



## ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DISTRIBUCIÓN DE BEGOMOVIRUS EN EL CULTIVO DEL CHILE (*Capsicum annuum* L.) EN SINALOA, MÉXICO

### PHYLOGENETIC ANALYSIS AND DISTRIBUTION OF BEGOMOVIRUS IN PEPPER (*Capsicum annuum* L.) CROP IN SINALOA, MEXICO

Luis A. Hernández-Espinal<sup>1</sup>, Idalia Enríquez-Verdugo<sup>1</sup>, Claudia M. Melgoza-Villagómez<sup>2</sup>, Jesús E. Retes-Manjarrez<sup>3</sup>, Sixto Velarde-Félix<sup>4</sup>, Perla J. Linares-Flores<sup>5</sup> y José A. Garzón-Tiznado<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa. San Ángel 3886, Mercado de Abastos. 80260, Fraccionamiento San Benito, Culiacán, Sinaloa, México. <sup>2</sup>Sitio Experimental Valle de Santo Domingo, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). km 208 carretera Transpeninsular. Cd. Constitución, B. C. S. México. <sup>3</sup>Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. km 17.5 carretera Culiacán-Eldorado. 80000, Culiacán, Sinaloa, México. <sup>4</sup>Campo Experimental Valle de Culiacán, INIFAP. km 17.5 carretera Culiacán-Eldorado. Culiacán, Sinaloa, México. <sup>5</sup>Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Sinaloa. Av. de Las Américas y Blvd. Universitarios s/n. 80013, Culiacán, Sinaloa, México.

\*Autor para correspondencia (garzon24@uas.edu.mx)

#### RESUMEN

En el año 2017 el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en México registró una producción de 3 millones 54 mil toneladas. En los últimos cinco años se han registrado daños económicos y pérdidas de 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, México. Se colectaron 121 muestras de chile con síntomas de Begomovirus en los municipios de Escuinapa, Rosario, Concordia, Mazatlán, Elota, Culiacán, Guasave y Ahome. En las 121 muestras se detectaron Begomovirus mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); el PHYVV se detectó en 74.4 % de las muestras, el PepGMV en 53.7 %, el TYLCV en 5.8 % y en 12.4 % no se identificó el tipo de Begomovirus; además, se detectaron infecciones mixtas entre los virus PHYVV, PepGMV y TYLCV con 5.8 % y en la combinación PHYVV y PepGMV con 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 de 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.

#### SUMMARY

In the year 2017, chili pepper (*Capsicum annuum* L.) in Mexico registered a production of 3 million 54 thousand tons. In the last five years there have been economic damages and losses of 20 % in the production of chili pepper due to Geminiviruses. The objective of this study was to determine the distribution and genetic variability of the Begomovirus that infects pepper in the main producing areas of Sinaloa, Mexico. A total of 121 pepper samples with symptoms of Begomovirus were collected in the municipalities of Escuinapa, Rosario, Concordia, Mazatlán, Elota, Culiacán, Guasave and Ahome. In all the 121 samples Begomoviruses were detected by the polymerase chain reaction (PCR) technique; PHYVV was detected in 74.4 % of the samples, PepGMV in 53.7 %, TYLCV in 5.8 % and in 12.4 % the type of Begomovirus was not identified. In addition, mixed infections were detected between the viruses PHYVV, PepGMV, and TYLCV with 5.8 % and in the combination PHYVV and PepGMV with 36.4 %. This is the first report of a mixed infection under field

conditions in pepper plants with a monopartite Begomovirus (TYLCV) and two bipartite Begomoviruses (PHYVV and PepGMV) in the municipalities El Rosario, Culiacán and Ahome of the state of Sinaloa, Mexico. The viruses PHYVV, PepGMV and TYLCV presented nucleotide identity of 94 to 99 % with that reported in GenBank. TYLCV was detected in different pepper genotypes of pepper; Serrano, Jalapeño, Bell and Ancho in the municipalities of Rosario, Culiacán and Ahome, indicating a wide distribution and host range of this Begomovirus in the different genotypes of pepper grown in Sinaloa.

