



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
CAMPUS LOMA BONITA

---

IDENTIFICACIÓN DE VIRUS FITOPATÓGENOS EN CHILE  
SOLEDAD (*Capsicum annuum* L.) EN ZONAS PRODUCTORAS DE  
LA CUENCA DEL PAPALOAPAN.

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
Maestra en Producción y Procesamiento Agrícola

PRESENTA:

C. MARIA DEL CARMEN ANTONIO LUIS

Director:

Dr. Rogelio Enrique Palacios Torres

Codirector:

Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa

Loma Bonita, Oaxaca, México, 2024



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/182
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de agosto de 2024

M. EN C. HÉCTOR LÓPEZ ARJONA  
VICE-RECTOR ACADÉMICO  
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que, el jurado evaluador del examen para obtener el grado de **Maestra en Producción y Procesamiento Agrícola** de la **C. María del Carmen Antonio Luis**, con número de **Matrícula 21180006**, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título **“Identificación de virus fitopatógenos en chile soledad (*Capsicum annuum L.*) en zonas productoras de la cuenca del Papaloapan”**, para su posterior presentación y defensa por el sustentante.

Agradezco su atención y quedo a sus órdenes para cualquier duda o aclaración.

Atentamente  
*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú

**Dr. José Abad Zavaleta**  
Jefe de la División de Estudios de Posgrado



C.c.p. Dr. Rogelio Enrique Palacios Torres– Director de tesis.  
C.c.p. Dra. Ana Rosa Ramírez Seañez– Coordinadora de la Maestría en Producción y Procesamiento Agrícola  
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo.

**CAMPUS TUXTEPEC**  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01 (287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

**CAMPUS LOMA BONITA**  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01 (281)8729230



# UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2024/183
ASUNTO	Jurado para examen de grado

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, a 26 de agosto de 2024

**MARÍA DEL CARMEN ANTONIO LUIS**  
**MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN Y PROCESAMIENTO AGRÍCOLA**  
**UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN**

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de **Maestra en Producción y Procesamiento Agrícola** estará integrado por los siguientes investigadores.


Profesor Investigador	Jurado de Examen
Dra. Ana Rosa Ramírez Seañez	Presidente
Dr. Hipólito Hernández Hernández	Secretario
Dr. Rogelio Enrique Palacios Torres	Vocal
Dr. Adolfo Amador Mendoza	Primer Suplente
Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa	Segundo Suplente

Sin más por el momento, le envío saludos cordiales.

Atentamente  
*terra uberrima, mens aperta*  
Bou Lo-tama, chí jí jú

  
**Dr. José Abad Zavaleta**  
Jefe de la división de estudios  
de posgrado.



  
**M. en C. Héctor López Arjona**  
Vicerrector Académico  
Vo. Bo.



C.c.p. Dr. Rogelio Enrique Palacios Torres– Director de tesis.  
C.c.p. Dra. Ana Rosa Ramírez Seañez– Coordinadora de la Maestría en Producción y Procesamiento Agrícola  
C.c.p. M. E. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa del Departamento de Servicios Escolares.  
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC  
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.  
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.  
Tel. 01(287)8759240

[www.unpa.edu.mx](http://www.unpa.edu.mx)

CAMPUS LOMA BONITA  
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.  
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.  
Tel. 01(281)8729230

## HOJA DE ORIGINALIDAD

El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la **Universidad del Papaloapan** para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente.

## AGRADECIMIENTOS

Al **CONAHCYT** por brindarme una beca para poder realizar y culminar mis estudios de posgrado.

A la **Universidad del Papaloapan** por darme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado y realizarme profesionalmente.

Al **Dr. Rogelio Enrique Palacios Torres**, gracias por compartir sus conocimientos en entomología y fitopatología, sus correcciones, consejos, apoyo en la recolección de muestras, por no desistir y sobre todo por su paciencia para realizar esta investigación.

A la **Dra. Blanca Estela Barrera Figueroa**, por su orientación, enseñanzas, apoyo y paciencia para llevar a cabo esta investigación.

Al **Dr. Hipólito Hernández Hernández**, por su conocimiento compartido, apoyo y correcciones en este trabajo.

A la **Dra. Ana Rosa Ramírez Seañez**, por sus correcciones y consejos en este trabajo.

Al **Dr. Adolfo Amador Mendoza**, por sus correcciones y consejos en este trabajo.

A mi gran amigo **Adolfo Hafid Rodríguez Hernández**, por estar ahí gracias, por tanto.

Al **MBt. Maximiliano López Morales**, por su orientación y apoyo en esta investigación, por compartir sus conocimientos y por su desinteresada amistad.

A **IBt Fabiola Saldaña Asención** por brindarme su apoyo y amistad.

A mis amigos y compañeros: **Eleazar, Christian, Roció, Danilo, Lupita, Jonás, Rosalba, Itzel, Keyla, Guillermo**, gracias por sus consejos y motivarme a no rendirme.

A la **Familia Leyva Sosa** por brindarme su casa y hacerme parte de su familia.

## **DEDICATORIA**

### **A mis Padres**

*Margarita Luis Martínez*

*& Mauro Antonio Pacheco*

A quienes amo y admiro incondicionalmente  
Por ser el mejor ejemplo de vida  
Por enseñarme que cuando se quiere se puede, que el límite de mis aspiraciones  
depende solo de mí.

### **A mis Hermanos**

*Armando, Faustino, Silvia*

Por brindarme su apoyo en los momentos difíciles.

### **A mi sobrino**

*Ángel Yadiel García Antonio*

Por ser la razón y motivo de mis alegrías.

### **A mis Abuelos**

*Ángela Martínez & Francisco Luis<sup>†</sup>*

*Bertha Pacheco & German Antonio*

Por los momentos compartidos, por las risas y abrazos.  
Por su tenacidad, valor y dulzura.

“Sé que el trabajo duro nunca te traiciona, para ser perfecto puede que necesites talento, pero puedes llegar hasta el 98 % solo con esfuerzo”

Baekhyun by EXO

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>DEDICATORIA</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvi
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
2.1. Agricultura a campo abierto .....	3
2.2. Producción de Chile en México.....	3
2.3. Importancia del cultivo de chile. ....	4
2.4. Producción de chile soledad. ....	5
2.4.1. Generalidades del chile ( <i>Capsicum annuum</i> L.).....	6
2.4.2. Condiciones edafoclimáticas .....	6
2.4.3. Plagas y enfermedades del chile.....	6
2.4.4. Virus fitopatógenos de chile .....	7
2.4.5. Principales virus en el cultivo de chile .....	8
2.4.6. Generalidades de la Familia Geminiviridae .....	9
2.4.7. Clasificación de los virus de acuerdo con su comportamiento. ....	9
2.4.8. Vectores asociados a la transmisión de virus.....	11
2.4.9. Sintomatología.....	12
2.5. Identificación de agentes virales .....	13
2.5.1. Detección técnica ELISA .....	13
2.5.2. Detección por RT-PCR.....	13
2.6. Método de electroforesis.....	14
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	15
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	19

