1993).

1.2.2.7. Proteínas virales.

La proteína Rep es requerida para la replicación en todos los Geminivirus. Muchos Geminivirus (Curtovirus y Begomovirus), también codifican para una segunda proteína involucrada en replicación, llamada REn, la cual incrementa notablemente la misma. Rep tiene un papel importante en la replicación viral, pero también en la transcripción. Confiere reconocimiento virus-específico de su origen de replicación correspondiente (cognado) e inicia la replicación del DNA de hebra positiva. Además, reprime su propia expresión a nivel de transcripción y puede incrementar la transcripción de genes tardíos en algunos Geminivirus. En los Begomovirus y los Curtovirus, la proteína Rep es codificada por un sólo marco de lectura abierto en el sentido del virión, produciendo una sola proteína funcional.

TrAP. El marco de lectura TrAP presente en Begomovirus, codifica para una proteína que transactiva la expresión del gen de la proteína de la cápside y de una de las proteínas del movimiento (BR1). En el caso de bipartitas dicha transactivación parece ser mediada por elementos de secuencia discretos, actúan en cis y además son específicos para la acción de TrAP. La proteína como tal presenta un dominio

básico, otro dominio es un atípico “dedo de zinc” y un tercer dominio ácido (Sunter y Bisaro, 1992).

REn. Existe otra función codificada por los virus, corresponde a un potenciador de la replicación llamado REn, dicho gen no es indispensable para la replicación, pero la potencia significativamente (su ausencia reduce en más de 50 veces la tasa replicativa). Este gen sólo se ha encontrado en los géneros Curtovirus y Begomovirus. Se desconoce cómo esta proteína afecta la replicación, pero podría estar actuando dando estabilidad al DNA de cadena sencilla en la interconversión de DNA de cadena sencilla a DNA de cadena doble, o controlando algún paso en el ensamble de la partícula viral (Hormuzdi y Bisaro, 1993; Lazarowitz, 1992).

Proteína de la Cápside. La Proteína de la Cápside (PC) es codificada por un marco de lectura abierto, va en el sentido del virión. Es la más abundante de las proteínas virales durante una infección. Aparentemente, protege al virión durante su paso por el vector y parece estar relacionada con la especificidad al mismo. En Begomovirus, la PC no es indispensable para el desarrollo de los síntomas (Frischmut *et al.*, 1993). La proteína de la cápside también está involucrada, en algunos casos, en el movimiento del virus dentro de la planta (Boulton *et al.*, 1989). Las funciones de la PC pueden ser diferentes para el caso de los Geminivirus monopartitas y bipartitas. Por otro lado, mientras en los Geminivirus transmitidos por mosquita blanca la proteína de la cápside se encuentra bastante conservada, aquéllos transmitidos por cicadélidos muestran mucha mayor variación, pudiendo asumirse entonces, la PC está directamente involucrada en la transmisión por vectores e incluso en la especificidad de los mismos (Cuadro 1) (Bridson *et al.*, 1996).

Cuadro 1. Nomenclatura, localización, sentido de la transcripción y función de los genes de Begomovirus bipartitas (Zúñiga-Vega *et al.*, 2002).

Nomenclatura				Función	Localización	Sentido de la transcripción
AC1	AL1	rep	Duplicación del ADN	Componente A	Complementario	
AC2	AL2	trap	Transactivación de AV1 y BV1	Componente A	Complementario	
AC3	AL3	ren	Incrementa la eficiencia de la multiplicación	Componente A	Complementario	
AC4	AL4		No se conoce	Componente A	Complementario	
AV1	AR1	cp	Proteína de cubierta	Componente A	Viral	
BC1	BL1	mp	Movimiento del virus de célula a célula por plasmodesmos	Componente B	Complementario	
BV1	BR1	nsp	Movimiento del virus hacia afuera del núcleo	Componente B	Viral	

1.2.2.8. Proceso de infección.

Se desconoce la secuencia precisa de eventos durante el proceso de infección, pero se ha propuesto un modelo en el cual se ilustra la regulación temporal y espacial de los genes virales. El proceso inicia con el desencapsidamiento del virus y la entrada de su DNA al núcleo celular. Ya en el núcleo, tiene lugar la síntesis de la cadena complementaria, un proceso dependiente de la maquinaria biosintética celular. De este modo, se generaría la forma viral, es transcripcionalmente activa (DNA cd o FR, forma replicativa) y tendría lugar la expresión de los genes necesarios en las etapas tempranas de la infección, como Rep, TrAP y REn. Al ocurrir la replicación del DNA viral, se alcanzan ciertos niveles de Rep y ésta se autorreprimiría permitiendo así la expresión de TrAP y REn en proporciones más elevadas. Después de la expresión de los genes tempranos por parte de los factores del huésped, se regula la expresión de los genes tardíos, como la cápside y los genes del movimiento, con intervención de la proteína viral TrAP. Finalmente, se procedería con el ensamble de las nuevas partículas virales y su diseminación en la planta (Ascencio- Ibáñez *et al.*, 2000).

1.2.2.9. Mecanismo de replicación.

Los Geminivirus se replican en el núcleo de las células vegetales infectadas por el mecanismo del círculo rodante de intermediarios replicativos virales (Stenger *et al.*,

1991), los Geminivirus no codifican sus polimerasas por lo tanto la replicación de su ADN depende de la maquinaria replicativa de la célula (Stanley, 1995); en una célula infectada el ADN cadena sencilla (ADNcs o DNAdS de las siglas en inglés DNA double strand) es transportado al núcleo, donde se convierte en ADN de doble cadena (ADNdc), sirve como plantilla para la replicación y la transcripción (Johns *et al.*, 2009). Esto se dedujo inicialmente por la acumulación de partículas virales en el núcleo, ya fuera como agregados irregulares o como arreglos cristalinos irregulares (Davies y Stanley, 1989). Con respecto a su replicación, los Geminivirus se encuentran en un grupo aparte entre los virus que infectan vegetales. El sitio de origen de la replicación incluye la horquilla y varias regiones contiguas de aproximadamente 200 nt del extremo 5' de la RI (Rojas *et al.*, 2005). La replicación se lleva a cabo mediante dos mecanismos: círculo rodante y la replicación dependiente de recombinación (RDR); el primero, es similar al mecanismo utilizado por los bacteriófagos X174 y M13 (Stanley, 1995). La segunda ocurre vía recombinación homóloga entre un ADNcs y un ADN circular covalentemente cerrado (Jeske *et al.*, 2001). La replicación por círculo rodante se inicia por el clivaje de la cadena de ADN viral mediante la proteína viral REP en el origen de replicación, en una secuencia invertida rica en guanina y citosina, el sitio de inicio de la replicación de la cadena viral está localizado en el nano nucleótido TAATATTAC, ubicado en el asa de la horquilla, la proteína Rep cliva esta secuencia en la posición séptima u octava (TAATATT*AC), exponiendo el extremo 3'OH sirva de iniciador para la replicación del ADN viral (Hanley *et al.*, 1999). Después del clivaje del ADN viral la polimerasa de la célula vegetal sintetizará varias unidades del genoma viral covalentemente (concatémeros) usando como molde la cadena complementaria, una vez sintetizadas los nuevos genomas la proteína Rep la cual tiene actividad endonucleasa/ligasa cliva los concatémeros, generando la liberación de las unidades genómicas, posteriormente liga los extremos del ADN viral, generando moléculas circulares (Jeske, 2009) lo correspondiente a una unidad del genoma viral (monómero). El inicio de la replicación mediante la proteína Rep depende de secuencias contiguas a la estructura tallo asa (elementos en Cis) denominadas iterones los cuales constan de dos repeticiones directas de cuatro nucleótidos y una repetición invertida (Gutiérrez, 1999). El reconocimiento de los iterones por Rep es

considerado virus específico (Argüello-Astorga *et al.*, 1994), Rep sólo inicia la replicación de su ADN específico. Aunque las modificaciones postranscripcionales son comunes en muchos sistemas, Rep aparentemente no necesita ser fosforilada para funcionar (Laufs *et al.*, 1995). La síntesis de las cadenas de DNA viral es un proceso que depende de la proteína Rep del virus y de otras enzimas DNA polimerasas del hospedero y sólo se expresan de forma activa durante la fase S del ciclo celular. Entre las características de Rep, se encuentra la capacidad de inducir la producción del Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (PCNA), el cual se presenta cuando la célula entra en fase S (involucrando síntesis de DNA) (Nagar *et al.*, 1995).

1.2.2.10. Mecanismo de transcripción.

En los Geminivirus, como ya se ha mencionado, la transcripción es bidireccional, con transcritos poli y monocistrónicos, dependiente de factores de la planta, tales como RNA polimerasas y factores transcripcionales. Partiendo de la región común, en general, los transcritos de cada cadena son co-terminales al extremo 3' y heterólogos al extremo 5'. Los promotores de Geminivirus presentan diferencias en cuanto a su fuerza. En general, los genes que se requieren primero en el ciclo de infección tienen promotores más fuertes, en cambio los genes tardíos son más débiles y necesitan del producto de los genes tempranos para expresarse en niveles adecuados, dando una regulación de tipo temporal (Ascencio- Ibáñez *et al.*, 2000).

1.2.2.11. Movimiento viral.

Las proteínas BC1 y BV1 codificadas por el componente B de los Geminivirus bipartitas son requeridas para el movimiento sistémico del virus en la planta (Brough *et al.*, 1988). Se ha sugerido BC1 está involucrada en el movimiento célula-célula

(TGMV) y BV1 está involucrada en el movimiento del DNA viral del núcleo al citoplasma y viceversa, así como en el movimiento del virus a larga distancia. Sin embargo, ha sido demostrado (BDMV) que ambas proteínas son indispensables para que ocurra el movimiento célula-célula (Sudarshana *et al.*, 1998). BC1 se ha localizado entre la pared celular y la membrana plasmática y varias observaciones indican que puede alterar el límite de exclusión de los plasmodesmos (Dickinson *et al.*, 1996).

1.2.2.12. Localización.

Para el caso de los Geminivirus bipartitas, se les ha considerado restringidos al floema, pero en estudios recientes se ha visto que el Virus del Enanismo y Mosaico del Frijol (BDMV), cuando infecta frijol o *Nicotiana benthamiana* no se restringe al floema, al menos en los estadios tempranos de la infección (Wang *et al.*, 1996).

1.2.2.13. Estudios realizados en los Begomovirus de mayor impacto económico.

En 1993, se reporta mediante la clonación y la determinación de la secuencia nucleotídica (parcial) de DNA's asociados a la enfermedad, se encontró un Geminivirus en la zona de las Huastecas (Tamaulipas), no había sido reportado previamente al cual se le denominó virus huasteco del chile (PHV) (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993). Posteriormente, se denominó, el virus huasteco vena amarilla del chile (Pepper huasteco yellow Vein) virus-PHYVV (Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

El Geminivirus identificado virus huasteco del amarillamiento de las venas del chile (PHYVV, Pepper huasteco yellow vein virus), en alusión a la sintomatología producida en plantas de chile y a la región de "Las Huastecas" en donde fue detectado. Además, se confirmó que el "rizado amarillo del chile" era una enfermedad compleja en la que podían estar involucrados hasta 4 Geminivirus diferentes. Entre éstos se podía encontrar al PHYVV ya mencionado y al Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV, Pepper golden mosaic virus). El Virus Huasteco del Chile (PHYVV) ocasiona amarillamientos que inician en la parte distal del pecíolo y se extienden por

toda el área foliar, formando un reticulado fino. Además, las hojas sufren deformaciones dramáticas y enchinamientos, dependiendo de las variantes de las que se trate (Figura 2). (Garzón-Tiznado *et al.*, 1995; Torres-Pacheco *et al.*, 1993; 1996).



Figura 2. Síntomas del PHV en hojas de chile tipo Jalapeño. Aclaramiento de las nervaduras inducido por este virus (Garzón-Tiznado *et al.*, 1995).

Torres-Pacheco *et al.* (1993 y 1996), reportaron al virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV) como el de mayor distribución en las principales áreas productoras de hortalizas en México y en el sur de los Estados Unidos, mientras el PepGMV y el CdTV estaban distribuidos de una manera más restringida. Posteriormente, se realizaron otros estudios en otras áreas del país para confirmar la importancia de PHYVV y PepGMV en las diferentes regiones agrícolas. En la península de Yucatán se realizó un escrutinio para analizar la distribución de Geminivirus, debido a que se reportaban pérdidas de hasta el 95% en cultivos de chile, los resultados obtenidos en este escrutinio fueron positivos para PHYVV y PepGMV (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999; Díaz-Plaza *et al.*, 2002; Díaz-Plaza, 2003). Se han detectado a PHYVV en todas las regiones tomateras de Sinaloa como virus principal en infecciones mixtas. Esto sugiere que PHYVV se ha adaptado a este cultivo y ha ido desplazando o formando complejos con los virus previamente identificados en Sinaloa (Lugo-Melchor *et al.*, 2011).

En el centro de México, específicamente en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí y Jalisco se determinó por métodos moleculares (Southern y PCR) la presencia, distribución y hospederos alternos del virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV),

teniendo la mayor frecuencia en las muestras analizadas con un 70% de reacciones positivas (Garzón-Tiznado *et al.*, 2002).

1.2.3. Mecanismos que generan la diversidad genética de los Geminivirus.

La generación de la diversidad genética en las poblaciones virales proporciona oportunidades para la adaptación a nuevos hospedantes y a las condiciones ambientales cambiantes. Tres fuerzas fundamentales impulsan la evolución de los virus: las mutaciones, la recombinación, y los reordenamientos entre componentes genómicos o pseudorrecombinación (Roossinck, 1997). Estas fuerzas son, en esencia, las mismas que estimulan la evolución. La mutación es el proceso por el que nucleótidos que no se encuentran en la secuencia molde se incorporan, eliminan o sustituyen en la secuencia hija durante la replicación de los ácidos nucleicos. Es importante diferenciar entre tasa de mutación y frecuencia de mutación. La tasa de mutación refleja la fidelidad de copia durante el proceso de replicación, mientras la frecuencia de mutación es la proporción que representa un genoma mutado dentro de la población (Domingo y Holland, 1997). Las tasas de mutación de genomas de ARN oscilan entre 10^{-3} y 10^{-5} sustituciones por nucleótido incorporado y ciclo de replicación (Domingo *et al.*, 2001, 2006; Domingo y Holland, 1994; Malpica *et al.*, 2002), mientras en el caso de la replicación del DNA celular se han estimado valores entre 10^{-8} y 10^{-11} (Echols y Goodman, 1991). Los virus de DNA de cadena sencilla, como es el caso de los Geminivirus, utilizan la maquinaria de replicación del DNA del hospedante (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999), por lo cual sería de esperar la replicación en este grupo de virus se llevará a cabo con una alta fidelidad y tasas de mutación bajas. Sin embargo, los Geminivirus presentan un alto grado de variabilidad en lo que respecta a su secuencia nucleotídica entre aislamientos de una misma población (Stenger, 1995).