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

#### INTRODUCCIÓN

Los virus son responsables de causar graves pérdidas en la producción del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) (Lee *et al.*, 2009). Un grupo de estos virus, conocido como Geminivirus se localizan principalmente en zonas tropicales y subtropicales, lo que causa daños económicos y pérdidas de hasta 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) (ICTV, 2018; Fauquet *et al.*, 2003). El genoma de los Begomovirus es generalmente bipartita, con excepción del virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Tomato yellow leaf curl virus, TYLCV) (Lazarowitz y Shepherd, 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 separadas por una región intergénica o región común (RI o RC), la cual contiene el origen de replicación del virus y dos promotores que dirigen la transcripción genética en direcciones opuestas, con excepción de

una secuencia de RI de aproximadamente 200 pb que se encuentra en ambos ADN virales y es denominada como región común (RC) (Hanley-Bowdoin *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), al cual se le denominó virus huasteco del chile (PHV) (Torres-Pacheco *et al.*, 1993) y posteriormente se modificó el nombre a virus huasteco vena amarilla del chile (Pepper Huasteco Yellow Vein Virus, PHYVV), por los síntomas que causa en la hoja de las plantas infectadas (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 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 (*Nicotiana tabacum*) (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Otras variantes de este virus se han encontrado en Sinaloa, Tamaulipas y Baja California Sur (Holguín-Peña *et al.*, 2004b). 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 año 2005 (Gámez-Jiménez *et al.*, 2006 Com. Pers.<sup>1</sup>; Orduño-Vega, 2009 Com. Pers.<sup>2</sup>) y en Sonora en el año 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 *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 al chile en las principales zonas productoras de Sinaloa, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

El estudio se realizó durante los años 2013 a 2016 en las principales zonas productoras del cultivo de chile 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 éstos 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 (Cuadro 1) fueron georeferenciadas mediante un equipo GPS (Garmin Etrex®, Taipei, Taiwán). 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 de Ciudad Universitaria, Culiacán, Sinaloa.

### Extracción de ADN

A partir del tejido foliar joven recolectado se realizó la extracción de ADN genómico con la metodología descrita por Doyle y Doyle (1990). La integridad del ADN 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, Waltham, Massachusetts, USA) a 260 nm y con la relación de absorbancia a 260/280 nm, respectivamente; finalmente, se almacenó a -20 °C.

### 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'-GAATTAAGGTACATGGAC-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

<sup>1</sup>Gámez-Jiménez C., P. Álvarez-Ruiz, R. D. Ruelas-Ayala, N. E. Leyva-López and J. Méndez-Lozano (2006) Presence of Tomato yellow leaf curl virus infecting tomato in Sinaloa, México. *Phytopathology* 96:S38.

<sup>2</sup>Orduño V. 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. CIIDIR-Sinaloa. Instituto Politécnico Nacional. Guasave, Sinaloa, México. 108 p.

**Cuadro 1. 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	
			Latitud N	Longitud O
Rosario	Cacalotán	Serrano, Jalapeño, Ancho y Anaheim	23° 03' 42.6"	105° 50' 53.9"
Mazatlán	El Walamo	Jalapeño y Anaheim	23° 07' 10.0"	106° 15' 39.5"
Concordia	El Verde	Jalapeño	23° 22' 12.4"	106° 07' 58.0"
Escuinapa	Isla del Bosque	Jalapeño, Serrano y Ancho	22° 44' 10.9"	105° 51' 14.5"
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	Morrón	24° 35' 13.4"	107° 26' 25.6"
Guasave	Adolfo Ruiz Cortínez	Jalapeño, Serrano, Anaheim y Ancho	25° 41' 04.8"	108° 48' 43.4"
Ahome	Los Mochis	Morrón, Jalapeño y Cayenne	25° 47' 64.4"	108° 54' 80.0"