<b>5. OBJETIVOS</b>	19
5.1. Objetivo General	19
5.2. Objetivos Específicos	19
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20
6.1. Localización	20
6.2. Material Experimental	21
6.3. Toma de Muestras Experimentales	21
6.4. Extracción de RNA	23
6.5. Cuantificación del RNA	23
6.6. Síntesis de DNA complementario (cDNA)	24
6.7. Amplificación de DNA complementario (RT-PCR)	24
6.8. Electroforesis	25
6.9. Extracción de DNA	26
6.10. Cuantificación del DNA	27
6.11. Amplificación de DNA (PCR)	27
6.12. Purificación de producto de PCR	29
6.13. Secuenciación	30
6.14. Análisis Filogenético	30
6.15. Análisis hospederos de la familia solanácea	31
<b>7. RESULTADOS</b>	32
7.1. Sintomatología presente en las localidades muestreadas	32
7.2. Extracción de RNA	36
7.3. Productos obtenidos en virus de RNA mediante PCR	37
7.4. Extracción de DNA	39
7.5. Detección de virus de DNA mediante técnica de PCR	42
7.6. Resultado de Secuenciación	49

7.7. Análisis filogenético.....	50
7.8. Hospederos de la familia Solanaceae.....	54
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	<b>59</b>
8.1. Presencia del virus del Mosaico dorado del chile (PepGMV).....	59
8.2. Presencia del Virus de la vena Amarilla del Chile Huasteco (PHYVV) ....	60
8.3. Detección de infecciones mixtas.....	60
8.4. Sintomatología .....	62
8.5. Filogenia .....	63
8.6. Hospederos de la familia solanácea .....	63
<b>9. CONCLUSIONES</b> .....	<b>65</b>
<b>10. PERSPECTIVAS</b> .....	<b>66</b>
<b>11. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>68</b>
<b>12. ANEXOS</b> .....	<b>77</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Localización geográfica de los sitios de recolección de material vegetativo de plantas de chile soledad ( <i>Capsicum annuum</i> L.) con síntomas de presencia de virus. ....	22
<b>Tabla 2.</b> Oligonucleótidos utilizados para virus de RNA (Nemes y Salánki, 2020). ....	25
<b>Tabla 3.</b> Condiciones de PCR, para virus de RNA .....	25
<b>Tabla 4.</b> Oligonucleótidos empleados para virus de DNA, por Hernández- Espinal <i>et al.</i> , (2018). ....	28
<b>Tabla 5.</b> Condiciones de PCR para virus del Mosaico dorado del chile (PepGMV) .....	28
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de PCR para Virus Huasteco de la Vena Amarilla del Chile (PHYVV) .....	29
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de PCR para Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV). ....	29
<b>Tabla 8.</b> Concentración del RNA obtenido de las muestras .....	37
<b>Tabla 9.</b> Concentración de DNA en las muestras de plantas con síntomas de virus y planta sana. ....	39
<b>Tabla 10</b> Medias obtenidas respecto a la concentración y pureza de las muestras de DNA. ....	41
<b>Tabla 11.</b> Resultado de la mejor coincidencia con blastn. ....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Localización de las comunidades y localidades de muestreo de los estados de Oaxaca y Veracruz.....	20
<b>Figura 2.</b> Síntomas presentados en el genotipo de Chiser-522 en la localidad de Loma Bonita. A y C) Clorosis presente en hojas nuevas, B y D) hojas con presencia de deformación (enchinamiento) en lámina foliar.....	33
<b>Figura 3.</b> Planta con presencia de síntomas de virus, para la comunidad de San Felipe de la Peña en genotipo criollo (A y B) y CHISER-522 (C y D) respectivamente. ....	34
<b>Figura 4.</b> Muestras de sintomatología de plantas infectadas con virus en la comunidad de Bethania, A y B) Muestras de material vegetativo evaluado, C y D) Síntomas presentes en plantas establecidas en campo. ....	35
<b>Figura 5.</b> Sintomatología presente en el cultivo de chile en la localidad de El carrizo en Isla, Veracruz. A y B) Lamina foliar atrofiada, presencia de enchinamiento, C y D) amarillamiento de la lámina foliar, así como presencia de moteado en lámina foliar.....	36
<b>Figura 6.</b> RNA total obtenido a partir de una planta sana (S) y de una planta con síntomas virales (V), visualizado en un gel de agarosa desnaturalizante al 1% en MOPS 1X.....	37
<b>Figura 7.</b> Producto de PCR obtenidos con las muestras de cDNA de plantas con síntomas de virus y sanas, visualizado en gel de agarosa al 1.5 % en TAE 1X, MP; Marcador de Peso; 1: Negativo; 2: planta infectada, 3: Planta sin infección;4: Planta infectada, .....	38
<b>Figura 8.</b> Productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos para virus de RNA tomando como molde cDNA de planta con síntomas de virus, visualizado en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, MP= Marcador de peso; N= Negativo; 1= PVY; 2= TSWV; 3= Tobamo; 4= CMV .....	39

<b>Figura 9.</b> DNA genómico obtenido a partir de plantas con sintomatología de virus y sin presencia de síntomas obtenidas de plantas con sintomatología de virus y plantas sin presencia de síntomas., gel de agarosa al 1% en TAE 1X, MP: Marcador de peso 1Kb Plus DNA ladder. ....	40
<b>Figura 10.</b> DNA genómico obtenido de plantas sanas y con síntomas virales, colectadas en distintas comunidades. Gel de agarosa al 1%.....	41
<b>Figura 11.</b> Producto de PCR obtenidos con oligonucleótidos para virus de DNA para planta con sintomatología de virosis, visualizado en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X., MP= Marcador de peso; N= negativo; 1: Primer PHYW; 2= Primer PepGMV; 3= Primer TYLCV .....	42
<b>Figura 12.</b> Productos de PCR obtenidos a partir de DNA de las plantas colectadas en las comunidades del municipio de Loma Bonita para PepGMV. MP=Marcador de Peso; P1-P3=Loma Bonita; P4-P6=San Benito; Ctrl+=Control positivo; Ctrl-= Control negativo (Plantas sin signos de infección); NTC= Negativo para oligonucleótidos. ....	43
<b>Figura 13.</b> Productos de PCR obtenidos a partir de DNA de plantas colectadas en las comunidades del municipio de José Azueta e Isla para genotipos de chile soledad mejorado y criollo. MP=Marcador de peso; P1-P3=José Azueta (mejorado) P4-P6= El carrizo, municipio de Isla (criollo), Ctrl+= Control positivo, Ctrl-= control negativo (Plantas sin signos de infección), NTC=control negativo para oligonucleótidos.....	44
<b>Figura 14.</b> Productos de PCR obtenidos a partir de DNA de plantas colectadas en las comunidades del municipio de Tuxtepec. MP: Marcador de peso; P1-P3=San Felipe (criollo), P4-P6=San Felipe (mejorado), P7-P9=Lázaro Cárdenas, P10-P12= Bethania (criollo) Ctrl+=Control positivo, Ctrl-= Control negativo, NTC= control negativo para oligonucleótidos. ....	45