La recombinación es el proceso por el cual se intercambian fragmentos de información genética entre cadenas de nucleótidos del genoma de diferentes variantes durante el proceso de replicación. Éste es uno de los mecanismos más importantes de generación de nuevos genomas y de adquisición de ventajas selectivas respecto a los

genomas parentales, permitiendo así mismo contrarrestar mutaciones deletéreas (Nagy y Simon, 1997). Se ha demostrado en los eventos de recombinación en virus pueden resultar en un incremento de su gama de hospedantes (Hu *et al.*, 2003; Monci *et al.*, 2002) o de su virulencia (Rest y Mindell, 2003). El análisis de secuencias de poblaciones de virus de plantas, tanto de ARN como de DNA, pone en evidencia la recombinación puede ser una de las mayores fuentes de variabilidad implicadas en su evolución (Chenault y Melcher, 1994, Padidam *et al.*, 1999; Roossinck, 2005). La recombinación en los virus es análoga a la que ocurre durante la meiosis, y la pseudorrecombinación es semejante al proceso de reordenamiento que ocurre entre los cromosomas durante la reproducción sexual. La diversidad en los genomas virales generada por estas fuerzas es la fuente sobre la cual actúa la selección. En el caso de Geminivirus, debido al gran impacto económico, varios estudios comienzan a demostrar la importancia de la recombinación, las mutaciones y los reordenamientos genómicos en su evolución (Bradeen *et al.*, 1997; Monci *et al.*, 2002). Los Geminivirus emplean a la maquinaria replicativa del DNA del hospedante para la replicación de su genoma, y por tanto se presume una fidelidad alta en la replicación (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000). Sin embargo, los Geminivirus exhiben un grado elevado de variación entre cepas, intra- e interpoblaciones, y poseen una tasa alta de expansión hacia nuevos hospedantes (Gilbertson *et al.*, 1991b; Stenger, 1995). La recombinación contribuye a la diversidad genética de las poblaciones geminivirales (Moffat, 1999; Sanz *et al.*, 2000). La frecuencia en la que ocurre la recombinación entre los virus puede ser impulsada por tres factores: las infecciones mixtas, los niveles altos de replicación, y la gama amplia de hospedantes del insecto vector (Padidam *et al.*, 1999). Primero, las infecciones mixtas son frecuentes entre los Geminivirus, como en el pimiento (*Capsicum annuum* L). (Torres-Paccheco *et al.*, 1996). Segundo, los Geminivirus se replican principalmente a través de un mecanismo de círculo rodante a partir de una forma replicativa de doble cadena que se acumula a altos niveles (Kanevski *et al.*, 1992; Accotto *et al.*, 1993), y por último, en el caso de los Begomovirus, con la emergencia del biotipo B de la mosca blanca, la cual se alimenta de cientos de especies vegetales distintas (Bedford *et al.*, 1994; Brown, 2000), la gama de hospedantes de estos virus se ha expandido considerablemente. Dentro de la

familia Geminiviridae, los miembros bipartitos del género Begomovirus son los susceptibles al intercambio o pseudorrecombinación de sus genomas. La pseudorrecombinación ocurre cuando el DNA A de un Begomovirus dado realiza la multiplicación del DNA B de otra cepa o especie begomoviral. Sin embargo, este proceso está limitado por varios factores, entre ellos la naturaleza altamente específica de la interacción entre la proteína Rep y el sitio origen de la replicación (Fontes *et al.*, 1994), y la incapacidad de los productos génicos codificados por el DNA B para complementar el movimiento del DNA A heterólogo (Unsel *et al.*, 2000a). En ocasiones, el DNA A de una especie multiplique el DNA B de otra, pero no viceversa y este fenómeno se conoce como pseudorrecombinación asimétrica. (Brown *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2002b).

CAPÍTULO 2. Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México.

Hernández-Espinal, L. A., Enríquez-Verdugo, I., Melgoza-Villagómez, C. M., Retes-Manjarrez, J. E., Velarde-Félix, S., Linares-Flores, P. J. y Garzón-Tiznado J. A. 2018. Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 41(2).

2.1. INTRODUCCIÓN

Los virus son responsables de causar graves pérdidas en la producción del cultivo de chile (Lee *et al.*, 2009). Un grupo de estos virus, conocido como Geminivirus se localizan principalmente en zonas tropicales y subtropicales, causando daños económicos y pérdidas de un 20% en la producción. El grupo más ampliamente diversificado y distribuido es el de los Begomovirus con 322 especies reportadas a la fecha, los cuales infectan principalmente plantas dicotiledóneas y son transmitidos por *Bemisia tabaci* Genn. (mosquita blanca) (Fauquet *et al.*, 2003; ICTV, 2018). El genoma de los Begomovirus es generalmente bipartita a excepción del Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (Tomato yellow leaf curl Virus, TYLCV) (Lazarowitz, 1992). Este genoma bipartita está integrado por dos componentes genómicos denominados ADN-A y ADN-B, el tamaño molecular oscila entre 2.7 y 3.0 kb, respectivamente (Yudava *et al.*, 2010). Ambos componentes están organizados en unidades de transcripción divergentes separados por una región intergénica o región común (RI o RC), la cual contiene el origen de la replicación del virus y dos promotores que dirigen la transcripción genética en direcciones opuestas, con excepción de una secuencia de la RI de aproximadamente 200 pb, que se encuentra en ambos ADN virales y es denominada como región común (RC) (Hanley *et al.*, 2000). Los dos componentes a pesar de ser completamente diferentes, presentan una región común (RC) homóloga entre ellas. El ADN-A contiene toda la información que se requiere para la replicación y formación de la cápside del virus, mientras que el componente ADN-B, codifica para las proteínas involucradas en el movimiento viral de célula a célula y en

el rango de hospedantes (Hou *et al.*, 1998). En 1993 en México, se reportó por vez primera un Geminivirus en la zona de las Huastecas (Tamaulipas), el cual se le denominó Virus huasteco del chile (PHV) (Torres-Pacheco *et al.*, 1993). Posteriormente, se modificó el nombre a Virus huasteco vena amarilla del chile, por los síntomas que causa en la hoja de las plantas infectadas (Pepper huasteco yellow Vein, PHYVV) (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Torres-Pacheco y colaboradores (1993 y 1996), reportaron que el PHYVV es el de mayor distribución en las principales zonas productoras de hortalizas en México y en el sur de los Estados Unidos de América, mientras que el Virus del Mosaico Dorado del Chile (Pepper golden mosaic Virus, PepGMV) estaba distribuido de una manera más restringida. En el centro de México, específicamente en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí y Jalisco se detectó por PCR e hibridación tipo Southern, la presencia, distribución y hospedantes alternos del virus huasteco vena amarilla del chile; el cual se identificó en 70% de las muestras analizadas (Garzón-Tiznado *et al.*, 2002). El PepGMV se encuentra distribuido ampliamente en México, por lo que no es raro que se detecte en otras solanáceas como tabaco (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Otras variantes de este virus se han encontrado en Sinaloa, Tamaulipas y Baja California Sur (Holguín-Peña *et al.*, 2003). Uno de los Begomovirus importantes en el cultivo del tomate es el virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate, (TYLCV), reportado en el estado de Sinaloa en el 2005 (Gámez-Jiménez *et al.*, 2006; Orduño-Vega, 2009) y en Sonora en el 2007 (Idris *et al.*, 2007).

Recientemente se ha detectado a PHYVV causando mayores daños en todas las regiones productoras de chile en Sinaloa. Esto sugiere posibles cambios en la virulencia de este virus o mayor asociación con otros virus presentes en Sinaloa (Lugo-Melchor *et al.*, 2011). Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue determinar la distribución, variabilidad genética y asociación entre los Begomovirus que infectan chile, en las principales zonas productoras de Sinaloa, México durante los periodos agrícolas 2013-2016.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó durante los años 2013 a 2016 en las principales zonas productoras del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. Se recolectaron 121 muestras foliares de plantas sintomáticas con características descritas para Begomovirus especialmente, tejido joven obtenido de brotes nuevos de las plantas, dado que en estos se han reportado mayores tasas de multiplicación de los Geminivirus, ya que es donde más células se encuentran en la fase S del ciclo celular (Laufs *et al.*, 1995). Las localidades de colecta fueron georeferenciadas mediante el equipo GPS (Garmin Etrex®) (Cuadro 2). Las muestras fueron recolectadas en bolsas de plástico estériles y transportadas a temperatura ambiente. Posteriormente, éstas se almacenaron hasta su análisis a -20 °C, en el Laboratorio de Patología y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, ubicado en Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa.

Cuadro 2. Localización geográfica de los sitios de muestreo, de tejido foliar de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) con síntomas de Geminivirus en Sinaloa, México, 2013-2016.

Municipio	Localidad	Genotipo	Coordenadas geográficas	
			N	O
Rosario	Cacalotan	Serrano	23° 03'42.6''	105° 50'53.9''
Rosario	Cacalotan	Jalapeño	23° 04'08.0''	105° 50'59.4''
Rosario	Matatan	Serrano	23° 01'57.9''	105° 48'57.9''
Rosario	Rosario	Serrano	22° 59'54.6''	105° 49'15.6''
Rosario	Chametla	Jalapeño	22° 57'50.5''	105° 53'08.8''
Rosario	Chametla	Jalapeño	22° 57'08.5''	105° 56'20.1''
Rosario	Chametla	Ancho	22° 54'10.3''	105° 57'27.2''
Rosario	Chametla	Ancho	22° 53'10.2''	105° 59'25.9''

Rosario	Palmas	Ancho	22° 54' 18.0''	106° 05' 32.4''
Rosario	Palmas	Anaheim	22° 56' 33.9''	106° 07' 31.5''
Mazatlán	La hacienda	Anaheim	22° 59' 58.6''	106° 10' 02.9''
Mazatlán	Francisco Villa	Anaheim	23° 04' 16.2''	106° 14' 46.1''
Mazatlán	El Walamo	Jalapeño	23° 07' 10.0''	106° 15' 39.5''
Rosario	Guasima	Serrano	22° 56' 31.65''	106° 6' 47.08''
Concordia	El Verde	Jalapeño	23° 22' 12.39''	106° 7' 57.99''
Escuinapa	Isla del Bosque	Jalapeño	22° 44' 10.9''	105° 51' 14.5''
Escuinapa	Isla del Bosque	Serrano	22° 44' 09.2''	105° 51' 13.9''
Escuinapa	Isla del Bosque	Ancho	22° 43' 08.5''	105° 50' 35.1''
Escuinapa	Isla del Bosque	Jalapeño	22° 39' 37.9''	105° 48' 15.0''
Escuinapa	IPV**	Jalapeño	22° 35' 38.2''	105° 45' 32.4''
Mazatlán	Villa Unión	Ancho	23° 10' 12.2''	106° 13' 13.5''
Elota	La Cruz	Jalapeño	23° 53' 63.5''	106° 55' 21.3''
Culiacán	Costa Rica	Pimiento	24° 35' 13.39''	107° 26' 25.62''
Culiacán	Higueras de Abuya	Jalapeño	24° 15' 17.39''	107° 3' 52.78''
Guasave	Díaz	Anahei	25° 30' 76.6''	108° 30' 38.9''
Guasave	Díaz	Ancho	25° 30' 84.6''	108° 30' 35.1''
Guasave	Díaz	Jalapeño	25° 31' 17.9''	108° 31' 14.0''
Guasave	Díaz	Jalapeño	25° 31' 25.7''	108° 31' 30.9''
Guasave	CCM*	Jalapeño	25° 35' 27.2''	108° 38' 79.4''
Guasave	CCM*	Jalapeño	25° 35' 26.1''	108° 38' 80.2''
Guasave	Aceituna	Jalapeño	25° 35' 60.8''	108° 39' 30.7''
Guasave	Baturi	Jalapeño	25° 38' 32.6''	108° 46' 04.0''
Guasave	Adolfo Ruiz Cortínez	Jalapeño	25° 41' 04.8''	108° 48' 43.4''
Guasave	Adolfo Ruiz Cortinez	Jalapeño	25° 41' 05.2''	108° 48' 42.9''
Ahome	Los Mochis	Morrón	25° 47' 64.4''	108° 54' 80.0''
Ahome	El Carrizo	Cayenne	26° 14' 44.9''	108° 55' 99.2''

Ahome	Los Mochis	Jalapeño	25° 45' 43.3''	108° 44' 17.1''
Ahome	Los Mochis	Morrón	25° 43' 81.7''	108° 45' 23.8''

*CCM: Campo Cuatro Milpas. **IPV: Isla del palmito del verde

2.2.1. Extracción de ADN.

A partir de tejido foliar joven de plantas sintomáticas del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) se realizó la extracción de ADN genómico con la metodología descrita por Doyle y Doyle (1987) con ligeras modificaciones. Se maceraron de 1 a 2 g de muestra con amortiguador de extracción CTAB (Tris 100 mM, pH 8; NaCl 1.4 M; EDTA 50 mM, pH 8; CTAB 2.5%; PVP 1%; 2-mercaptoetanol 0.2%). Posteriormente, la muestra fue transferida a un tubo y se incubó a 65 °C durante 1 h, se añadió cloroformo: alcohol-isoamílico (29:1 v/v); se agitó y centrifugó a 12000 rpm por 10 min. Se recuperó la fase acuosa, a la que se le adicionó un volumen de isopropanol frío, se mezcló e incubó por 1 h a -20°C. Después se centrifugó, decantó y añadió etanol 70 % (v/v). Los ácidos nucleídos resultantes se resuspendieron en agua desionizada estéril. La integridad del ADN obtenido se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con Gel Red. La concentración y calidad de ADN se determinó con un espectrofotómetro (Lambda Bio 10, Perkin Elmer) a 260nm y promedio de absorbancia a 260/280nm, respectivamente, finalmente, se almacenaron a -20°C.