fragmento del gen *Rep* y la región intergénica de 1063 pb; TYLCV se detectó con los oligonucleótidos TYC1F 5'-GGGCCTAGAGACCTGGCCAC-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, que contenía Buffer *Taq* ADN polimerasa 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, oligonucleótidos 0.25 µM, *Taq* ADN polimerasa 1.0 U, ADN 120 ng. La amplificación se realizó en un termociclador C1000TM (Thermal Cycler BIO-RAD, Hercules, California, USA) y las condiciones 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'-CCGAATTCGACTGGACCTTACATGGNCCTTCAC-3') y MotCP2123 (5'-GAGTCTAGAGGSTANGTGAAGGAAATAA/GTTCTTGGC-3') 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-Ibáñez *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, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, 0.2 mM de cada dNTP, oligonucleótidos 0.25 µM y *Taq* ADN polimerasa 1.0 U. Las condiciones de amplificación (termociclador C1000TM Thermal Cycler BIO-RAD, Hercules, California,

USA) fueron: precalentamiento por 5 min a 94 °C, seguido de 32 ciclos a tres temperaturas (desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 60 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 1 min) y una extensión final 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 geles de agarosa al 1.5 %.

### Secuenciación y análisis

Los fragmentos se purificaron (UltraClean 15ADN Purif MO BIO LAB, Hercules, California, USA) y fueron enviados para su secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN 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), mediante 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).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Detección de Geminivirus

En todas las muestras de ADN analizadas 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 (Cuadro 2).

**Cuadro 2. 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 <sup>+</sup> (74.4 <sup>++</sup> )	65 (53.7)	7 (5.8)	15 (12.4)

<sup>+</sup>Número de muestras, <sup>++</sup>Frecuencia de virus en porcentaje.

### 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, 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 (Guevara-González *et al.*, 1999; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). 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 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 (Holgún-Peña *et al.*, 2004a; Torres-Pacheco *et al.*, 1996).

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. 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 (Méndez-Lozano *et al.*, 2001; 2003; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). 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, lo que facilita eventos de recombinación (García-Andrés *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).

### Detección de Begomovirus monopartitas

El virus TYLCV es común en infecciones virales de tomate; sin embargo, sólo 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 %), en estos momentos se le considera con riesgo potencial para el cultivo de chile en el estado de Sinaloa, lo que no coincide con lo descrito por otros autores, que han reportado a *C. annuum* como un hospedante alternativo de Tomato yellow leaf curl (Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010; Morilla *et al.*, 2005; Orduño-Vega, 2009 Com. Pers.<sup>2</sup>). El TYLCV, descrito originalmente en plantas de tomate, 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 (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999), y en Sinaloa fue observado en 2005 (Gámez-Jiménez *et al.*, 2006 Com. Pers.<sup>1</sup>). En el presente estudio, este Begomovirus se detectó solamente en infecciones mixtas (5.8 %) con el PHYVV y PepGMV. 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, que son comunes en regiones tropicales y subtropicales (Lugo *et al.*, 2011; Reddy *et al.*, 2005; Torres-Pacheco *et al.*, 1996); este complejo de virus en infecciones mixtas se ha descrito en maleza y cultivos de interés económico, constituye un alto riesgo en la aparición de nuevas cepas y variantes de Begomovirus por la posible recombinación entre éstos, 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).

**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 3); 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 1).

**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 muestra, respectivamente; éstas fueron comparadas mediante BLAST para determinar el porcentaje de identidad entre éstas 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 los números 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 Com. Pers.<sup>3</sup>) presentó una identidad de 95.25 % con respecto a las accesiones obtenidas en este estudio; al comparar éstas con la accesión LN848878.1, también descrita para Sinaloa (Rodelo-Urrego *et al.*, 2015), se observó una identidad promedio de 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.* (1996 Com. Pers.<sup>3</sup>) (AYO44162.1) que fue la que presentó mayor similitud con la secuencia reportada por Torres-Pacheco *et al.* en 1993 (Cuadro 3).

<sup>3</sup>Hou Y. M., E. R. Garrido R., S. Stingley, P. Guzman and R. L. Gilbertson (1996) Characterization of the infectious clones of the Sinaloa strain of pepper huasteco Geminivirus. *Plant Pathology* 86:S43.



Figura 1. Distribución de Begomovirus en el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. H: PHYVV, G: PepGMV, T: TYLCV, B: otro Begomovirus.