<b>Figura 15.</b> Productos de PCR, donde se obtuvo un control positivo para el patógeno que provoca el virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV) visualizado en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, MP: Marcador de peso 1kb plus DNA ladder. ....	46
<b>Figura 16.</b> Productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico obtenido de plantas colectadas en los municipios de José Azueta e Isla, análisis para PHYVV, MP=Marcador de peso; P1-P3=José Azueta (criollo), P4-P6= El carrizo. Isla (criollo), Ctrl+ = Control positivo, Ctrl- = Control negativo, NTC = Negativo para oligonucleótidos. ....	47
<b>Figura 17.</b> Productos de PCR amplificados a partir de muestras de DNA obtenidas de plantas de las localidades pertenecientes al municipio de Tuxtepec. Donde MP= Marcador de Peso, P1-P3= Muestras de San Felipe (criollo), P4-P6; San Felipe (mejorado), P7-P9; Lázaro Cárdenas, P10-P12; Bethania, Ctr+= Control positivo; Ctrl-=Control negativo (Plantas sin signos de infección), NTC=control negativo paraoligonucleótidos. ....	48
<b>Figura 18.</b> Muestras positivas para TYLCV en las localidades de San Benito, Bethania y San Felipe de la Peña, para genotipos criollos. MP=Marcador de peso; N= Negativo; Pozo 1= Muestra San Benito; Pozo 2-3= Bethania; 4-6= San Felipe de la Peña. ....	49
<b>Figura 19.</b> Árbol filogenético correspondientes a la región del segmento ADN-A depositadas en el NCBI para el virus PepGMV. ....	52
<b>Figura 20.</b> Árbol filogenético con secuencias de la proteína rep del NCBI para el virus PHYVV. ....	53
<b>Figura 21</b> Muestras recolectadas de chile habanero A Y B) plantas del municipio de Isla, comunidad el carrizo, habanero Rey Pakal C y D) plantas de habanero Variedad Jaguar, del municipio de José Azueta. ....	55
<b>Figura 22.</b> Productos de PCR para posibles hospederos del virus del mosaico dorado del chile. MP= Marcado de peso; NTC= Control negativo para	

oligonucleótidos; P1= chile habanero (Jaguar), P2= chile habanero (Rey Pakal); P3=Chile chilpaya; P4= Hierba mora; Ctrl+= Control positivo; Ctrl-=Control negativo (Planta sin signos de infección) .....56

**Figura 23.** Planta de hierba mora, localizada en un cultivo de chile soledad, A) Planta de chile soledad y B) planta de hierba mora, recolectada para análisis con técnica de PCR.....57

**Figura 24.** Productos de PCR para detección de virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV). Mp= Marcador de peso; P1=Hierba Mora, P2= Chile chilpaya; P3= Habanero Jaguar; P4= Habanero Rey Pakal; Ctrl+=Control Positivo; Ctrl+= Control negativo; NTC= control Negativo para oligonucleótidos.....58

## RESUMEN

El chile soledad, es un cultivo regional, se produce principalmente en dos estados de la república, Oaxaca y Veracruz. Es una de las fuentes de ingreso y de empleo de los pequeños productores, sin embargo, la producción de éste se ve limitado por la presencia de agentes patógenos como lo son la presencia de plagas y enfermedades, que afectan notablemente la producción y los rendimientos del cultivo. Aunado a ello el manejo adecuado de estos patógenos es en su mayoría nulo, además de la falta de conocimiento de los agentes causales de enfermedades, principalmente virales que son las causantes de los bajos rendimientos y calidad en los frutos. El desconocimiento de la identidad de los agentes virales, limita el manejo adecuado para prevenir y en gran parte para reducir la propagación de los virus en los campos productivos. Con el fin de conocer los agentes causales de estas enfermedades, se empleó la técnica de PCR, se realizó un muestreo en cuatro municipios pertenecientes a la región del Papaloapan, en donde se cultiva chile soledad, donde se detectó la presencia de dos agentes virales que forman parte del género begomovirus, infectando cultivos de chile soledad (*Capsicum annuum* L) en genotipos criollos y mejorados (CHISER-522). Se presentaron infecciones simples para PepGMV el cual presentó mayor distribución en la zona (66.6%), detectada en los cuatro municipios. Por otra parte, la detección de PHYVV se presentó solo en infecciones mixtas con una incidencia del 34.4 % en dos municipios José Azueta y Tuxtepec. Se detectó como hospederos temporales al chile habanero (*Capsicum chinense* Jaq.), chile chilpaya (*C. annuum var. glabriusculum* L.), hierba mora (*Solanum nigrum* L.) para PepGM, en los cuatro municipios. Para el PHYVV se obtuvo como hospedero el cultivo de chile habanero, aunque solo fue en el municipio de Isla, estado de Veracruz. Los resultados del presente trabajo ayudaran en la elaboración de estrategias de manejo fitosanitario, de igual manera en el conocimiento de la distribución que tienen estos patógenos en la producción de chile soledad.

**Palabras clave:** chile soledad, virus, PCR, filogenia, hospederos

## ABSTRACT

Chili soledad is a regional crop produced mainly in two states of the Republic, Oaxaca and Veracruz. It is one of the sources of income and employment for small producers; however, its production is limited by the presence of pathogens such as pests and diseases, which significantly affect production and yields. In addition, the adequate management of these pathogens is mostly null, besides the lack of knowledge of the causal agents of diseases, mainly viral, which are the cause of low yields and fruit quality. The lack of knowledge of the identity of the viral agents limits the adequate management to prevent and, to a great extent, to reduce the spread of viruses in the productive fields. In order to know the causative agents of these diseases, the PCR technique was used, a sampling was carried out in four municipalities belonging to the region of Papaloapan, where soledad chili is grown, where the presence of two viral agents belonging to the genus Begomovirus was detected, infecting soledad chili (*Capsicum annuum* L.) crops of criollo and improved genotypes (CHISER-522). There were isolated infections for PepGMV, which showed the greatest distribution in the area (66.6%), detected in the four municipalities. On the other hand, PHYVV was detected only in mixed infections with an incidence of 34.4% in two municipalities, José Azueta and Tuxtepec. Habanero chil (*Capsicum chinense* Jaq.), chilpaya chili (*C. annuum* var. *glabriusculum* L.) and blackberry (*Solanum nigrum* L.) were detected as temporary hosts of PepGM in the four municipalities. For PHYVV, the habanero pepper crop was obtained as a host, although only in the municipality of Isla, state of Veracruz. The results of this work will help in the development of phytosanitary management strategies, as well as in the knowledge of the distribution of these pathogens in the production of chili soledad.

**Key words:** chile soledad, virus, PCR, phylogeny, hosts

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de chile (*Capsicum* spp.) es uno de los más importantes en México. Esto es debido a su valor de producción, la diversidad de climas y tipo de suelos a los que se puede adaptar (Aguirre-Mancilla *et al.*, 2017). Además, nuestro país cuenta con una gran cantidad de variedades de chiles y especies de *Capsicum*, que se encuentran ampliamente distribuidos en toda la república, principalmente de *Capsicum annuum*, lo que lo hace importante dentro del ámbito de mejoramiento genético. Por sus propiedades químicas también retoma importancia en cuestiones de salud, además de la alta demanda de mano de obra, su consumo puede ser en fresco o seco dependiendo de la variedad (Aguirre y Muñoz, 2015; Aguirre-Mancilla *et al.*, 2017; Hernández-Pérez *et al.*, 2020).