2.2.2. Amplificación de ADN viral por PCR.

Para la detección del PHYVV, se diseñó el oligonucleótido específico directo HRRF (5'-AAGATAGCTTCTTCGATGG-3') y se empleó el oligonucleótido reverso 241 (5'-GAATTAAAGGTACATGGAC-3') reportado por Torres-Pacheco *et al.* (1996), que amplifican un fragmento del gen Rep y la región intergénica, de 1365 pb; para la detección del PepGMV, se diseñó el oligonucleótido directo GMRRF (5'-CTCCACATCGTTTGAATAGAC-3') y se utilizó el oligonucleótido reverso JM24 (5'-TAGGCCACACCTTGGTCACCAAG-3') reportado por Méndez-Lozano *et al.* (2003),

que amplifican un fragmento del gen Rep y la región intergénica de 1063 pb; TYLCV se detectó con los oligonucleótidos TYC1F 5'-GGGCCTAGAGACCTGGCCCCAC-3' y TYC1R 5'-CCG GTAATATTATACGGATGGC-3', los cuales amplifican un fragmento del gen Rep y la región intergénica, de 856 pb (Lapidot, 2002). El volumen de reacción final fue de 25 µL, conteniendo Buffer Taq ADN polimerasa 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTPs, oligonucleótidos 0.25 µM, Taq ADN polimerasa 1.0 U, ADN 120 ng. Las condiciones de amplificación (termociclador C1000TM Thermal Cycler BIO-RAD) fueron las siguientes: 94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 45 s, 58 °C 30 s y 72 °C 1 min) y una extensión final de 72 °C por 10 min. Finalmente, para la amplificación de especies de Begomovirus se utilizaron los iniciadores universales MotCP2118 (5'-CC GAA TTC GAC TGG ACCTTA CAT GGN CCT TCA C-3') y MotCP2123 (5'GAG TCT AGA GGS TAN GTG/AAG/G AAA TAA/G TTC TTG GC3') que amplifican un fragmento de 650 pb del componente A de Geminivirus, y que incluye la región común y parte del gen de la proteína de la cápside (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2002). La mezcla de reacción final para la PCR fue en un volumen de 25 µL que contenía 120 ng del ADN molde, Buffer Taq ADN polimerasa 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTPs, oligonucleótidos 0.25 µM, Taq ADN polimerasa 1.0 U). Las condiciones de amplificación (termociclador C1000TM Thermal Cycler BIO-RAD), fueron: Precaentamiento por 5 min a 94 °C seguida de 32 ciclos a tres temperaturas (desnaturalización a 94 °C por 30 s, el alineamiento a 60 °C por 30 s y la extensión a 72 °C por 1 min), por último una extensión por 10 min a 72 °C. Como testigo negativo se utilizó ADN de plantas de Chile asintomáticas y crecidas en jaulas entomológicas libres de mosca blanca; como testigo positivo se utilizó ADN amplificado de planta de Chile sintomática, confirmada por secuenciación y comparada con lo reportado en el GenBank. Los productos de PCR (10 µL) fueron separados y analizados por electroforesis en agarosa al 1.5%.

2.2.3. Secuenciación y análisis.

Los fragmentos se purificaron (UltraClean 15ADN Purif MO BIO LAB) y fueron enviados para su secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN (USSADN) del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El análisis *in silico* de las secuencias nucleotídicas obtenidas se realizó mediante comparaciones con las secuencias disponibles en la base de datos del NCBI, (National Center for Biotechnology Information), utilizando el programa BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool) y el análisis de filogenia se realizó mediante el método Clustal W de MegAling. El árbol filogenético se construyó por el método del vecino más cercano, y se realizó un análisis de robustez del árbol filogenético mediante la obtención del coeficiente de confianza de Felsenstein para cada agrupamiento, en el cual se realizaron 1000 réplicas de muestras aleatorias con remplazo o “bootstrap” (Felsenstein, 1985). Los análisis se realizaron con el programa “MEGA6” (versión 6.0) (Tamura *et al.*, 2013).

2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.3.1. Detección de Geminivirus.

Se analizaron 121 muestras de ADN extraído de plantas de chile (*C. annuum* L.) con síntomas característicos de una infección originada por Geminivirus; las muestras fueron colectadas en 38 sitios del estado de Sinaloa, representando más del 81.66 % promedio de la superficie establecida del cultivo del chile, durante los ciclos 2013-2016. En todas las muestras de ADN se detectaron Begomovirus bipartitas: Virus huasteco vena amarilla del chile, Virus del mosaico dorado del chile, y otro Begomovirus no identificado, en los municipios de Escuinapa, Rosario, Concordia, Mazatlán, Elota, Culiacán, Guasave y Ahome, así mismo se identificó al Begomovirus monopartita, Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate, en los municipios de Rosario, Culiacán y Ahome (Figura 3) (Cuadro 3).

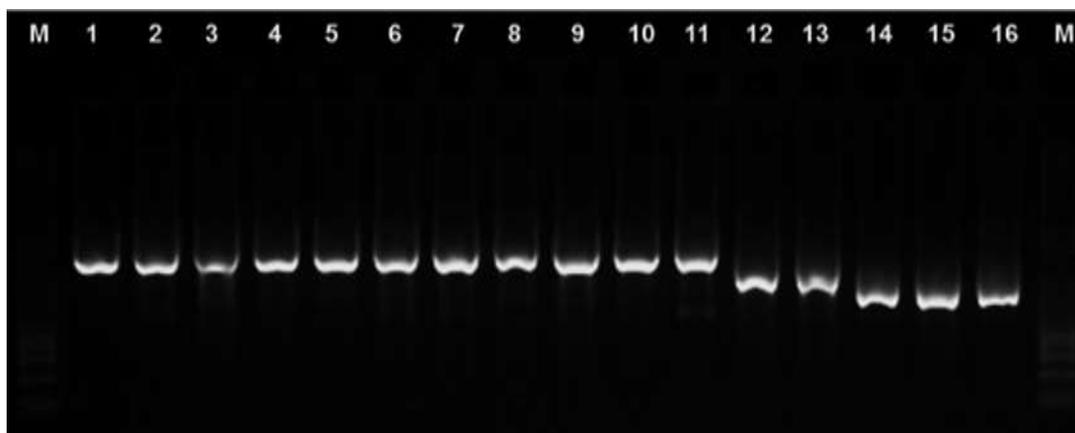


Figura 3. Detección de Begomovirus (PHYVV, PepGMV y TYLCV) en plantas de chile, mediante PCR en gel de agarosa al 1.5%. M= marcador de peso molecular 1kb ADN (GIBCO BRL); muestras del 1 al 11, PHYVV (1365pb); muestras 12 y 13, PepGMV (1063pb) y muestras del 14 al 16, TYLCV (856pb); M= marcador de peso molecular 1kb ADN (GIBCO BRL).

Cuadro 3. Detección de Geminivirus (PHVVY, PepGMV, TYLCV y otro Begomovirus) en plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) sintomáticas, mediante PCR.

Muestra con síntomas de Geminivirus	Frecuencia de Geminivirus (%)			
	PHVVY	PepGMV	TYLCV	Otro Begomovirus
121	90* (74.4**)	65 (53.7)	7 (5.8)	15 (12.4)

* Número de muestras. **Frecuencia de Virus en porcentaje.

2.3.1.1. Detección de Begomovirus bipartitas.

Los Virus PHYVV y PepGMV, se detectaron en los genotipos serrano, jalapeño, ancho (poblano), anaheim, morrón y cayenne. De las 121 muestras analizadas, el 74.4% amplificaron con iniciadores específicos para el PHYVV, lo que representó la presencia del Geminivirus con mayor frecuencia en el estado y se confirman los resultados previamente descritos por Garzón-Tiznado *et al.* (2002). PHYVV se ha reportado desde 1993 en México (Torres-Pacheco *et al.*, 1993) y en la actualidad se encuentra distribuido ampliamente en diferentes estados del país (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Guevara *et al.*, 1999). Un segundo Geminivirus amplificó en el 53.7% de las 121 muestras analizadas descrito como PepGMV, este Begomovirus fue detectado por primera vez en 1987 en Texas y nombrado como Texas pepper Geminivirus-TPGV (Stenger *et al.*, 1990), se encuentra entre los Begomovirus de mayor distribución en México, por lo que no es raro que se detecte en la mayoría de las enfermedades inducidas por estos patógenos en el país (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Holguín-Peña *et al.*, 2004). De las muestras positivas para PHYVV y PepGMV, el 31.4% (38 muestras) y 12.4% (15 muestras) respectivamente, fueron infecciones simples. El 36.4% de las muestras analizadas, presentaron infecciones mixtas, con la combinación de PHYVV y PepGMV (Figura 4). En México la infección mixta producida por los Virus PHYVV y PepGMV se ha reportado en varios cultivos agrícolas y ambos Virus se

encuentran distribuidos en la mayor parte del país (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Méndez-Lozano *et al.*, 2001, 2003). Esta infección mixta es importante, puesto que los síntomas que se producen son más severos, fenómeno que se conoce como sinergismo. El fenómeno de sinergismo podría ser una fuente potencial de variabilidad de Begomovirus facilitando eventos de recombinación (García *et al.*, 2007). Debido a su importancia se han realizado estudios más detallados para entender los aspectos básicos de sinergismo entre PHYVV y PepGMV, los cuales producen serios daños a los cultivos de chile cuando se encuentran infectando juntos una misma planta (Méndez-Lozano *et al.*, 2003; Rentería-Canett *et al.*, 2011).

2.3.1.2. Detección de Begomovirus monopartitas.

El Virus TYLCV es común en infecciones virales de tomate. Sin embargo, se identificó en el 5.8% de un total de 121 muestras analizadas en diferentes genotipos del cultivo de chile como el serrano, jalapeño, morrón y ancho (poblano) en los municipios del Rosario, Culiacán y Ahome lo cual indica un amplio rango de hospedantes, aunque la incidencia de este Begomovirus, fue baja comparada con el PHYVV (74.4%) y PepGMV (53.7%), de manera tal que, en estos momentos, se le considera con riesgo potencial para el cultivo de chile en el estado de Sinaloa, lo cual no coincide con lo descrito por otros autores, que han reportado a *C. annuum* como un hospedante alternativo de Tomato yellow leaf curl (Morilla *et al.*, 2005; Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010 y Orduño-Vega, 2009). El TYLCV, descrito originalmente en plantas de tomate (*Solanum lycopersicon* L.), se reportó entre 1930 y 1940 en Israel, donde se describió por primera vez (Varma y Malathi, 2003). En México, fue detectado por primera vez en Yucatán en 1996 (Asencio-Ibáñez *et al.*, 1999), y en Sinaloa, fue observado en 2005 (Gámez-Jiménez *et al.*, 2006). En nuestro estudio, este Begomovirus se detectó solamente en infecciones mixtas (5.8%) con el PHYVV y PepGMV (Figura 4). Un comportamiento similar fue descrito por Cárdenas-Conejo y colaboradores (2010), quienes reportaron en el cultivo del chile una infección mixta entre un Begomovirus monopartita (TYLCV) y un bipartita, Virus Chino del tomate de La Paz (ToChLPV). En el cultivo del tomate se han reportado infecciones mixtas, siendo comunes en regiones tropicales y

subtropicales (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Chowda *et al.*, 2005; Lugo-Melchor *et al.*, 2011); este complejo de Virus en infecciones mixtas se han descrito en maleza y cultivos de interés económico, de un alto riesgo en la aparición de nuevas cepas y variantes de Begomovirus por la posible recombinación entre estos, lo que puede dar origen a cambios a nivel de nucleótidos en genes clave que pudieran producir la aparición de nuevos síntomas cada vez más severos e inclusive ampliar su rango de hospedantes naturales (Brown *et al.*, 2000).

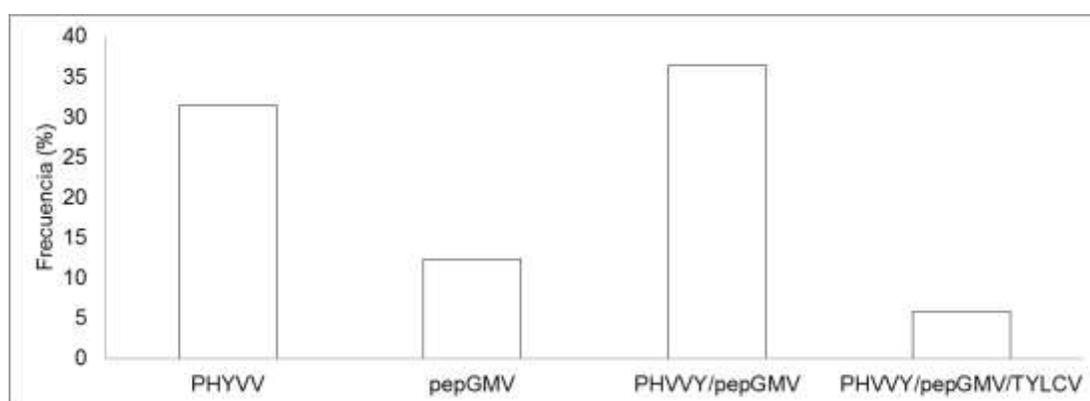


Figura 4. Frecuencia de infecciones simples y mixtas causadas por Geminivirus, en base al total de muestras colectadas en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México.

2.3.2. Secuenciación y análisis genético.

Las secuencias nucleotídicas y su comparación en la base de datos del GenBank (NCBI), confirmaron la identidad de los tres Geminivirus detectados en campo: Virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV) (Cuadro 4); Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate TYLCV), así como su distribución en los sitios de muestreo en los ocho principales municipios donde se cultiva chile en Sinaloa (Escuinapa, Rosario, Concordia, Mazatlán, Elota, Culiacán, Guasave y Ahome) (Figura 5).