**Cuadro 3. Porcentaje de identidad con base en las secuencias nucleotídicas de PHYVV detectadas en campos agrícolas del estado de Sinaloa, México, con respecto a 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 <sup>†</sup>	No. de Accesoión GenBank <sup>††</sup>	Genotipo	Identidad (%)		
			No. de Accesoión GenBank <sup>†</sup>		
			X70418.1	AY044162.1	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

<sup>†</sup>Nomenclatura de los aislados: 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. <sup>††</sup>Número de accesoión en el GenBank de secuencias de Begomovirus obtenidas en este trabajo de investigación. <sup>\*</sup>Número de accesoión de secuencias reportadas en el GenBank (Hou *et al.*, 1996 Com. Pers.<sup>3</sup>; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015; Torres-Pacheco *et al.*, 1993).

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

En general, los resultados mostraron una alta similitud entre las secuencias de los aislados de este estudio y los aislados de PHYVV, PepGMV y TYLCV previamente reportados (Brown e Idris, 2006; Hou *et al.*, 1996 Com. Pers.<sup>3</sup>; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015; Torres-Pacheco *et al.*, 1993). 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.

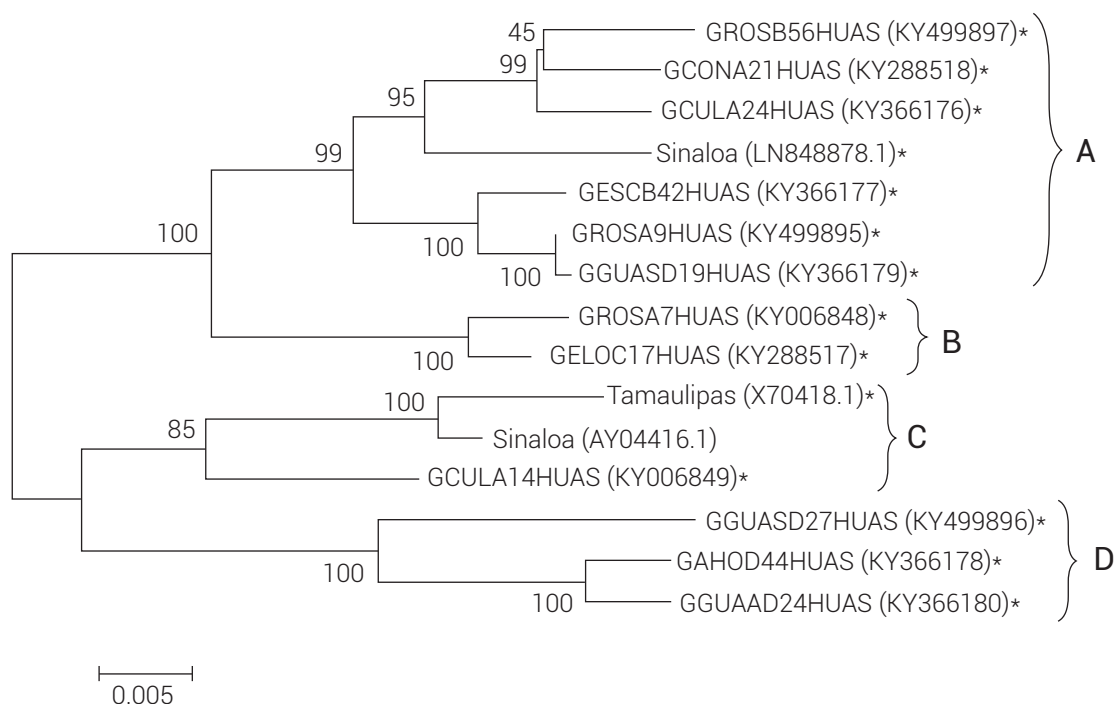
### Análisis filogenético

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 Com. Pers.<sup>3</sup>) 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 los aislados se asociaron con la accesoión LN848878.1 registrada para Sinaloa en el año 2015, las secuencias del sur (KY499897, KY288518,



**Figura 2. 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 que analizan 1268 posiciones con el método de Tajima-Nei (1984) y un índice de Felsenstein de 1000 réplicas. \*Aislados de Begomovirus en este estudio.**

KY366177, KY499895), con identidad del 97 al 98 %, centro (KY366176), con identidad de 98 % y norte (KY366179, identidad 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 2); por lo anterior, se considera que el PHYVV posiblemente se introdujo a Sinaloa por el municipio de Culiacán durante el año agrícola 1994, a través de plántulas de tabaco infectadas de Begomovirus, enviadas desde invernaderos localizados en Tepic, Nayarit, lo que ocasionó 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) (Garzón Tiznado, J. A. Com. Pers.<sup>4</sup>).