Tan solo en el año 2023, México se posicionó como líder de producción de chile, colocándose entre el segundo y cuarto lugar a nivel mundial, con exportaciones a 47 países, siendo Estados Unidos el mayor demandante (SADER, 2024).

Los requerimientos para los cultivos son variables de acuerdo con la zona o la región en la que se cultivan, sin embargo, la tecnología, así como la innovación en el campo ha permitido que muchos productores ofrezcan productos con estándares muy altos de calidad (SIAP, 2010).

La importancia del chile a nivel nacional no deja de lado la problemática principal a la que se enfrenta la mayor parte de los productores y es a la cuestión de las plagas y enfermedades que atacan a este cultivo, ocasionando pérdidas en la producción (Robles-Hernández *et al.*, 2019). Así como en la calidad de los frutos que ofrecen al mercado. En la región del Papaloapan en el estado de Oaxaca, el cultivo de chile soledad se produce bajo condiciones de temporal, lo que hace más difícil la situación de su producción. Aunado a esto los productores de la región no cuentan con la asesoría suficiente para poder contrarrestar estos problemas fitosanitarios, principalmente los relacionados con enfermedades causadas por virus.

Muchos de los virus que afectan al cultivo de chile pueden causar síntomas similares, además de que no solo se puede asociar un agente causal, ya que en ocasiones estos pueden mezclarse y ser un conjunto de agentes en una misma

planta conformando infecciones mixtas (Morales-Aguilar *et al.*, 2019). Esto hace aún más difícil determinar el agente causal de la enfermedad. Además, la presencia de estos en los cultivos genera pérdidas económicas a los productores, debido a que ocasionan una baja en los rendimientos de las plantas, así como frutos de mala calidad (Robles-Hernández *et al.*, 2010,).

Gran parte de los síntomas que ocasionan los virus son problemas como: enanismo, enchinamiento de las hojas, frutos pequeños asociados a la falta de desarrollo de la planta, y en ocasiones estos síntomas pueden confundirse con algunas deficiencias por nutrientes, como clorosis y deformaciones en las hojas (SAGARPA, 2008; Velásquez-Valle *et al.*, 2012; Velásquez-Valle y Amador-Ramírez, 2014).

Por lo anterior es de importancia que se identifiquen los agentes causales de los virus que afectan al chile soledad en la región. En trabajos previos se ha logrado la identificación de los principales agentes causales que afectan a otras variedades de chile como: serrano, jalapeño, morrón y habanero, mediante distintas técnicas (Robles-Hernández *et al.*, 2010). Dentro de las técnicas más usadas para la detección de dichos agentes se encuentran la asociación de los síntomas con los agentes virales, pruebas fisiológicas, pruebas serológicas y de análisis de ácidos nucleicos (González-Garza, 2017). Sin embargo, las pruebas que se realizan más por su confiabilidad, así como su eficiencia son la prueba ELISA, otras son RT-PCR Y PCR-MULTIPLEX las cuales son de biología molecular (Robles-Hernández *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue identificar los agentes causales que provocan enfermedades virales en el cultivo de chile soledad en la región del Papaloapan, principalmente en Loma bonita, San Benito El Encinal perteneciente al municipio de Loma Bonita, así como comunidades de Tuxtepec, José Azueta y Cd. Isla, empleando para esto la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) detectando de esta manera los virus presentes en la región, así como los posibles hospederos del virus.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1. Agricultura a campo abierto**

La agricultura a campo o cielo abierto es una de las actividades más desarrolladas. Antes de la llegada de la tecnología al campo mexicano, esta actividad ya era implementada por muchos agricultores y lleva años practicándose en el resto del mundo (Enciso, 2011)

La mayor parte de la agricultura que se establece en condiciones de campo abierto está limitada a las condiciones climáticas, cerca de 2 500 millones de personas dependen de la agricultura (FAO, 2018). La producción en estas condiciones se vuelve más vulnerable esto porque al igual que el cambio de clima están expuesto a mayor cantidad de plagas y enfermedades, que son el mayor problema al que se enfrentan los productores (Cih- Dzul *et al.*, 2011).

Los constantes cambios en el medio ambiente, derivado del cambio climático a nivel mundial ha tenido un gran impacto en la agricultura en México, debido a la vulnerabilidad que tiene ante los cambios extremos en el clima, por las condiciones en que se desarrolla, tanto de riego como temporal (SAGARPA, 2012). Las constantes sequias, así como las heladas e inundaciones que se presentan de manera espontánea han perjudicado notablemente en la producción del campo (FAO, 2018).

### **2.2. Producción de Chile en México.**

En México, el cultivo de chile (*Capsicum* spp.), tiene una alta productividad en el país, esto debido a que forma parte de la dieta de los mexicanos, además de contar con una gran variedad genética, lo que hace posible que se pueda cultivar en diferentes zonas del país (SIAP, 2010).

Esta hortaliza, no solo se consume en verde, también en seco, ya que forma parte de la gastronomía, junto con la calabaza, el maíz y el frijol, dentro de los cultivos producidos a nivel nacional, sin duda es el más importante. México cuenta con la mayor cantidad de variedades; se produce en los 32 estados (Aguirre y Muñoz, 2015), la amplia variedad de chiles criollos pertenece mayormente al género *Capsicum* esta a su vez es dividida en especies, sub-especies, *C. annuum* es la más cultivada seguido de *C. pubescens* y *C. chinense* (Hernández-Pérez *et*

*al.*,2020). Dentro del género *C. annuum* L., entre las variedades más cultivadas se encuentran: serrano, jalapeño, poblano, guajillo, por mencionar algunos (Hernández-Hernández *et al.*, 2022).

La producción de este cultivo está dividida en tres regiones, la norte-noreste con una alta tecnología su producción es enfocada al consumo en fresco, así como destinado a la industria por tener los canales de comercialización más cercanos, la región centro-bajío enfocada principalmente a mercado de chiles secos, cuenta con una tecnología media, por su parte la región sur-sureste con tecnología baja, sus mercados son locales o nacionales además de ser cultivos de temporal, lo que se manifiesta en rendimientos más bajos comparado con los más tecnificados (Encalada *et al.*, 2014).

Dentro de los principales estados productores se encuentran: Chihuahua, Sinaloa, Sonora, Zacatecas, Jalisco, que aportan 69 % de la producción nacional, para 2023 a nivel nacional se sembró un total de 173 869 ha, con una producción de 3 681 061 t y un rendimiento de 21.26 t ha<sup>-1</sup> de chile verde, incluyendo condiciones de riego y temporal. En el ámbito de exportación, la producción destinada a este sector fue de 271. 084 t (SIAP, 2024).

### **2.3. Importancia del cultivo de chile.**

A nivel nacional el consumo de chile es alto, y su presencia en el consumo diario, el chile es importante por el valor de producción que tiene, tan solo en el 2023 el consumo per cápita de chile fue de 15.2 kilogramos, del 2013 al 2022 hubo una tasa de crecimiento de 3.3 por ciento, su aporte en la producción nacional de hortalizas es de 19.4 por ciento (SADER, 2024).