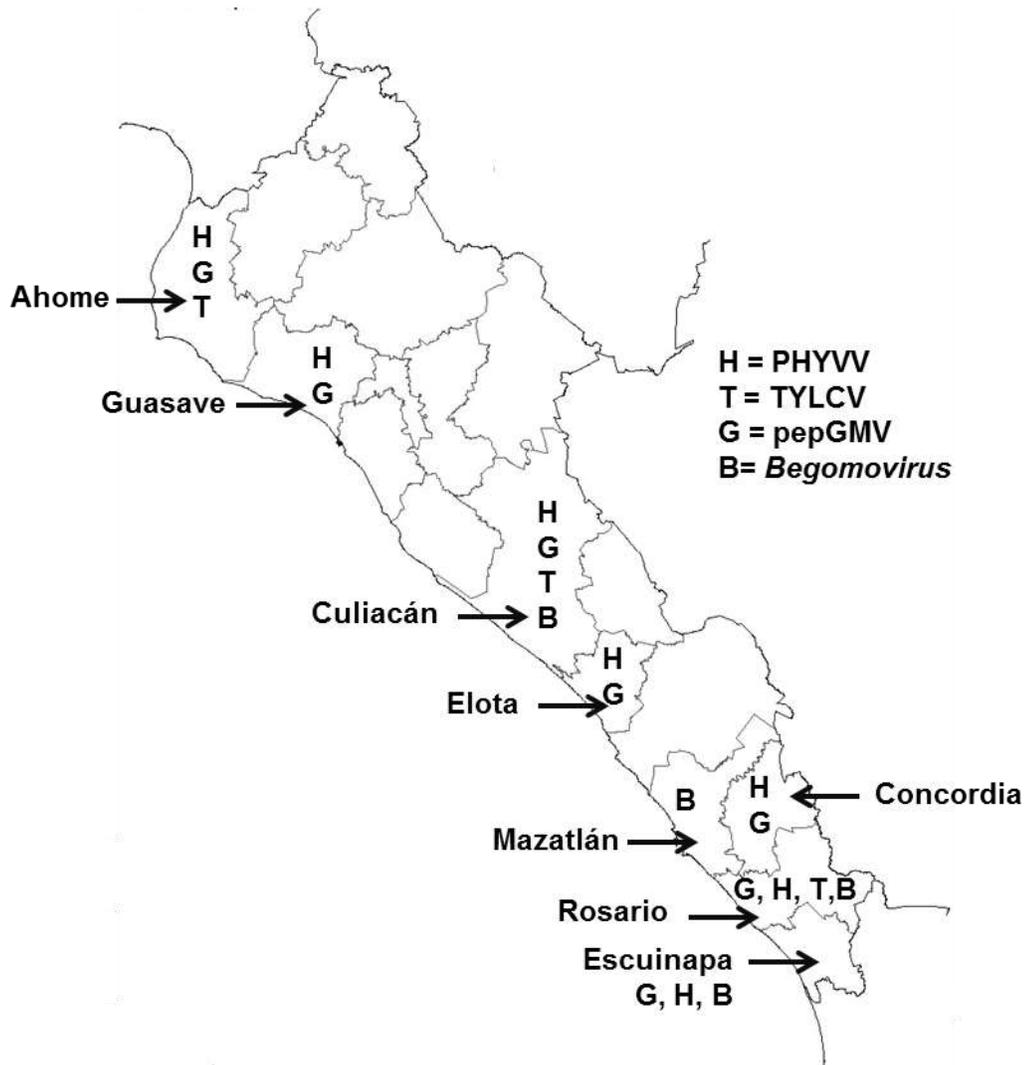


Figura 5. Distribución de Begomovirus en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.), en Sinaloa, México. Begomovirus detectados por la PCR en el cultivo del chile: PHYVV (H), PepGMV (G), TYLCV (T), otro Begomovirus (B).

2.3.3. Análisis genético y secuenciación.

Se seleccionaron y secuenciaron 15 muestras que amplificaron el gen de la replicasa (Rep) y región común (RC) para PHYVV, PepGMV o región intergénica (RI) para virus monopartita como el TYLCV: 12, dos y una muestras respectivamente; éstas fueron

comparadas mediante BLAST para determinar el porcentaje de identidad entre estas y accesiones de Begomovirus reportadas en el GenBank del NCBI.

Las secuencias que corresponden a PHYVV, fueron registradas en la base de datos del GenBank, con el número de accesión: KY366177, KY006848, KY499895, KY499897, KY006849, KY366176, KY288518, KY288517, KY366179, KY366180, KY499896 y KY366178, estas secuencias, se compararon con dos accesiones de Sinaloa registradas previamente en la base de datos del GenBank. La accesión AYO44162.1 descrita para Sinaloa (Hou *et al.*, 1996), presentó una identidad del 95.25% con las accesiones obtenidas en este estudio; al comparar estas, con la accesión LN848878.1, también descrita para Sinaloa (Rodelo-Urrego *et al.*, 2015), se observó una identidad promedio del 96.75%, similar con el porcentaje promedio obtenido con la accesión AYO44162.1. Por otro lado, al comparar los aislados del presente estudio con la primera secuencia reportada del PHYVV en México con número de accesión X70418.1 (Torres-Pacheco *et al.*, 1993) se registra el valor menor de identidad promedio con 94.91%. A diferencia de la secuencia reportada por Hou *et al* en el 1996 (AYO44162.1) que fue la que presentó mayor similitud con la secuencia reportada por Torres-Pacheco *et al* en el 1993 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Porcentaje de identidad con base en las secuencias nucleotídicas de PHYVV detectadas en campos agrícolas del estado de Sinaloa, México, con lo reportado en la base de datos GenBank. Comparación con base en el gen de la proteína de la replicación (Rep) y región intergénica (RI).

Aislados*	No. de Acceso GenBank**	Genotipo	Identidad %		
			No. de Acceso GenBank+		
			X70418.1	AYO44162.1	LN848878.1
GESCB42HUAS	KY366177	Jalapeño	94	95	98
GROSA7HUAS	KY006848	Serrano	95	95	97
GROSA9HUAS	KY499895	Jalapeño	94	95	98
GROSB56HUAS	KY499897	Jalapeño	94	94	97
GCONA21HUAS	KY288518	Jalapeño	94	95	98
GELOC17HUAS	KY288517	Jalapeño	95	95	98
GCULA14HUAS	KY006849	Morrón	97	98	96

GCULA24HUAS	KY366176	Morrón	94	94	98
GGUASD19HUAS	KY366179	Jalapeño	95	95	99
GGUASD24HUAS	KY366180	Jalapeño	96	96	94
GGUASD27HUAS	KY499896	Jalapeño	95	95	94
GAHOD44HUAS	KY366178	Jalapeño	96	96	94
promedio	-	-	94.91	95.25	96.75

*G=Geminivirus; Municipio (CON=Concordia, CUL=Culiacán, ROS=Rosario, ESC=Escuinapa, ELO= Elota, GUAS=Guasave, AHO=Ahome); muestreo (A, B, C, D); número de muestra; Virus (H=PHYVV); UAS=Universidad Autónoma de Sinaloa. **Número de accesión en el GenBank de secuencias de Begomovirus obtenidas en este trabajo de investigación. *Número de accesión de secuencias reportadas en el GenBank (Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Hou *et al.*, 1996; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015).

En lo que corresponde a PepGMV y TYLCV, los accesados en este estudio como KY006850 y KY006851, tuvieron una identidad del 99% con la accesión LN848784 del PepGMV (Rodelo-Urrego *et al.*, 2015) y la secuencia del aislamiento KY006852, presento una identidad del 99% con la accesión del TYLCV, descrita como DQ631892 en el GenBank (Brown e Idris, 2006).

En general, los resultados mostraron una alta similaridad entre las secuencias de los aislados de este estudio y los aislados de PHYVV, PepGMV y TYLCV previamente reportados (Torres-Pacheco *et al.*, 1993; Hou *et al.*, 1996; Brown e Idris, 2006; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015). Al considerar los criterios establecidos por el Comité Internacional Taxonómico de Virus (ICTV, 2018), se propone que los aislados corresponden a las especies reportadas para PHYVV, PepGMV y TYLCV en el cultivo del chile en Sinaloa.

2.3.4. Análisis filogenético.

Se analizaron secuencias del Virus PHYVV aislado de muestras del cultivo de chile procedentes de Sinaloa, México, comparadas con otras secuencias registradas en el GenBank. El análisis filogenético se realizó a partir de secuencias parciales del gen de la replicasa (Rep) y región común (RC) en un total de 1268 nt, que corresponden a

secuencias del PHYVV obtenidas en el presente estudio, las cuales fueron comparadas con la primera secuencia reportada de PHYVV en México por Torres-Pacheco *et al.* (1993), con número de accesoión X70418.1 y dos secuencias del estado de Sinaloa, con números de accesoión AY044162.1 registrada en el año 1996 (Hou *et al.*, 1996) y LN848878.1 en el año 2015 (Rodelo-Urrego *et al.*, 2015). El árbol filogenético construido por el método del vecino más cercano con re muestreo para 1000 réplicas, separó a las secuencias en dos grupos principales. El grupo inferior principal se separó en dos subgrupos (C y D), en el subgrupo C se asociaron el primer aislado proveniente de Tamaulipas con registro X70418.1 del año 1993, con la accesoión AY044162.1 registrada para Sinaloa en el año 1996 y un aislado del centro (KY006849, con identidad del 97 y 98%, respectivamente), en el subgrupo D, se asociaron tres aislados del norte del estado de Sinaloa, (KY366180, KY499896 y KY366178, con una identidad del 95 al 96%). El grupo superior principal se separó en dos subgrupos (A y B), en el subgrupo A, se asociaron con la accesoión LN848878.1 registrada para Sinaloa en el año 2015, las secuencias del sur (KY499897, KY288518, KY366177, KY499895 con identidad del 97 al 98%), centro (KY366176, con identidad de 98%) y norte (KY366179, con identidad del 99%) del estado de Sinaloa, en el subgrupo B, se asociaron dos aislados del sur de Sinaloa (KY006848, KY288517, con identidad de 97 y 98%, respectivamente) (Figura 6), por lo anterior, se considera que el PHYVV posiblemente se introdujo a Sinaloa por el municipio de Culiacán durante el año agrícola 1994, en plántulas de tabaco infectadas de Begomovirus, enviadas desde invernaderos localizados en Tepic, Nayarit, lo que ocasiono una amplia distribución del Virus en Sinaloa, ya que es uno de los principales productores de hortalizas en México, posteriormente se prohibió la siembra de este cultivo por ser hospedero de mosca blanca y portador del PHV (PHYVV) (Comunicación personal Dr. Garzón Tiznado José Antonio). Torres-Pacheco *et al.* (1996), reporta que PHYVV no se identificó en muestras de chile colectadas y analizadas antes de abril de 1990 en Sinaloa. En este estudio se determinó, que PHYVV es el Begomovirus predominante en el cultivo de chile con 74.4% de infección en plantas analizadas y con un 36.4 y 5.8% de infecciones mixtas con PepGMV y TYLCV, respectivamente. Este tipo de interacciones sugiere una fuente potencial de variabilidad en Begomovirus, facilitando eventos de

recombinación como se ha reportado anteriormente (Méndez-Lozano *et al.*, 2003). La presencia de varios genomas virales y ciclos cortos de replicación en cada célula vegetal infectada favorecen la presencia de mutaciones que implica ganancia o pérdida de función, lo que finalmente conlleva a la adaptación de las especies o evolución (Stange, 2006).

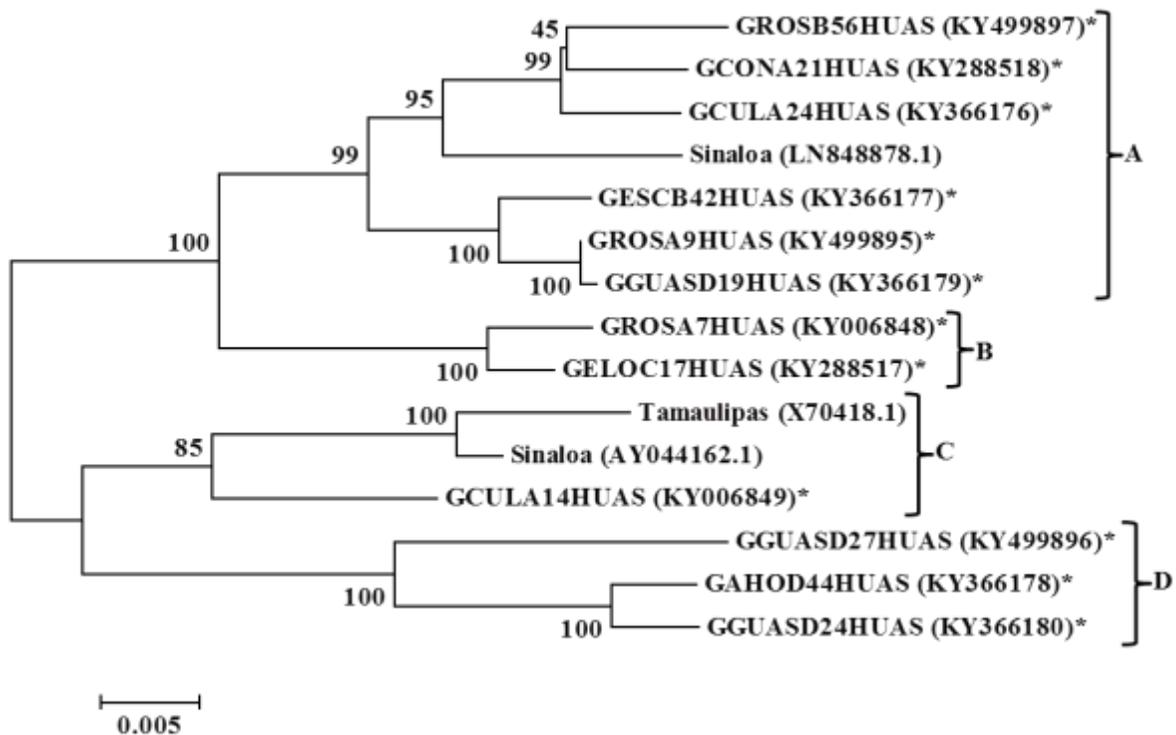


Figura 6. Análisis filogenético basado en secuencias parciales del gen de la replicasa (Rep), región común (RC) y región intergénica (RI) del Virus PHYVV, aislados de muestras de Sinaloa, México. El árbol filogenético se construyó con el algoritmo de Neighbor-Joining a partir de distancias calculadas entre 15 secuencias nucleotídicas analizando un total de 1268 posiciones con el método de Tajima-Nei (1984) y un índice de Felsenstein de 1000 réplicas. *Aislados de Begomovirus en este estudio.