Torres-Pacheco *et al.* (1996) reportan 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 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, lo que facilita 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, lo que puede implicar ganancia o pérdida de función, que finalmente conlleva a la adaptación o evolución de las especies (Stange, 2006).

## 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. Se determinó el patrón de 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 % con respecto a las

<sup>4</sup>Garzón Tiznado, J. A. Investigador de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa.

secuencias reportadas en el 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.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONACYT por el apoyo brindado para realizar esta investigación, con beca para Luis A. 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.

### BIBLIOGRAFÍA

- Ascencio-Ibáñez J. T., R. G. Argüello-Astorga, J. Méndez-Lozano and R. F. Rivera-Bustamante (2002) First report of *Rhynchosia golden mosaic virus* (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, México. *Plant Disease* 86:692.
- Ascencio-Ibáñez J. T., R. Díaz-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.
- 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) *Chino del tomate virus*: relationships to other Begomoviruses and identification of A-component variants that affect symptom expression. *Phytopathology* 90:546-552.
- Cárdenas-Conejo Y., G. Argüello-Astorga, A. Poghosyan, J. Hernández-González, V. Lebsky, J. Holguín-Peña, D. Medina-Hernández 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* 94:1266.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- 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.
- García-Andrés S., D. M. Tomás., 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., 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.
- Guevara-González 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.
- Hanley-Bowdoin L., S. B. Settlege, B. M. Orozco, S. Nagar and D. Robertson (2000) Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18:71-106.
- Holguín-Peña R. J., R. Vázquez-Juárez, H. Mejía-Ruiz, J. A. Garzón-Tiznado and R. F. Rivera-Bustamante (2004a) Geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y rango de hospedantes en Baja California Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22:107-116.
- Holguín-Peña R. J., R. Vázquez J. and R. F. Rivera-Bustamante (2004b) *Pepper golden mosaic virus* affecting tomatoes crops in the Baja California Península, México. *Plant Disease* 88:221.
- Hou Y. M., E. J. Paplomatas and R. L. Gilbertson (1998) Host adaptation and replication properties of two bipartite Geminiviruses and their pseudorecombinants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:208-217.
- ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses (2018) The International Code of Virus Classification and Nomenclature. International Committee on Taxonomy of Viruses. Washington, D. C. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/w/ictv-taxonomy> (Abril 2018).
- 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.
- Lapidot M. (2002) Screening common bean (*Phaseolus vulgaris*) for resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Disease* 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. and R. J. Shepherd (1992) Geminiviruses: genome structure and gene function. *Critical Reviews in Plant Sciences* 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. *Plant Cell Reports* 28:223-232.
- Lugo M. O. Y., R. Guzmán U., R. S. García E. and J. León F. (2011) Geminivirus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en tomate, en el valle agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:109-118.
- 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.
- 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.
- Reddy R. V. C., J. Colvin, V. Muniyappa and S. Seal (2005) Diversity and distribution of begomoviruses infecting tomato in India. *Archives of Virology* 150:845-867.
- 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.
- 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.
- Stange C. (2006) Interacción planta-virus durante el proceso infectivo. *Ciencia e Investigación Agraria* 33:3-21.
- Stenger D. C., J. E. Duffus and B. Villalon (1990) Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathology* 80:704-709.
- 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.



- 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. *Journal of General Virology* 74:2225-2231.
- Varma A. and V. G. Malathi (2003) Emerging geminivirus problems: a serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology* 142:145-164.
- Yudava P., G. Suyal and S. K. Mukherjee (2010) Begomovirus DNA replication and pathogenicity. *Current Science* 98:360-368.