La importancia de este cultivo también radica en la gran cantidad de empleos que genera en su ciclo productivo, así como los ingresos que estos generan a los productores por su alto precio. El cultivo es también apreciado por su alta diversidad genética, su alta adaptabilidad a diferentes tipos de suelos y climas, ya que se cultiva en zonas templadas como en zonas cálidas (Ascencio, 2013; Aguirre-Mancilla *et al.*, 2017).

Sin embargo, los constantes cambios en el medio ambiente también han generado, el surgimiento de nuevas plagas, así como la susceptibilidad y las condiciones propicias para diferentes enfermedades causadas por distintos vectores.

#### **2.4. Producción de chile soledad.**

El Chile soledad (*Capsicum annuum* L.) es un cultivo que se produce en dos estados de la república, Veracruz es el principal productor con una superficie sembrada de 1 389 ha y Oaxaca con 358 ha. El chile soledad en el estado de Veracruz se maneja en modalidad de riego y temporal, con 4.36 ha con rendimiento de 5.10 t ha<sup>-1</sup> así como 1385 ha con rendimiento de 9.49 t ha<sup>-1</sup> respectivamente (SIAP, 2024). En la región del Papaloapan, el cultivo de esta hortaliza se lleva a cabo en temporal, esta región abarca dos principales distritos, Choapam y Tuxtepec conformado por 20 municipios (Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para desarrollo de Oaxaca (COPLADE), 2017) en este último distrito se encuentran las localidades dedicadas al cultivo de chile soledad.

En Loma Bonita la superficie sembrada es de 53 ha con una producción de 425 t, con rendimientos de 8.03 t ha<sup>-1</sup>, mientras que el municipio de Tuxtepec cuenta con una superficie sembrada de 98 ha, una producción de 680 ton y un rendimiento 6.94 t ha<sup>-1</sup>. Dentro de los municipios pertenecientes al estado de Veracruz, se encuentra Isla con una superficie sembrada de 233 ha, una producción de 2050 t y rendimiento de 8.80 t ha<sup>-1</sup>, así como José Azueta con una producción de 1771 t con rendimiento de 8.56 t ha<sup>-1</sup> con una superficie sembrada de 207 hectáreas las cuales son en condiciones de temporal (SIAP, 2024).

La región del Papaloapan es una de las regiones que aporta un mayor valor de producción a nivel estatal, de acuerdo con COPLADE, (2017) aporta cerca del 31 %, ocupando el primer lugar dentro de las ocho regiones, convirtiéndola en la más importantes en cuestión de producción.

### **2.4.1. Generalidades del chile (*Capsicum annuum* L.)**

El chile pertenece a la familia de las solanáceas, es una hortaliza que proviene de plantas con tallos erectos, ramificados y herbáceos de coloración verde intenso, presenta una raíz principal pivotante lo que le permite una exploración en los suelos de 0.70 a 1.20 metros, sus raíces secundarias pueden llegar a expandirse hasta 1.20 m en condiciones óptimas llegan alcanzar una altura promedio de 80 cm (SIAP, 2010; SAGARPA, 2017).

### **2.4.2. Condiciones edafoclimáticas**

Esta hortaliza, requiere de climas cálidos para su óptimo desarrollo, para chiles serranos las temperaturas para crecer y desarrollo de frutos oscila de 16 a 32 °C, en chiles anchos son de climas mayormente templados por lo cual los intervalos de temperaturas van de 12 a 32 °C, algunos cultivares pueden desarrollarse en alturas de 1500 hasta los 2500 m.s.n.m. (SAGARPA 2017).

En cuanto a los suelos en donde prospera el cultivo de chiles, se adapta a un sinfín de tipos de suelo, sin embargo, los suelos de textura media con buenas condiciones de drenaje, como franco arenoso, franco limoso o franco arcilloso y con altos contenidos de materia orgánica favorecen su óptimo desarrollo (SIAP,2010; SAGARPA,2017).

### **2.4.3. Plagas y enfermedades del chile**

La producción de chile, sobre todo la que se desarrolla en condiciones de campo abierto es susceptible a presentar algunas plagas, así como diferentes enfermedades, las cuales generan un daño en el cultivo, provocando pérdidas económicas, así como baja productividad de este.

Dentro de las plagas que atacan al cultivo de chile las de mayor importancia son, la mosca blanca (*Bemisa tabaci*), picudo de chile (*Anthonomus eugenni*), minador de la hoja (*Liriomyza* spp.), acaro blanco (*Polyphagotarsonemus latus*), esto debido al impacto económico que causan en la producción por los daños ocasionados en el cultivo (Garza, 2002).

El cultivo es afectado por otros agentes patógenos, que causan enfermedades en la planta, dentro de las que se encuentran *Phytophthora*, y *Alternaria*, se presentan cuando las condiciones de humedad y temperatura son propicias para su crecimiento, otros agentes causales de enfermedades son bacterias y agentes virales (Chew *et al.*, 2008).

Algunas plagas que afectan el cultivo de chile pueden ser vectores de algún tipo de virus o en ocasiones de algún otro tipo de enfermedad. Aproximadamente el 75% de los virus de las plantas se transmiten por insectos (Gilbertson *et al.*, 2015). Las enfermedades transmitidas por algún insecto son de los más importantes, debido a que está relacionado como un factor incidente en el rendimiento y en la viabilidad del cultivo (Rodríguez y Carbonell, 2012).

#### **2.4.4. Virus fitopatógenos de chile**

El chile es susceptible a presentar daños causados por agentes bióticos y abióticos, estos pueden causar problemas en cualquier etapa de desarrollo en la que se encuentre el cultivo. Los problemas causados por agentes bióticos son hongos, bacterias, nematodos y virus (SAGARPA, 2008). Estos reducen la población de las plantas, algunos de estos patógenos son capaces de sobrevivir en el suelo, sin necesidad de estar en la planta (Velásquez-Valle *et al.*, 2013).

Los problemas causados por virus generan una serie de daños al cultivo, además de provocar pérdidas en los rendimientos y sobre todo en la calidad de los frutos, esto por los síntomas que causa en la planta (Robles-Hernández *et al.*, 2010; Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

Existen una gran diversidad de virus, de 697 especies de virus los insectos transmiten el 76 %, ya que sus partículas solo pueden ser activadas y replicadas en células vivas (Gergerich y Dolja, 2006; Hogenhout *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013).

La planta reduce su susceptibilidad a la transmisión o replicación del virus, una vez que ha sido infectada, si una planta es afectada por un vector u otro insecto activa sus vías de señalización haciéndola más susceptible (Li *et al.*, 2017).

#### 2.4.5. Principales virus en el cultivo de chile

En México el cultivo de chile está expuesto a una serie de enfermedades virales, estas son enfermedades de importancia, esto debido a los daños que causa a las plantas, afectando de esta manera el rendimiento del cultivo (Robles-Hernández *et al.*, 2010). El cultivo de chile es altamente susceptible a muchos de los virus de ARN y ADN, la planta de chile presenta en ocasiones múltiples infecciones de diversos virus (Jo *et al.* 2017). Las virosis en México abarcan más de 16 especies de virus fitopatógenos, 12 de ellos son virus de ARN y cuatro virus de ADN, la presencia de estos virus varía de acuerdo con la zona en la que se encuentre el cultivo (Robles-Hernández *et al.*, 2019).