CAPÍTULO 3. Variantes de Begomovirus que infectan al cultivo del chile en Sinaloa

Hernández-Espinal, L. A., Enríquez-Verdugo, I., Melgoza-Villagómez, C. M., Retes-Manjarrez, J. E., Velarde-Félix, S. y Garzón-Tiznado J. A. 2018. Variantes de Begomovirus que infectan al cultivo del chile en Sinaloa. *Biociencias* (En proceso).

3.1. INTRODUCCIÓN

Los Geminivirus constituyen la familia más grande, diversa y económicamente importante de los virus de ADN de plantas (Rojas *et al.*, 2005). Los síntomas más comunes causados por los virus incluyen enanismo, mosaicos, moteados, necrosis, clorosis, deformaciones, etc. La familia Geminiviridae se clasifica en nueve géneros definidos con base en el vector que los transmite, el hospedero que infecta y estructura genómica (Mastresvirus, Becurtovirus, Curtovirus, Topocovirus, Turncurtovirus, Eragrovirus, Capulavirus, Grablovirus y Begomovirus) (Fauquet *et al.*, 2003; ICTV, 2018). Dentro del grupo más ampliamente diversificado y distribuido se encuentran los Begomovirus con 322 especies reportadas a la fecha, que infectan principalmente plantas dicotiledóneas y son transmitidos por la mosquita blanca. El genoma de los Begomovirus es generalmente bipartito a excepción del virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV) (Lazarowitz, 1992). Los componentes genómicos son denominados como ADN-A y ADN-B con tamaño molecular que oscila entre 2.7 y 3.0 kb, respectivamente (Yadava *et al.*, 2010). Ambos están organizados en unidades de transcripción divergentes separados por una región intergénica (RI), la cual contiene el origen de la replicación del virus y dos promotores que dirigen la transcripción genética en direcciones opuestas, con excepción de una secuencia de la RI de aproximadamente 200 pb, que se encuentra en ambos ADN virales y es denominada como región común (RC) (Hanley *et al.*, 2000). El ADN-A contiene toda la información que se requiere para la replicación y formación de la cápside del virus, mientras que el componente B, codifica para las proteínas involucradas en el

movimiento viral de célula a célula, en el rango de hospederos y en el desarrollo de los síntomas en la planta (Hou *et al.*, 1998). Los Begomovirus se han diseminado rápidamente por el planeta debido, fundamentalmente, a la propagación de su vector, la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) (Anaya-López *et al.*, 2003). Por otro lado, la variabilidad genética de los virus de plantas permite mutaciones de ganancia o pérdida de función, lo cual implica la adaptación de las especies o evolución. Esta condición se favorece con la presencia de varios genomas virales y ciclos cortos de replicación en cada célula vegetal infectada. Además de las mutaciones, en los virus existe variación genética debida a recombinaciones y a la adquisición de genomas adicionales (Stange, 2006).

Una alternativa eficaz y rápida para estudios de diversidad biológica de Geminivirus, que es utilizada en diferentes regiones del mundo es la amplificación por círculo rodante (RCA, del inglés Rolling Circle Amplification). El método emplea la ADN polimerasa del bacteriófago ϕ 29 y cebadores al azar para la amplificación de moléculas de ADN circulares. Esta tecnología permite amplificar moléculas de ADN circulares y de cadena simple, sin tener en consideración sus posibles variaciones de secuencia. Además la ADN polimerasa ϕ 29 posee una alta fidelidad de copia y la cantidad de ADN de molde necesaria para la amplificación es baja (Inoue-Nagata *et al.*, 2004; Quiñones-Pantoja *et al.*, 2014). El objetivo del presente estudio es determinar variantes de Begomovirus que infectan al cultivo del chile en Sinaloa.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó durante los años 2013 a 2014 en un cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Culiacán, Sinaloa, México. El área de estudio se ubica en las coordenadas geográficas 24° 35' 13.39'' N 107° 26' 25.62'' O, georreferenciada con equipo GPS (Garmin Etrex®). Se colectaron 25 muestras foliares de plantas sintomáticas con características descritas para Begomovirus. Además, se consideró como criterio de selección a muestras de tejido joven obtenido de brotes nuevos de plantas, ya que se ha reportado que en brotes nuevos se tiene una mayor tasa de multiplicación de los Geminivirus, debido a que mayor número de células se encuentran en la fase S del ciclo celular (Laufs *et al.*, 1995). Las muestras fueron colectadas en bolsas de plástico estériles y transportadas a temperatura ambiente. Posteriormente, se almacenaron hasta su análisis molecular a -20 °C, en el Laboratorio de Patología y Biología Celular y Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, ubicado en Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa.

3.2.1. Extracción de ADN.

A partir de tejido foliar joven de plantas sintomáticas del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) se realizó la extracción de ADN genómico con la metodología descrita por Doyle y Doyle (1987) con ligeras modificaciones. Se maceraron de 1 a 2 g de muestra con amortiguador de extracción CTAB (Tris 100 mM, pH 8; NaCl 1.4 M; EDTA 50 mM, pH 8; CTAB 2.5%; PVP 1%; 2-mercaptoetanol 0.2%). El macerado se transfirió a un tubo Eppendorf y se incubó a 65 °C durante 1 h, se añadió cloroformo: alcohol-isoamílico (29:1 v/v); se agitó y centrifugó a 12000 rpm por 10 min. Se recuperó la fase acuosa, a la que se le adicionó un volumen de isopropanol frío, se mezcló e incubó por 1 h a -20 °C. Después se centrifugó, decantó y añadió etanol 70 % (v/v). Los ácidos nucleicos resultantes se resuspendieron en agua desionizada estéril. Se confirmó la

presencia de material genético mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñidos con Gel Red (incluir casa comercial) y visualizado en un transiluminador de luz UV (Bio-Rad). La concentración y calidad de ADN se determinó con un espectrofotómetro (Lambda Bio 10, Perkin Elmer) a 260 nm y promedio de absorbancia a 260/280 nm, respectivamente, finalmente se almacenaron a -20 °C.

3.2.2. Amplificación de ADN viral por PCR.

Para la detección de Begomovirus, se utilizaron los iniciadores universales MotCP2118 (5'-CC GAA TTC GAC TGG ACCTTA CAT GGN CCT TCA C-3') y MotCP2123 (5'GAG TCT AGA GGS TAN GTG/AAG/G AAA TAA/G TTC TTG GC3') que amplifican un fragmento de 650 pb del componente A de Geminivirus, y que incluye la región común y parte del gen de la proteína de la cápside (Ascencio *et al.*, 2002). La mezcla de reacción final para PCR en un volumen de 25 µL, consistió (120 ng del ADN molde, Buffer *Taq* ADN polimerasa 1X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTPs, oligonucleótidos 0.25 µM, *Taq* ADN polimerasa 1.0 U). Condiciones de amplificación (termociclador C1000TM Thermal Cycler BIO-RAD): precalentamiento de 5 min a 94 °C seguida de 32 ciclos a tres temperaturas: La desnaturalización a 94 °C por 30 s, el alineamiento a 60 °C por 30 s y la extensión a 72 °C por 1 min; por último 10 min a 72 °C. Como testigo negativo se utilizó ADN de plantas de Chile asintomáticas y crecidas en jaulas entomológicas libres de mosca blanca; como testigo positivo ADN amplificado de planta de Chile sintomática, confirmada por secuenciación y comparada con lo reportado en el GenBank. Los productos de PCR (10 µL) fueron separados y analizados por electroforesis en geles de agarosa.

3.2.3. Amplificación por círculo rodante.

Las muestras de ADN que resultaron positivas a Begomovirus, se amplificaron mediante círculo rodante (Rolling Circle Amplification, RCA) con la polimerasa del bacteriófago ϕ29 (TempliPhi GE Healthcare) y los cebadores al azar para la

amplificación de moléculas de ADN circulares. Se utilizó el Kit comercial: TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kit (Amersham Biosciences, USA), siguiendo las instrucciones por la casa comercial. Como control positivo se utilizó una planta de pimiento infectada por el PHYVV, mientras que el control negativo correspondió a plantas de pimiento sanas. Los productos de la ACR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con Gel Red.

3.2.4. Análisis de restricción de los componentes genómicos virales.

Los productos de ACR se analizaron por restricción con las enzimas BamHI, EcoRI, HindIII, PstI, HpaI para determinar una enzima de sitio de corte único en cada componente viral y linealizar el genoma del Begomovirus. Los productos de la digestión se analizaron en geles de agarosa al 0.8%.

3.2.5. Clonación e hibridación de los componentes.

El ADN viral linealizado se ligó al vector pJET2.1, siguiendo las especificaciones del proveedor. Los plásmidos recombinantes se utilizaron para transformar por choque térmico, las células químicamente competentes Top 10 F' de E. coli. de acuerdo al protocolo de Maniatis (Sambrook *et al.*, 2001). Las células transformadas se cultivaron en cajas Petri con medio sólido LB-Ampicilina (50 µg/mL), se incubaron a 37 °C por 18 h. La extracción de ADN plasmídico se realizó mediante el protocolo descrito por Birnboim y Doly (1979). La digestión de las clonas transformadas se analizó por sus patrones de restricción en geles de agarosa al 1%, con la enzima Bgl II siguiendo las especificaciones del proveedor. Se transfirió por capilaridad a una membrana Hybond N+ toda la noche usando SSC 20X como tampón de transferencia (Fiallo-Olivé *et al.*, 2009). La hibridación se realizó por un método no radiactivo, utilizando para el marcaje y la detección de los productos, el kit Biotin-11-dUTP (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la hibridación se emplearon como sondas los genes av1 y bc1/bv1 de Pepper golden mosaic virus, un Begomovirus

bipartito. Las sondas se obtuvieron a partir del genoma clonado, proporcionado por el Dr. Rafael Rivera Bustamante, del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato, México.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Detección de Geminivirus.

Se analizaron 25 muestras de ADN extraído de plantas de chile (*C. annuum* L.) con síntomas característicos de una infección originada por Geminivirus; las muestras fueron colectadas en Culiacán, Sinaloa, del cultivo de chile, durante el ciclo 2013-2014, resultando el total de las muestras de ADN positivas para Begomovirus.

3.3.2. ACR y clonación de Begomovirus.

Los ACR de las muestras del cultivo de chile con síntomas de Begomovirus, se analizaron en gel de agarosa al 0.8%, resultando una banda de alto peso molecular mayor de 20.000kb (Figura 7). Estos resultados coinciden con lo reportado en diferentes estudios realizados para identificar variantes de Begomovirus (Quiñones *et al.*, 2014; Fernández *et al.*, 2009).

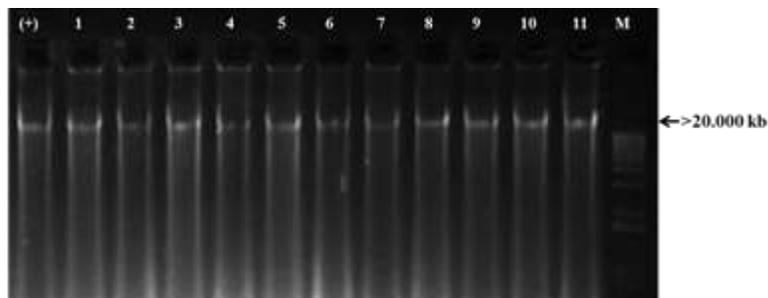


Figura 7. ADN de genomas amplificado por ACR de muestras del cultivo de chile con síntomas de Begomovirus. (+): Control positivo. Carriles 1-11: muestras con síntomas de Begomovirus. M: Marcador de peso Molecular 1 Kb.

3.3.2.1. Restricción de los componentes de Begomovirus.

Los componentes genómicos circulares amplificados por ACR, se digirieron con las enzimas de restricción BamHI, EcoRI, HindIII, PstI, HpaII. Las enzimas BamHI (Fig. 8A), EcoRI (Fig. 8B) y HindIII (Fig. 8D) cortan en un sitio único de corte en los ADN circulares, resultando un fragmento lineal de 2.6-3.0 Kb aproximadamente, lo cual permitió la clonación del genoma completo de los Begomovirus (Fiallo-Olivé *et al.*, 2009; Quiñones *et al.*, 2014). Los productos obtenidos se analizaron en gels de agarosa al 0.8% (Figura 8).

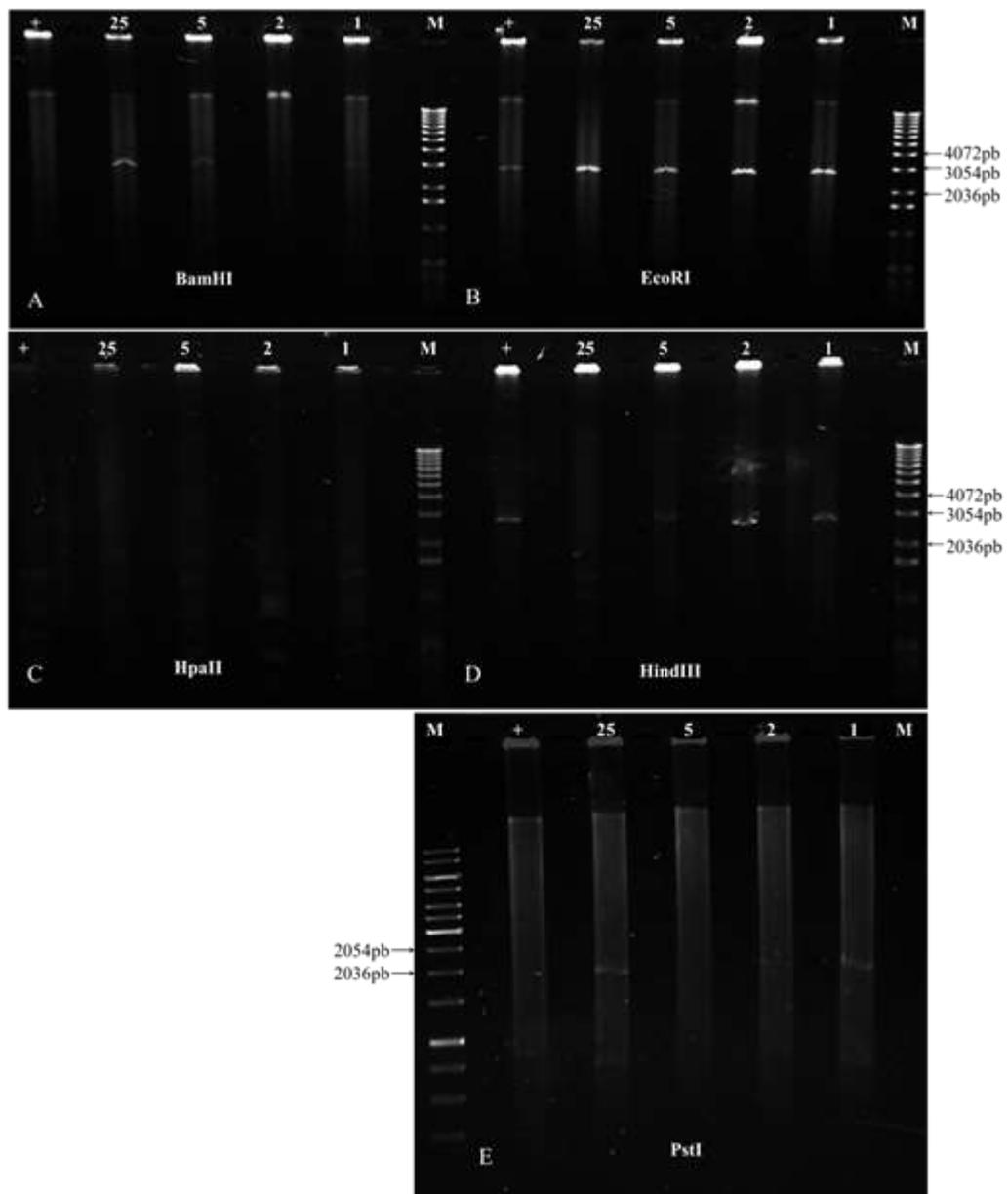


Figura 8. Amplicones de ACR digeridos con enzimas de restricción. A. ADN genómicos circulares digeridos con BamHI; B. ADN genómicos circulares digeridos con EcoRI; C. ADN genómicos circulares digeridos con HpaII; D. ADN genómicos circulares digeridos con HindIII; E. ADN genómicos circulares digeridos con PstI. Carriles M: Marcador de peso molecular 1 Kb.

En el resultado de la digestión enzimática con las enzimas BamHI (Fig. 8A), EcoRI (Fig. 8B) y HindIII (Fig. 8D), se observa un sitio único de corte de 2.6-3.0 Kb aproximadamente, sin embargo, se continúa observado una banda de alto peso molecular sin digerir. La cual, se relaciona con la presencia de otra especie de Begomovirus u otro componente de la misma especie que no ha sido digerido con estas enzimas de restricción como se han reportado en otros estudios (Fernandez *et al.*, 2009; Quiñones *et al.*, 2014).

Respecto a las enzimas de restricción HpaII (Fig. 8C) y PstI (Fig. 8E) se originaron fragmentos menores a lo esperado (2.6-3.0 kb) o bien, con más de un sitio de corte, obteniendo componentes genómicos incompletos. Los fragmentos de menor tamaño obtenidos con estas enzimas pudieran estar relacionados con la presencia de más de un sitio de corte en los genomas presentes o a la presencia de ADNs satélites asociados frecuentemente a las infecciones por Begomovirus (Khan *et al.*, 2008).

3.3.2.2. Clonación e hibridación de componentes virales.

La amplificación por círculo rodante permitió la clonación de los genomas virales íntegros a partir de pequeñas cantidades de ADN de muestras de planta con síntomas de Begomovirus, siendo similar a lo reportado por Haible *et al.* (2006) y Inoue-Nagata *et al.* (2004). El resultado de la hibridación a partir de clonas con el fragmento de interés, confirma la presencia de Begomovirus en el área de estudio (Figura 9). Estos resultados son similares a lo reportado por otros autores, que han identificado diversos Begomovirus en el estado de Sinaloa, México (Lugo-Melchor *et al.*, 2011; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015).

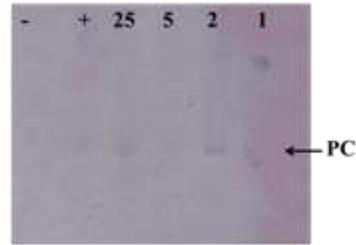


Figura 9. Análisis molecular por hibridación para la detección general de Begomovirus en clonas, utilizando como sonda general el fragmento del gen de la cubierta de la proteína (CP) del Pepper golden mosaic virus (PepGMV). (-): Control negativo. (+): Control positivo. Muestras: 25, 5, 2, 1: clonas de muestras con síntomas de Begomovirus.

La amplificación por círculo rodante, permite ampliar el conocimiento acerca de la diversidad molecular de Begomovirus, descartando el uso de oligos específicos y universales que amplifican fragmentos del genoma. Además es una tecnología sensible, rápida y fiable para los estudios de caracterización molecular, distribución de Geminivirus e interrelaciones de las especies encontradas en los agroecosistemas naturales de México (Fiallo-Olivé *et al.*, 2009).

CAPÍTULO 4. CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de infecciones simples y mixtas en campo entre dos Begomovirus bipartitas [Virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV) y Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV)] y un Begomovirus monopartita [Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV)], en muestras de plantas sintomáticas del cultivo del chile, existiendo una distribución geográfica de variantes de Begomovirus que afecta el cultivo del chile en las principales zonas productoras de Sinaloa, México.

Las secuencias nucleotídicas de los virus PHYVV, PepGMV y TYLCV reportadas en este estudio presentaron una identidad nucleotídica del 94 al 99%, respecto a las secuencias reportadas en GenBank.

El análisis filogenético indica la relación de las variantes del Virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV) que afecta al cultivo del chile en campo en Sinaloa, con el primer aislado reportado de PHYVV en Tamaulipas, México.

Se detectó la presencia de diversos Begomovirus en muestras de plantas de chile en Sinaloa, México. Las clonas obtenidas en estudio ratifica el uso de la ACR para estudios de diversidad genética en Begomovirus.

CAPÍTULO 5. LITERATURA CITADA

- Accotto GP, Mullineaux PM, Brown SC, y Marie D. 1993. Digitaria streak Geminivirus replicative forms are abundant in S-phase nuclei of infected cells. *Virology* 195:257-259.
- Agrios, G.N. 2005. *Fitopatología* 5a. Ed. UTEHA. México. Plant Pathology Cap. 14.
- Anaya-López, J.L., González-Chavira, M., Pons-Hernández, J.L., Garzón-Tiznado, J.A., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R.F., Hernández-Verdugo, S., Guevara-González, R.G., Muñoz-Sánchez, C.I., Guevara-Olvera, L. 2003. Resistance to Geminivirus mixed infections in Mexican wild peppers. *Hortscience* 38:251-255.
- Argüello-Astorga, G.R., Guevara-González, R.G., Herrera-Estrella, L.R. and Rivera-Bustamante, R.F. 1994. Geminivirus replication origins have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* 203:90-100.
- Ascencio-Ibáñez, J. T., Monsalve-Fonnegra, Z. I., Pruna-Camacho, M. B., Díaz-Plaza, R. & Rivera-Bustamante, R. F. 2000. Los Geminivirus. *Rev. Mex. Fitopatol.* 17:113-127.
- Ascencio-Ibáñez J. T., A. R. G. Argüello, L. J. Méndez and Rivera-Bustamante F. R. 2002. First report of Rhynchosia golden mosaic Virus (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, México. *Plant Disease* 86:692.
- Ascencio-Ibáñez J. T., R. Diaz-Plaza, J. Méndez-Lozano, Z. I. Monsalve-Fonnegra, G. R. Argüello-Astorga and R. F. Rivera-Bustamante. 1999. First report of tomato yellow leaf curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease* 83:1178.
- Ascencio-Ibáñez, J.T., Díaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z.I., Argüello-Astorga, G., and Rivera-Bustamante, R.F. 1999. First report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease* 83:1178.
- Barrera-Pacheco, A., A de J. Joaquín-Ramos, I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, M. Pérez-Pérez, L. Guevara-Olvera, and R. Guevara-González. 2008. Análisis de la expresión transcripcional inducida bajo condiciones de estrés biótico y abiótico en *Capsicum chinense* BG-3821. *Agrociencia* 42:95-106.
- Bedford I, Briddon R, Brown JK, Rosell RC, y Markham PG. 1994. Geminivirus transmission and biological characterization of *Bemisia tabaci* (Gennadius) biotypes from different geografic regions. *Ann.Appl.Biol.* 125:311-325.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.

- Boulton, M.I., Steinkellner, H., Donson, J., Markham, P.G., King, D.I., and Davies, J.W. 1989. Mutational analysis of the virion sense of maize streak virus. *Journal of General Virology* 70:2309-2323.
- Bradeen JM, Timmermans MC, y Messing J. 1997. Dynamic genome organization and gene evolution by positive selection in Geminivirus (Geminiviridae). *Mol.Biol.Evol.* 14: 1114-1124.
- Briddon, R.W., Bedford, I.D., Tsai, J.H. and Markham, P.G. 1996. Analysis of the nucleotide sequence of the treehopper-transmitted Geminivirus, Tomato Pseudo-Curly Top Virus, suggests a recombinant origin. *Virology* 219:387-394.
- Brough, C.L., Hayes, R.J., Morgan, A.J., Coutts, R.H.A., and Buck, K.W. 1988. Effects of mutagenesis in vitro on the ability of cloned tomato golden mosaic virus DNA to infect *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of General Virology* 69:503-514.
- Brown J. K. and A. M. Idris. 2006. Introduction of the Exotic Monopartite Tomato yellow leaf curl Virus into West Coast Mexico. *Plant Disease* 90:1360.
- Brown J. K., K. M. Ostrow, A. M. Idris, and D. C. Stenger. 2000. Relationships to other Begomoviruses and identification of A-component variants that affect symptom expression. *Phytopathology* 90:546-552.
- Brown JK y Nelson MR. 1988. Transmission, host range, and virus-vector relationships of chino del tomate, a whitefly-transmitted Geminivirus from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 72:866-869.
- Brown, J. K. 2010. Phylogenetic biology of the *Bemisia tabaci* sibling species group. En Stansly, P. A y Naranjo, S. E. (eds). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, Springer.
- Brown, J. K., Costa, H. S., Laemmlen, F. 1992. First report of whitefly-associated squash silverleaf disorder of Cucurbita in Arizona and of white streaking disorder of Brassica species in Arizona and California. *Plant Disease* 76:426.
- Brown, J. K., Frohlich, D. R., Rosell, R. C. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex. *Annual Review of Entomology* 40:511–534.
- Brown, JK. 2000. Molecular markers for the identification and global tracking of whitefly vector-Begomovirus complexes. *Virus Research* 71:233-260.
- Cardenas-Conejo Y., G. Arguello-Astorga, A. Poghosyan, J. Hernandez-Gonzalez, V. Lebsky, J. Holguin-Peña, D. Medina-Hernandez and S. Vega-Peña. 2010. First Report of Tomato yellow leaf curl Virus Co-infecting Pepper with Tomato chino La Paz Virus in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease* 94:10-1266.

- Chenault, K. D., Melcher U. 1994. Phylogenetic-relationships reveal recombination among isolates of cauliflower mosaic-virus. *Journal of Molecular Evolution* 39:496-505.
- Chowda R. R. V., J. Colvin, V. Muniyappa and S. Seal. 2005. Diversity and distribution of Begomovirus infecting tomato in India. *Archives of Virology* 150:845-867.
- Chu, D., Zhang, Y. J., Brown, J. K., Cong, B., Xu, B. Y., Wu, Q. J., Zhu, G. R. 2006. The introduction of the exotic Q biotype of *Bemisia tabaci* from the Mediterranean region into China on ornamental crops. *Florida Entomologist* 89:168–74.
- Dalton, R. 2006. The Christmas invasion. *Nature* 443:898–900.
- Davies, J.W. and Stanley, J. 1989. Geminivirus genes and vectors. *Trends in Genetics* 5:77-81.
- Díaz-Plaza, R. 2003. Distribución de Geminivirus en la península de Yucatán y estrategias moleculares para su control. Tesis Doctoral. Cinvestav, Irapuato, México. 145.
- Díaz-Plaza, R. Avilés-Baeza, W.I., Peña-Ramírez, R., Rivera-Bustamante, R.F. 2002. Geminiviruses detected in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) un Yucatán Península. Proceedings of the 16th International Pepper Conference. Tampico, Tamaulipas, México. November 10-12.
- Dickinson, V.J., Halder, J. and Woolston, C.J., 1996. The product of the maize streak virus orf V1 is associated with secondary plasmodesmata and is first detected with the onset of viral lesions. *Virology* 220:51-59.
- Dinsdale, A., Cook, L., Riginos, C., Buckley, Y. M., De Barro, P. 2010. Refined global analysis of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) mitochondrial cytochrome oxidase 1 to identify species level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America* 103:196–208.
- Domingo, E., Holland J. J. 1997. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review of Microbiology* 51:151-178.
- Domingo, E., Holland, J. J. 1994. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses. En Morse S. S. (Eds.). *The evolutionary biology of viruses*. Raven Press, New York.
- Domingo, E., Martín, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., Arias, A. 2006. Viruses as quasispecies: biological implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 299:51-82.