La importancia radica en sus hospedantes, así como la manera en que se transmiten, los cuales suelen ser de diferentes maneras. Al ser un parasito obligado, requiere de un hospedante para poder sobrevivir en el medio. Se propagan por medio de semilla o polen, la participación del hombre también interfiere con la propagación mecánica, por este medio suelen dispersarse los virus más infecciosos algunos como Carmovirus, Potexvirus, Tobamovirus, Tombosvirus, y la intervención de algunos insectos vectores (García *et al.*, 2016; Barahona Pimentel, 2019).

Dentro de los virus reportados para el cultivo de chile se encuentran las siguientes familias: Los Potyviridae, en los cuales se puede encontrar el virus jaspeado del tabaco (TEV), Y de la papa (PVY), virus del moteado del chile (PepMoV). La familia Bromoviridae, la cual incluye el virus del mosaico de pepino (CMV) y el virus del mosaico de la alfalfa (AMV). Bunyviridae en esta familia se encuentra el virus de la marchitez manchada del jitomate (TSWV) y virus mancha necrótica del impaciente (INSV) y la última familia es la de Comoviridae, en ella se incluye los virus de la mancha anular del tabaco (TRSV) y la mancha anular del tomate (ToRSV), (SAGARPA, 2008; Robles-Hernández *et al.* 2010; Velásquez-Valle *et al.*, 2013). Para los virus del mosaico del tabaco (TMV), el virus moteado atenuado del chile (PMMoV), el virus del achaparramiento arbustivo del tomate (PBSV) y el virus de cascabel del tabaco (TbRV), solo se han descrito a nivel de géneros TMV y PMMoV pertenecen al género Tobamovirus mientras que TBSV al género Tombusvirus y TbRV al Tobravirus. (Robles-Hernández *et al.* 2010; Hernández-Espinal *et al.*, 2018).

En México la presencia de TBSV en Chile fue reportado en el Estado de Chihuahua (Robles-Hernández *et al.* 2019).

La familia de virus con mayor diversidad es la Geminiviridae, dentro de esta familia se encuentra el virus huasteco del Chile (PHYVV) junto con el virus del mosaico dorado del Chile (PepGMV) y virus moderado y severo de las puntas rizadas del betabel (BMCTV, BSCTV). Otra enfermedad ocasionada por un complejo de agentes causales como CMV, PepMoV, TSWV, TEV, TMV y AMV, es la enfermedad dorada del fruto (Velásquez-Valle *et al.*, 2013).

#### **2.4.6. Generalidades de la Familia Geminiviridae**

La familia Geminiviridae desarrolló un mecanismo coevolutivo con mosca blanca (*Bemisia tabaci* Gennadius) que aseguran una transmisión eficiente, así como la supervivencia del virus, creando una interrelación en la cual el insecto-huésped no presenta efectos que le causen algún daño por ser portador del virus (Moreno-de la Fuente *et al.*, 2013). La diseminación se ve asegurada de alguna manera en los reservorios, de plantas silvestres que actúan como huésped alternativo, mientras llega un nuevo ciclo de cultivo y se lleve a cabo la diseminación (de la Osa *et al.*, 2015). Su transmisión no se da por medio de semilla, pero sí puede ocurrir de manera mecánica o por injerto, en caso de no ser por medio de *B. tabaci* (Inoue-Nagata *et al.*, 2016).

Gran parte de estos virus tienen una mayor incidencia en plantas dicotiledóneas, como lo son las solanáceas, en climas tropicales y subtropicales, pueden causar daños de hasta un 20 %, además de ser una de las mayores limitantes en la producción de hortalizas (Inoue-Nagata *et al.*, 2016; Hernández-Espinal *et al.*, 2018).

#### **2.4.7. Clasificación de los virus de acuerdo con su comportamiento.**

Gran parte de los virus que causan algún daño a los cultivos de solanáceas, tienden a tener diferente comportamiento de acuerdo con el vector que lo transmite. Existen diferentes modos de transmisión de los virus, que son determinados por las

características de la transmisión, así como la afinidad que tiene por cierto tejido de la planta, lo que favorece la proliferación del virus (Zhou *et al.*, 2018).

La transmisión solía clasificarse en persistente y no persistente (Hogenhout *et al.*, 2008). Sin embargo, se han investigado otras formas de transmisión, como son persistente no circulativa, persistente circulativa, circulativo- propagativo, así como no persistente o semipersistente no circulativa (Ng y Falk, 2006; Zhou *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2021).

#### **2.4.7.1. Virus persistentes**

Los virus considerados como persistentes involucran el tracto digestivo de su vector, los virus son patógenos que requieren de células vivas para poder diseminarse, es por ello que al momento de ingresar al vector se replican, estos virus se mantienen en el tracto digestivo de los insectos o desplazarse a las células salivales, provoca que exista una mayor diseminación, debido a que un solo vector (insecto) puede infectar a más de una planta (Shi *et al.*, 2021). Como parte de los virus persistentes se encuentra los de la familia Geminiviridae, los cuales son transmitidos principalmente por *Bemisia tabaci* , considerado un insecto que presenta la transmisión más efectiva (Luan *et al.*, 2013).

Los virus con transmisión circulativos no propagativo tienden a presentar movimiento por el floema y se adquieren y se liberan en el floema después de largas horas o días. Es retenido por períodos largos incluso durante toda la vida del vector se transfieren a la progenie del vector y deben de circular por su vector antes de inocular a su nuevo huésped (Hogenhout *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2018). Sin embargo, será la relación que exista entre el vector-virus-huésped, quien determina que tan exitosa será la transmisión.

#### **2.4.7.2. Virus no persistentes**

Los virus que se transmiten de manera no persistentes son aquellos que se diseminan a través del estilete del insecto vector, es decir, las partículas virales se quedan retenidas en el aparato bucal (Ng y Falk, 2006; Shi *et al.*, 2021). Los insectos pueden inocular el virus en las plantas a menudo apenas en segundos y en

ocasiones minutos después de la adquisición y el insecto después de esto, ya no tiene el virus (Hogehout *et al.*, 2008).

El virus no persistente no circulativos, tienden a infectar todos los tipos de células y pueden adquirirse de una planta infectada y administrarse a una planta receptora luego de un período de acceso de adquisición corto y un período de acceso de inoculación corto, respectivamente. Se mantiene por periodos cortos y se pierde cuando el vector cambia o muda (Zhou *et al.*, 2018).

#### **2.4.8. Vectores asociados a la transmisión de virus**

Los mecanismos de transmisión cada vez son diferentes, debido a que el virus tiene una gran influencia en el huésped, variando así la respuesta del insecto vector, muchos modifican algunas características fenotípicas de la planta, siendo de esta manera más efectiva la transmisión, por los agentes vectores que son atraídos a las plantas (Mauck, 2016; Shi *et al.*, 2021).

Para la supervivencia de estos patógenos, la transmisión puede ser mecánicamente o de una planta infectada a otra mediante organismos vivos llamados vectores. Los cuales suelen ser nematodos, así como insectos, estos últimos son los diseminadores más importantes en la cuestión de virus en plantas, debido a que tienen una mayor capacidad de transmitir muchas especies de virus (Gergerich & Dolja, 2006).