- Domingo, E., C. Biebricher, M. Eigen, and J. J. Holland. 2001. Quasispecies and RNA virus evolution: principles and consequences. Landes Bioscience, Austin, Tex.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Echols, H., Goodman, M. F. 1991. Fidelity mechanism in DNA replication. *Annual Review of Biochemistry* 60:477-511.
- Fauquet C.M., D. M. Bisaro, R. W. Briddon, J. K. Brown, B. D. Harrison, E. P. Rybicki, D. C. Stenger and J. Stanley. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae and an updated list of Begomovirus species. *Archives of Virology* 148:405-421.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fernandez, F.R., Cruz, A.R.R., Faria, J.C., Zerbini, F.M., Aragao, J.L. 2009. Three distinct Begomoviruses associated with soybean in central Brazil. *Arch Virol* 154:1567-1570.
- Fiallo-Olivé, E., Rivera-Bustamante, R.F., Martínez-Zubiaur, Y. 2009. Tobacco yellow crinkle virus, a new bipartite Begomovirus infecting tobacco and pepper in Cuba. *Plant Pathology. New Disease Reports* 19:10.
- Fontes EP, Eagle PA, Sipe PS, Luckow VA, y Hanley-Bowdoin L. 1994. Interaction between a Geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J.Biol.Chem.* 269: 8459-8465.
- Frischmut, T., Roberts, S., von Anim, A. and Stanley, J. 1993. Specificity of bipartite Geminivirus movement proteins. *Virology* 196:666-667.
- Gámez-Jiménez C., P. Álvarez-Ruiz, R. D. Rúelas-Ayala, N. E. Leyva-López and J. Méndez-Lozano. 2006. Presence of Tomato yellow leaf curl Virus infecting tomato in Sinaloa, México. *Phytopathology* 96:38.
- García S., D. Miguel, S. Sánchez-Campos, J. Navas-Castillo and E. Moriones. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease-associated Begomoviruses. *Virology* 365:210-219.
- Garzón-Tiznado J. A. 2009. Enfermedades (por Virus y organismos tipo bacteria) del chile y tomate en México. Bayer de México, S.A. de C.V. 1-49. www.bayercropscience.com.mx/bayer/.
- Garzón-Tiznado J. A., G. Acosta-García, I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, R. F. Rivera-Bustamante, V. Maya-Hernández and R. G. Guevara-González.

2002. Presencia de los Geminivirus, Huasteco del Chile (PHV), Texano del Chile Variante Tamaulipas (TPV-T), y Chino del Tomate (VCdT), en los Estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. Revista Mexicana de Fitopatología 20:45-52.
- Garzón-Tiznado, J.A. 1995. Geminivirus involucrados en la enfermedad "rizado amarillo" del cultivo de chile en el sur de Tamaulipas. Caracterización molecular y distribución en México. Tesis Doctoral. Cinvestav-Irapuato.
- Garzón-Tiznado, J.A., Acosta-García, G., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Rivera-Bustamante, R.F., Maya-Hernández, V. y Guevara-González, R.G. 2002. Presencia de los Geminivirus, Huasteco del Chile (PHV), Texano del Chile variante Tamaulipas (TPV-T), y Chino del Tomate (VCdT), en los Estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. Revista Mexicana de Fitopatología. 20:45-52.
- Garzón-Tiznado, J.A., Rivera-Bustamante, R., Herrera-Estrella, L., Delgadillo-Sánchez, F., Pozo-Campodónico, O. 1989. Estudio preliminar sobre el "Rizado Amarillo" del chile (*Capsicum annuum* L.) en el sur de Tamaulipas: un Geminivirus. XII Congreso Nacional de la Soc. Mex. de Fitopatología. Montecillo, Edo. de Mex. Resúmenes 16.
- Garzón-Tiznado, J.A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibáñez, J.T., Herrera-Estrella, L. and Rivera-Bustamante, R.F. 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new Geminivirus by a biobalistic procedure. Phytopathology 83:514-521.
- Gennadius, P. 1889. Disease of the tobacco plantations in the Trikonía. The aleurodid of tobacco. *Ellenike Georgia* 5:1-3.
- Gilbertson RL, Rojas MR, Russell DR, y Maxwell DP. 1991b. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic Geminivirus in the Dominican Republic. *J.Gen.Virol.* 72:2843-2848.
- Gill, R. J., Brown, J. K. 2010. Systematics of *Bemisia* and *Bemisia* relatives: can molecular techniques solve the *Bemisia tabaci* complex conundrum—a taxonomist's viewpoint. En Stansly, P. A y Naranjo, S. E. (eds). *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest*, Springer.
- Golding, F.D. 1930. A vector of leaf curl of cotton in southern Nigeria. *Empire Cotton Growers Reviews* 7:120-126.
- Gómez P., Sempere, R. N., Amari, K., Gómez-Aix, C., Aranda, M. A. 2010. Epidemics of Tomato torrado Virus, Pepino mosaic Virus and Tomato chlorosis Virus in tomato crops: do mixed infections contribute to torrado disease epidemiology. *Annals of Applied Biology* 156:401-410.

- Guevara G. R. G., P. L. Ramos and R. F. Rivera-Bustamante. 1999. Complementation of coat protein mutants of Pepper Huasteco Geminivirus in transgenic tobacco plants. *Phytopathology* 89:540-545.
- Gutiérrez, C. 1999. Geminivirus DNA replication. *Cel. Mol. Life Sciences* 56:313-329.
- Gutiérrez, C. 2000. DNA replication and cell cycle in plants: learning from Geminiviruses. *EMBO Journal* 19:792-799.
- Haible D, Kober S, Jeske H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of Geminiviruses. *J Virol Methods* 135:9-16.
- Hanley, B.L., Settlage, S., Orozco, B.M., Nagar, S., and Robertson, D. 2000. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 18:71-106.
- Hanley-Bowdoin, L. Settlage, S.B., Orozco, B. M., Nagar, S. and Robertson, D. 1999. Geminivirus: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71-106.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlage, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., Robertson, D. 2000. Geminiviruses: Models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Review in Biochemical and Molecular Biology* 35:105-140.
- Hernández-Verdugo, S., A. P. Dávila, and K. Oyama. 1999. Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 64:65-84.
- Holguín-Peña R.J., R. Vázquez-Juárez, C. H. Mejía-Ruiz, J. A. Garzón-Tiznado, and R. F. Rivera-Bustamante. 2004. Geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:107-116.
- Holguín-Peña., R.J., J. Vázquez R. and R. F. Rivera-Bustamante. 2003. Pepper golden mosaic Virus affecting tomatoes crops in the Baja California Península, México. *Plant Disease* 88:221.
- Hou Y. M., E. R. Garrido-Ramirez, S. Stingley, P. Guzman and R. L. Gilbertson. 1996. Characterization of the infectious clones of the Sinaloa strain of pepper huasteco Geminivirus. *Plant Pathol* 86:S43.
- Hou Y., E. J. Paplomatas and R. L. Gilbertson. 1998. Host adaptation and replication properties of two bipartite Geminiviruses and their pseudorecombinants. *The American Phytopathological Society* 11:208-217.
- Hu, W. S., Rhodes, T., Dang, Q., Pathak, V. 2003. Retroviral recombination: Review of genetic analyses. *Frontiers in Bioscience* 8:D143-D155.

- Huerres, C; Carballo, N. 1988. Horticultura. 1 ed. La Habana. Editorial Pueblo y Educación 1-6.
- Hunter, W.B., Hiebert, E., Webb, S.E., Tsai, J.H. and Polston, J.E. 1998. Location of Geminiviruses in the Whitefly *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Plant Disease 82:1147-1151.
- Idris A. M. and J. K. Brown. 2005. Evidence for interspecific-recombination for three monopartite begomoviral genomes associated with the tomato leaf curl disease from central Sudan. Archives Virology 150:1003-1012.
- Idris, A. M., J. C. Guerrero and J. K. Brown. 2007. Two distinct isolates of Tomato yellow leaf curl Virus threaten tomato production in Arizona and Sonora, Mexico. Plant Disease 91:910.
- Inoue-Nagata, A.K., Albuquerque, L.C., Rocha, W.B., Nagata, T. 2004. A simple method for cloning the complete Begomovirus genome using the bacteriophage ϕ 29 DNA polymerase. Journal Virological Methods 116:209-211.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2018.
- Jeske, H. 2009. Geminiviruses. TT Viruses: The Still Elusive Human Pathogens. E.-M. de Villiers, H. Zur Hausen (eds.). Springer Verlag Berlin Heidelberg. 141-156.
- Jeske, H., Lutgemeier, M. & Preiss, W. 2001. DNA forms indicate rolling circle and recombination-dependent replication of Abutilon mosaic virus. EMBO J. 20:6158-6167.
- Johne, R., Muller, H., Rector, A., Ranst, M. & Stevens, H. 2009. Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. Trends Microbiol. 17:205-11.
- Jones, D. R. 2003. Plant viruses transmitted by whiteflies. European Journal of Plant Pathology 109:195-219.
- Kanevski I, Thakur S, Coswsky L, Sunter G, Brough CL, Bisaro DM, y Maliga P . 1992. Tobacco lines with high copy number of replicating recombinat Geminivirus vectors after biobalistic DNA delivery. Plant J. 2:457-463.
- Khan, A.J., Idris, A.M., Al-Saady, N.A., Al-Mahruki, M.S., Al-Subhi, A.M., Brown, J.K. 2008. A divergent isolate of Tomato yellow leaf curl virus from Oman with an associated DNA b satellite: an evolutionary link between Asian and the Middle Eastern virus– satellite complexes. Virus Genes 36:169-176.
- Kirkpatrick, T. W. 1931. Leaf curl disease in Sudan. Bulletin of Entomological Research 21:127-137.

- Laborde, C. J. A. and Pozo, C.O. 1984. Presente y pasado del chile en México, SARH-INIFAP. México.
- Lapidot M. 2002. Screening common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance to tomato yellow leaf curl Virus. *Plant Dis* 86:429-432.
- Laufs J., I. Jupin, C. David, S. Schumacher, F. Heyraud-Nitschke, and B. Gronenborn. 1995. Geminivirus replication: Genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77:765-773.
- Lazarowitz S. G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. *Plant Diseases* 11:327-349.
- Lee Y. H., M. Jung, S. H. Shin, J. H. Lee, S. H. Choi, N. H. Her, J. H. Lee, K. H. Ryu, K. Y. Paek and C. H. Harn. 2009. Transgenic peppers that are highly tolerant to a new CMV pathotype. Springer. Genetic transformation and hybridization. *Plant Cell Rep* 28:223-232.
- Liu, S. S., De Barro, P. J., Xu, J., Luan, J. B., Zang, L. S., Ruan, Y. M., Wan, F. H. 2007. Asymmetric mating interactions drive widespread invasion and displacement in a whitefly. *Science* 318:1769-1772.
- Liu, S., Bedford, I. D., Briddon, R.W. and Markham, P.G. 1997. Efficient whitefly transmission of African cassava mosaic Geminivirus requires sequences from both genomic components. *Journal of General Virology* 78:1791-1794.
- Lugo-Melchor, O.Y., Guzmán-Uriarte, R., García-Estrada, R.S. y León-Félix J. 2011. Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 29:109-118.
- Luján, F. M., y G. F. Acosta. 2004. Selección de genotipos de chile para el Norte de México. Primera Convención Mundial del Chile 2004. León, Gto. Junio 2004. 454-459.
- Malpica, J. M., Fraile, A., Moreno, I., Obies, C. I., Drake, J. W., García-Arenal, F. 2002. The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics* 162:1505-1511.
- Markham, P.G., Bedford, I.D., Liu, S., and Pinner, M.S. 1994. The Transmission of Geminiviruses by *Bemisia tabaci*. *Pesticide Science* 42:123-128.
- Martin, J. H. 2004. Whiteflies of Belize (Hemiptera: Aleyrodidae). Part 1: introduction and account of the subfamily Aleurodicinae Quaintance & Baker. *Zootaxa* 681:1-119.

- Méndez-Lozano J., I. Torres-Pacheco, C. M. Fauquet and R. F. Rivera-Bustamante. 2003. Interactions between Geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper Huasteco Virus and Pepper Golden Mosaic Virus. *Phytopathology* 93:270-277.
- Méndez-Lozano J., R. F. Rivera-Bustamante, C. M. Fauquet and R. De la Torre-Almaraz. 2001. Pepper Huasteco Virus and Pepper Golden Mosaic Virus are Geminiviruses affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in Mexico. *Plant Disease* 85:1291.
- Moffat AS. 1999. Geminiviruses Emerge as Serious Crop Threat. *Science* 286:1835-1836.
- Monci, F., Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Moriones, E. 2002. A natural recombinant between the Geminiviruses Tomato yellow leaf curl Sardinia virus and Tomato yellow leaf curl virus exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish populations. *Virology* 303:317-326.
- Morilla G., D. Janssen, S. García-Andrés, E. Moriones, I. M. Cuadrado and E. R. Bejarano. 2005. Pepper (*Capsicum annuum*) is a dead-end host for Tomato yellow leaf curl Virus. *Phytopathology* 95:1089-1097.
- Nagar, S., Pedersen, T.J., Carrick, K.M., Hanley-Bowdoin, L., and Robertson, D. 1995. A Geminivirus induces expression of a host DNA synthesis protein in terminally differentiated plant cells. *The Plant Cell* 7:705-719.
- Nagy, P. D., Simon, A. E. 1997. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* 235:1-9.
- Nauen, R., Denholm, I. 2005. Resistance of insect pests to neonicotinoid insecticides: current status and future prospects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 58:200-215.
- NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).
- Noueiry, A. O., Lucas, W.J., and Gilbertson, B. 1994. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 76:925-932.
- Núñez, F; Ortega, G. R, y Costa, J. 1996. El cultivo de pimientos, chiles y ajíes. Editorial Mundi Prensa. España. 607.
- Orduno-Vega W. L. 2009. Virus del Enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (TYLCV): Distribución en el Norte de México, identificación de hospedantes alternos y variabilidad genética. Tesis de Maestría. 1-108.
- Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C. M. 1999. Possible emergence of new Geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.

- Palmer, K.E. and Rybicki, E.P. 1998. The Molecular Biology of Mastreviruses. *Advances in Virus Research* 50:183-233.
- Pérez, M. L., y Rico, J. E. 2004. Virus fitopatógenos en cultivos hortícolas de importancia económica en el estado de Guanajuato. Primera edición. Universidad de Guanajuato. 143.
- Polston JE, Bois D, Ano G, Poliakov F, y Urbino C. 1998. Occurrence of a strain of potato yellow mosaic virus in tomato in the eastern Caribbean. *Plant Dis.* 82:126.
- Pozo C., O., S. Montes., y E. Rendón. 1991. Chile (*Capsicum* ssp.). In: Ortega, R., G. Palomino, F. Castillo, V. A. González, y M. Livera (eds). *Avances en el Estudio de los Recursos Genéticos de México*. Sociedad Mexicana de Filogenética. Chapingo, Edo. de Méx., México. 217-238.
- Quaintance, A. L. 1990. Contribution towards a monograph of the American Aleurodidae. Tech. Ser, U.S. Dept. Agric. Bureau Entomology 8:9-64.
- Quiñones, P. M., Castillo, U. G., Alfenas, Z. P. y Murilo, Z. F. 2014. Diversidad molecular de Begomovirus en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.) en Cuba. *Protección Veg* 29: 57-61.
- Ramos, P. L., Guerra, O., Dorestes, V., Ramírez, N., Rivera-Bustamante, R., Oramas, P. 1996. Detection of TYLCV in Cuba. *Plant Disease* 80:1208.
- Rentería-Canett I., B. Xoconostle-Cázares, R. Ruiz-Medrano and R. F. Rivera-Bustamante. 2011. Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal* 8:104.
- Rest, J. S., Mindell, D. P. 2003. SARS associated coronavirus has a recombinant polymerase and coronaviruses have a history of host-shifting. *Infection, Genetics and Evolution* 3:219-225.
- Rodelo-Urrego M., F. García-Arenal and I. Pagán. 2015. The effect of ecosystem biodiversity on Virus genetic diversity depends on Virus species: A study of chiltepin-infecting Begomoviruses in Mexico. *Virus Evolution* 1:1-13.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J. and Gilbertson, R. L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of Geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology* 43:361-394.
- Roossinck M. 1997. Mechanisms of plant virus evolution. *Annu. Rev. Phytopathol* 35 191-209.
- Roossinck, M. J. 2005. Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Reviews Microbiology* 3:917-924.

- Sambrook, J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA. Vol. 1, 999 p. Chapter 6 (6.33-6.64).
- Sanz, A. I., Fraile, A., García-Arenal, F., Zhou, X. P., Robinson, D. J, Khalid, S., Butt, T., Harrison, B. D. 2000. Multiple infection, recombination and genome relationships among Begomovirus isolates found in cotton and other plants in Pakistan. *Journal of General Virology* 81:1839-1849.
- Saunders, K., Salim, N., Mali, V. R., Malathi, V. G., Briddon, R., Markham, P. G., Stanley, J. 2002. Characterization of Sri Lankan Cassava Mosaic Virus and Indian Cassava Mosaic Virus: evidence for acquisition of a DNA B component by a monopartite Begomovirus. *Virology* 293:63-74.
- Schuster, D. J., Mueller, T. F., Kring, J. B., Preece, J. F. 1990. Relationship of the sweetpotato whitefly to a new tomato fruit disorder in Florida. *Hort Science* 25:1618-1620.
- SIAP-SAGARPA (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2018. <http://www.siap.sagarpa.gob.mx/>
- Stange, C. 2006. Interacción planta-Virus durante el proceso infeccioso. *Cien. Inv. Agr.* 33:3-21.
- Stanley, J. 1995. Analysis of African cassava mosaic virus recombinants suggest strand nicking occurs within the conserved nonanucleotide motif during the initiation of rolling circle DNA replication. *Virology* 206:707-712.
- Stansley, P. A., Naranjo, S. E. 2010. *Bemisia*: Bionomics and Management of a Global Pest. Dordrecht, Heidelberg, London, New York: Springer.
- Stenger D. C., J. E. Duffus, and B. Villalon. 1990. Biological and genomic properties of a Geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709.
- Stenger, D. C. 1995. Genotypic variability and the occurrence of less-than genomelength viral-dna forms in a field population of beet curly top Geminivirus. *Phytopathology* 85:1316-1322.
- Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C. & Bisaro, D. M. 1991. Replicational release of Geminivirus genomes from tandemly repeated copies: evidence for rolling-circle replication of a plant viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. 88:8029-8033.
- Storey, H.H. 1931. A new virus of the tobacco plant. *Nature* 128:187.

- Sudarshana, M.R., Wang, H.L., Lucas, W.J. and Gilbertson, R.L. 1998. Dynamics of Bean Dwarf Mosaic Geminivirus cell-to-cell and long-distance movement in *Phaseolus vulgaris* revealed, using the green fluorescent protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:277-291.
- Sunter, G., and Bisaro, D.M. 1992. Transactivation of Geminivirus AR1 and Geminivirus BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at the level of transcription. *Plant Cell* 4:1321-1331.
- Tajima F. and M. Nei. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution* 1:269-285.
- Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Teng, X., Wan, F. H., Chu, D. 2010. *Bemisia tabaci* biotype Q dominates other biotypes across China. *Florida Entomology* 93:363-68.
- Thung, T.H. 1932. De krul- en kroepoekziekten van tabak en de oorzaken van hare verbreiding. Proejsta. Vorstenland. *Tabak Mededeel* 72:1-54.
- Torres-Pacheco I., J. A. Garzón-Tiznado, J. K. Brown, A. Becerra-Flora, and R. F. Rivera-Bustamante. 1996. Detection and distribution of Geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86:1186-1192.
- Torres-Pacheco I., J. A. Garzón-Tiznado, L. Herrera-Estrella and R. F. Rivera-Bustamante. 1993. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco Virus: Analysis and comparison with bipartite Geminiviruses. *J. Gen. Virol* 74:2225-2231.
- Unsel, S., Ringel, M., Hofer, P., Hohnle, M., Jeske, H., Bedford, I. D., Markham, P. G., Frischmuth, T. 2000. Host range and symptom variation of pseudorecombinant virus produced by two distinct bipartite Geminiviruses. *Archives of Virology* 145:1449-1454.
- Varma A. and V. G. Malathi. 2003. Emerging Geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142:145-164.
- Wang, H.L., Gilbertson, R.L., and Lucas, W.J. 1996. Spatial and temporal distribution of bean dwarf mosaic Geminivirus in *Phaseolus vulgaris* and *Nicotian benthamiana*. *Phytopathology* 86:1204-1214.
- Yudava, P., Suyal, G. and Mukherjee, K.S. 2010. Begomovirus DNA replication and pathogenicity. *Current Science* 98:360-368.

Zúñiga-Vega, C., and Ramírez, P. 2002. Los Geminivirus, patógenos de importancia mundial. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 64:25-33.

ANEXOS 6

6.1. Secuencias reportadas en la base de datos GenBank de PHYVV

The image shows a screenshot of the NCBI GenBank database entry for the Pepper huasteco yellow vein virus isolate GRO SA7HUA \$ replication protein (rep) gene, partial cds. The entry is identified by GenBank accession number KY008888.1. The sequence is 1278 base pairs long, with a G+C content of 50.00%. The sequence is shown in a standard GenBank format, with the sequence itself in all caps and the corresponding amino acid translation in single-letter code below it. The sequence starts with ATG and ends with TAA. The amino acid sequence starts with Met and ends with Stop. The sequence is shown in a standard GenBank format, with the sequence itself in all caps and the corresponding amino acid translation in single-letter code below it. The sequence starts with ATG and ends with TAA. The amino acid sequence starts with Met and ends with Stop.

NCBI Resources [How To](#) [Sign In to NCBI](#)

Nucleotide [Advanced](#) [Help](#)

GenBank [Send to:](#)

Pepper golden mosaic virus isolate GROSB71GUA5 replication protein (rep) gene, partial cds

GenBank: KY06851.1
FASTA [Graphics](#)

Go to:

LOCUS KY068511 1011 bp DNA linear 192 28-OCT-2011

DEFINITION Pepper golden mosaic virus isolate GROSB71GUA5 replication protein (rep) gene, partial cds.

ACCESSION KY068511

VERSION KY068511.1

KEYWORDS -

SOURCE Pepper golden mosaic virus (GPMV)

ORGANISM Pepper golden mosaic virus

Taxonomy [Viruses](#); [ssDNA viruses](#); [Double-stranded](#); [Egenviruses](#).

REFERENCE 1 (Base 1 to 1011)

AUTHORS Hernandez Espinal, L.A., Saez Tiznado, J.A., Enriquez Verdugo, J., Salgado Villagomez, J.M. and Rojas Hernandez, J.E.

TITLE Double-stranded ssDNA replication protein (rep) gene of Pepper golden mosaic virus (GPMV) in the state of Hidalgo, Mexico

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (Base 1 to 1011)

AUTHORS Hernandez Espinal, L.A.

TITLE Class C RdRp-like

JOURNAL Subcellular (18-OCT-2010) Facilitated by Chemical Synthesis, Diversification Mechanisms of Ribosomes, An. Gr. De Las Ciencias y Div. Diversidad Biologica, Cellulosa, Hidalgo 2010, Mexico

COMMENT ##Assembly-Data-BIMB01
Sequencing Technology: 11 Sanger library sequencing
##Assembly-Data-BIMB01

FEATURES

Location/Qualifiers

source
1..1011
/organism="Pepper golden mosaic virus"
/mol_type="genomic DNA"
/locus_tag="GROSB71GUA5"
/db_xref="taxon:112121"
/gene="rep"
/synonym="Hidalgos Pepper, Hidalgo, Mexico"
/cellular_location="17-PeB-0000"
/cellular_tag="Hernandez Espinal L A"

gene
complement(1)..710
/gene="rep"

cds
complement(1)..710
/gene="rep"
/cds_tag="1"
/gene_id="GROSB71GUA5"
/translation="MPLPFFNFKLQGGGFLTFYGGDFGKALGKGLKLNKVFPL
VLRVKKKRRDFFALSLGQYFSDKRDARFFDQFKRRAQPKWVFGAURDAKAV
KAVTGGDCCVYVQYQVYRHRDQVYKSNVMAAAREALGKGGKDFPFTYVY
RSDIQRKRLFTYFQFQYAFYLRDFQVYKQVYKVFYRRAARDFQFQYVY
RSDKRRKRRKALQFQYVLRK"

ORIGIN

```

1  gGgaagGc  aacGacGc  gGggaGg  GgaagGga  aaaaGgGc  GgaagGg
21  ggaGgaaa  GaaGgaaa  GaaGaaGg  GcGcGgGg  ggaagggg  aacGgaaa
31  aacGcGca  gaaGaaGc  gGgaGcGc  aGgaagag  GgGcaagG  ggaGcGg
41  aGgaagga  gGaaGgaa  GggggggG  GgGaaGg  ggaGgGgG  GgaaGcGc
51  gGcGcGca  aGaaGcGc  aagGcGcG  aGaaagGg  GgGcGcGc  ggaGgaaGc
61  aaggaagG  gaaGcGc  aagGcGcG  aGgaagGg  GcGcGcGc  aGcGgaaa
71  aaggaagG  GgGcGcGc  aaGcGcGc  aGaaGaaa  GaaGgGgG  GgGaaGcGc
81  aaggaagG  gGcGcGg  aGaaGcGc  gGcGgGc  aacGgggg  aGcGgggg
91  gGgGcGcG  GggaGaaa  gGaaGcGc  gGcGgGc  GcGaaGc  aaGgGcGg
101  aagGgagG  Gggggaaa  aaGgaaGg  aGaaGaaG  gaGaaGg  gaGggggg
111  GcGaaGc  gaaGcGc  aaGcGggg  aaGcGgga  gaGaaGc  GggaGcGc
121  gaaGcGg  GcGcGgga  aacGcGcG  aacGgGaa  gaaGgGc  GggGgGg
131  GgaaGcGc  gaaGcGg  GgGgaaGc  aaggaagG  aaGaaGc  GgGaaGcG
141  GgGgGcG  GgggGaaG  GcGaaGc  aagaaGcG  ggaGaaa  ggaGaaGc
151  ggaGaaGc  GaaGcGc  ggaGgga  gaGcGcGc  ggaGcGg  ggaGaaGc
161  aGcGgagG  gaGgGc  aaGaaGaa  ggaGgga  aaaaGcGc  GgaGcGcG
171  aaGaaaG  aaaaGgga  gGaaGc  gaGcGcG  aGcGaaGg  g

```


6.4. Constancia de Congreso internacional

**XXV Congreso Nacional y V
Internacional de Fitogenética**



**La Universidad Autónoma de San Luis Potosí
la Facultad de Agronomía y Veterinaria
y la Sociedad Mexicana de Fitogenética**
otorgan el presente
RECONOCIMIENTO

*A: L.A. Hernández Espinal, J.E. Retes Manjarrez, V.M. González Mendoza, C.M.
Melgoza Villagómez, I. Enriquez Verdugo, J.A. Garzón Tiznado*

Por haber presentado la **PONENCIA:**

DETECCIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A GEMINIVIRUS EN CHILE



Dr. José Luis Lara Mireles
Director de la Facultad



Dr. Ramón Garza García
Presidente de la SOMEFI

San Luis Potosí, SLP. MEXICO.
29 de septiembre al 3 de octubre de 2014.

6.5. Estancia de investigación (Beca mixta de CONACYT)



Cinvestav

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN

SECRETARÍA ACADÉMICA CINVESTAV IRAPUATO

KM 9.6 LIBRAMIENTO NORTE CARRETERA IRAPUATO-LEÓN APARTADO POSTAL 629, 36821 IRAPUATO, GTO.

TEL: (462) 6239606, FAX: (462) 6245846 secretaria@ira.cinvestav.mx

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente me permito comunicar que el **MC. LUIS ALBERTO HERNANDEZ ESPINAL**, estudiante del Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, realizó una Estancia de Investigación en el Laboratorio de "Virología Vegetal", bajo la dirección del Dr. Rafael Rivera Bustamante, Investigador Titular del Departamento de Ingeniería Genética de esta Unidad.

La estancia del MC Hernández Espinal inició el día 01 de enero y concluyó el día de hoy.

A petición del interesado y para los fines que estime pertinentes, se extiende la presente constancia en la ciudad de Irapuato Guanajuato, a los treinta y un días del mes de marzo del año dos mil catorce.

Atentamente


Dr. Rafael Rivera Bustamante
Investigador Titular Depto. I. G.


Dra. June Simpson W.
Secretaría Académica



CINVESTAV - IRAPUATO
SECRETARÍA ACADÉMICA