La interacción que tiene el huésped con el virus-vector, se desarrolla mediante tres eventos importantes en el cual participan los tres organismos, el virus infecta al huésped en este caso a la planta, que, a su vez al introducirse un organismo extraño a su sistema, actúa mediante modificaciones en su metabolismo con el fin de contrarrestar el patógeno (Hogehout *et al.*, 2008; Moreno-De la fuente *et al.*, 2013). Li *et al.* (2017), menciona que los cambios realizados por la planta en su sistema metabólico ocasionan que esta sea más atrayente para insectos que son vectores eficientes del virus que contiene en su sistema, ayudando así a la diseminación e interacción con plantas sanas.

Gran parte de los vectores que están implicados en la diseminación de cierto grupo de virus, están relacionados a cierto grupo de familias de insectos. La participación

de estos vectores en la transmisión de virus es cerca del 76%, de los cuales el 55 % de insectos es del orden Hemiptera los cuales transmiten la mayor parte de virus (Hogenhout *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013). El orden Hemiptera presentan familias de importancia económica, como la familia Aphididae, en donde agrupa a los pulgones. Así como la familia Aleyrodidae, en la cual pertenece la mosca blanca. Dichas familias transmiten cerca de 325 especies de virus en las plantas, mientras que las dos especies de mosca blanca participan en la diseminación de 450 virus causales de enfermedades (Hogenhout *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2015). Estos insectos se alimentan del floema de las plantas.

Otro orden importante es Thysanoptera, los cuales también actúan como diseminadores y vectores de virus, a este orden pertenecen los trips. Estos insectos raspan y chupan la savia de las hojas, su aparato bucal modificado les permite alimentarse de la savia de las plantas (Ng y Falk, 2006; Stafford *et al.*, 2011). A pesar de que fungen como vectores, las transmisiones realizadas por estos no son tan eficientes para algunas familias de virus.

Algunos de los insectos son vectores eficientes de algunas familias de virus, lo que hace que su supervivencia sea segura y eficaz.

#### **2.4.9. Sintomatología**

Los síntomas que las plantas presentan pueden ser variados dependiendo del virus que se presente en el cultivo. Dentro de la sintomatología general, en el área foliar se puede observar distorsión de las hojas, además de presentar amarillamiento, algunas otras presentan un moteado moderado a severo estos pueden ser verdes o amarillos, algunas hojas suelen presentar un rayado, otras producen lesiones necrosas en las nervaduras, las yemas en ocasiones se tornan amarillas o necróticas (Robles-Hernández *et al.*, 2010; Velásquez-Valle *et al.*, 2012).

Las plantas presentan frutos deformes y presentan amarillamiento o se tornan de color verde pálido, reduciendo la calidad, en algunos se observan manchas oscuras hundidas, necrosis y maduración irregular; y se tornan roñosos con apariencia de tostado o quemado (SAGARPA, 2008; Velásquez-Valle *et al.*, 2013).

## **2.5. Identificación de agentes virales**

Existen una gran cantidad de pruebas que pueden ayudar a la detección de los agentes causales, algunas son la asociación de los síntomas presentes en la planta con el patógeno, sin embargo, no es de las más efectivas ya que mucho virus presenta sintomatologías similares (González-Garza, 2017). La detección puede ser por medio de serología, dentro de estas pruebas se puede encontrar la técnica de inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay) ó ELISA por sus siglas en inglés, mediante métodos moleculares se encuentra la técnica Segunda Generación de secuenciadores (NGS) así como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Robles-Hernández *et al.*, 2010: González-Garza, 2017).

### **2.5.1. Detección técnica ELISA**

La prueba serológica, ELISA se considera económica en el uso de los reactivos, además de ser de rápida adaptación a las mediciones, para la detección de virus fitopatógenos, es una técnica en donde es posible la detección de cantidades pequeñas de estos agentes (Robles-Hernández *et al.*, 2010: González-Garza, 2017). Su importancia radica en la sensibilidad mediante la detección de la presencia de patógenos importantes en especies o variedades de plantas de importancia comercial, permite la cuantificación desde un antígeno en solución, así como de un anticuerpo en una solución. Los métodos más aplicables de la técnica ELISA incluyen: ELISA en membrana, inmunoabsorbancia-microscopia o tiras reactivas (González-Garza, 2017) y ELISA en placa, en estas pruebas pueden estar las pruebas directas, indirectas o sándwich, también conocida como DAS-ELISA (Robles-Hernández *et al.*, 2010)

### **2.5.2. Detección por RT-PCR**

La detección de virus fitopatógenos mediante métodos moleculares incluye los realizados mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), esta técnica fue desarrollada por el Dr., Kary Mullis, consiste en la obtención de fragmentos de ADN, obteniendo una gran cantidad de copias a partir de dichos fragmentos (Robles-Hernández *et al.*, 2010: González-Garza, 2017). Para la replicación de las hebras

de ADN, se emplea la ADN polimerasa, este procedimiento consta de cuatro pasos; la desnaturalización, se lleva a cabo mediante el uso de temperaturas altas (94 o 95 °C) y esto permite que las hebras de ADN se separen, de esta manera dar paso al alineamiento, en esta etapa los oligos se unen en su cadena complementaria al ADN molde, el penúltimo paso del proceso consiste en la extensión de la cadena, en esta etapa el ADN polimerasa sintetiza la cadena complementaria, para finalmente terminar con la extensión final de la cadena (Robles-Hernández *et al.*, 2010). La PCR puede tener variantes dentro de las cuales destaca para la detección de virus en plantas, la RT-PCR así como la MULTIPLEX-PCR, esta última se puede utilizar para la detección de 2 o más virus en una misma reacción, la diferencia con el RT-PCR es la detección de virus con genoma ARN, y se tiene que retrotranscribir la hebra de ARN en ADN complementario con el uso de la enzima retrotranscriptasa o transcriptasa inversa (Gonzalez-Garza, 2017).

## **2.6. Método de electroforesis.**

El método de electroforesis tiene como principio la separación por tamaño de moléculas de ADN. Al poseer estas moléculas una carga negativa debido a que presentan un grupo fosfato dentro de su estructura (Pérez Cardona y Gómez Piñerez, 2018), al ser sometidas a un campo eléctrico, el ADN y RNA son moléculas que se moverán de negativo a positivo a través de un gel de agarosa, permitiendo que las moléculas de mayor tamaño se desplacen con más lentitud a través del gel mientras que las de un tamaño menor lo hagan más rápidamente (Fierro, 2014), se utiliza geles de agarosa, debido a que es un polímero, que tiene una influencia en la velocidad con la que se mueven las moléculas de DNA o RNA (Pérez Cardona y Gómez Piñerez, 2018). Determinando la pureza y concentración de RNA y ADN.

### 3. ANTECEDENTES

Algunos autores, han realizado, una serie de experimentos en donde se ha trabajado con la identificación de virus que afectan a variedades comerciales de chile en varias regiones productoras de este cultivo en México.

Robles-Hernández *et al.* (2010), realizaron un experimento en el cual evaluaron los virus presentes en el cultivo de chile, así como el análisis de las técnicas de detección de fitopatógenos. En donde se obtuvo que las técnicas o métodos con mayor precisión, confiables y sobre todo rápidos de obtener, son las técnicas de ELISA, así como de biología molecular RT-PCR y PCR-MULTIPLEX, esta última son las más validadas para la detección de virus a nivel serotipo.

Por su parte, Velásquez-Valle *et al.* (2012) utilizaron la técnica DAS-ELISA para detección de cinco virus en parcelas comerciales con dos cultivos de chile (Mirasol y ancho) en tres estados; Zacatecas, San Luis Potosí y Aguascalientes. Para la detección utilizaron antisueros, para el virus del mosaico del tabaco (Tobacco Mosaic Virus: TMV), Mosaico del pepino (Cucumber mosaic virus: CMV), Y de la papa (Potato virus Y: PVY), moteado del chile (Pepper mottle virus: PepMoV) y jaspeado del tabaco (Tobacco etch virus: TEV). En el estudio en Zacatecas, San Luis Potosí y Aguascalientes se detectó la presencia de TMV, CMV, PVY, PepMoV y TEV, independiente de qué tipo de chile se tratará. La frecuencia de detección en promedio de estos virus, las más altas fueron presentadas en Zacatecas y San Luis Potosí a excepción de PVY en donde la mayor incidencia la obtuvo en el estado de Aguascalientes, seguido de Zacatecas.

González-Franco *et al.* (2014), en un estudio en la zona norte y sur del estado de Chihuahua, mediante la técnica DAS-ELISA, utilizando anticuerpos específicos, obteniendo que la mayor incidencia y severidad en la zona norte fueron los virus RSV, TBSV, INSV, TEV, CMV, TMV PVY, TSWV y ToRSV, mientras que en la zona sur predominaron los CMV, TMV, AMV, TEV, TBSV, PMMoV, PVY Y PepMV. A si mismo reportaron un 78 % de infecciones mixtas en el norte del estado y 44% en la región sur, generando el primer reporte con 12 especies de virus e infecciones mixtas en el cultivo de chile en Chihuahua, registrándose por primera vez el virus del enanismo arbustivo del tomate (TBSV).

En 2016, Salem *et al.*, reportan la presencia de un nuevo virus que afecta el cultivo de jitomate en invernadero en Jordania, perteneciente al género de Tobamovirus, para su confirmación se realizó una RT-PCR con oligonucleótidos de los virus más comunes, de igual manera con un oligonucleótido genérico de Tobamovirus, así como pruebas DAS-ELISA. Como resultado de las pruebas en las RT-PCR solo se obtuvo un producto amplificado de un 400 pb, para la confirmación de la identidad del producto, se envió a secuenciación y al comparar en la base de datos se determinó la presencia de un nuevo Tobamovirus, el cual inocularon y aislaron para posteriormente darle el nombre de Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV).

Mediante el análisis de dos transcriptomas, Jo *et al.*, (2017) con ayuda de la bioinformática, realizaron el estudio de dos cultivares de pimiento los cuales presentaban susceptibilidad y resistencia a algunos virus. Como resultado del estudio transcriptómico reportó la presencia de 13 virus, revelando así virus que presentaban RNA y DNA de cadena sencilla, además de reportar la mutación y la existencia de cuasiespecies de los virus.

Hernández-Espinal *et al.* (2018), llevaron a cabo un estudio en las zonas productoras de chile en el estado de Sinaloa de 2013 a 2016, en donde se recolectó muestras para la detección de virus pertenecientes al género de Begomovirus, mediante pruebas de PCR, obteniendo como resultado 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). Los virus PHYVV y PepGMV se detectaron en los genotipos Serrano, Jalapeño, Ancho (Poblano), Anaheim, Morrón y Cayenne. Mientras que el virus TYLCV solo se identificó el 5.8 % en cultivo de Serrano, Jalapeño, Morrón y Ancho, la incidencia fue baja con respecto a las de PHYVV y PepGMV.

De igual manera Vaca-Vaca *et al.*, (2019), realizaron una investigación y reportaron el primer caso de Begonovirus en Colombia infectando cultivo de ají, realizando pruebas mediante técnicas de PCR. Los resultados fueron comparados con la base de datos y derivado de ello se determinó que podría tratarse de una nueva especie de Begonovirus.

Recientemente Cambrón-Crisantos *et al.*, (2019) reportaron por primera vez la presencia de Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV), asociados a cultivo de jitomate y chile en México, para determinar la presencia del virus realizaron una RT-PCR con oligonucleótidos que amplificaban un segmento del genoma del virus, utilizando tejido foliar de jitomate y chile colectadas en dos municipios de Michoacán.

De igual manera Rodríguez-Mendoza *et al.*, (2019) mediante muestras pertenecientes al estado de Michoacán, diseñaron un oligonucleótido que permite identificar de manera específica, la presencia de ToBRFV. Para ello realizaron una RT-PCR, para diseñar los oligonucleótidos se consideró los genomas completos de las especies más representativas del género Tobamovirus. Para la estandarización de la técnica se utilizó un control positivo de plantas enfermas, recolectadas en Michoacán una vez diseñados los oligos específicos se probaron, obteniendo como resultado un producto de 475 pb.

Choi *et al.* (2020) mediante un estudio en regiones de Vietnam realizaron la detección de virus y viroides, llevaron a cabo una secuenciación de RNA de plantas de tomate y chile y posteriormente el diseño y prueba de oligos mediante PCR. Así lograron detectar 13 virus y 2 viroides en tomate, mientras que en chile se detectó 12 virus y 2 viroides, con estos resultados elaboraron bibliotecas de los virus de acuerdo con la región en donde se encontraron.

Nemes y Salánki (2020), realizaron un ensayo de RT-PCR MULTIPLEX para detección simultanea de virus en cultivo de chile, como resultado se hizo identificación de cinco virus; CMV, PMMoV, PVY, TMV y TSWV. Los oligos

utilizados fueron diseñados en base a las secuencias de diferentes cepas reportadas en regiones geográficas diferentes. Con ellos se comprobó que la RT-PCR Multiplex es una herramienta eficiente para la detección simultánea de virus.

García-Medrano *et al.*, 2022 llevaron a cabo un muestreo en los estados de Yucatán y Campeche evaluando cultivos de *Capsicum chinense*, variedades locales de *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. annuum var. aviculare*, así como algunas malezas, para la detección de Begonovirus mediante técnica de PCR. En sus resultados encontraron que 90 % de las plantas muestreadas fueron positivas para Begonovirus, identificando parcialmente PepGMV, el PHYVV, el virus del enrollamiento severo de la hoja del tomate (ToSLCV), el TYLCV y el virus del mosaico de Euphorbia-[Península de Yucatán] EuMV-YP. Donde predominó como una infección simple PepGMV (82.5%), mientras se presentaron infecciones mixtas de PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV y PepGMV-ToSLCV en otras especies.

#### **4. HIPÓTESIS**

La presencia de virus fitopatógenos en el cultivo de chile soledad en la zona de estudio, es muy diversa en relación con los virus fitopatógenos que atacan a otras especies de chiles cultivados en México.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1. Objetivo General**

Identificar los virus presentes en el cultivo de chile soledad en zonas productoras de la región de la cuenca del Papaloapan.

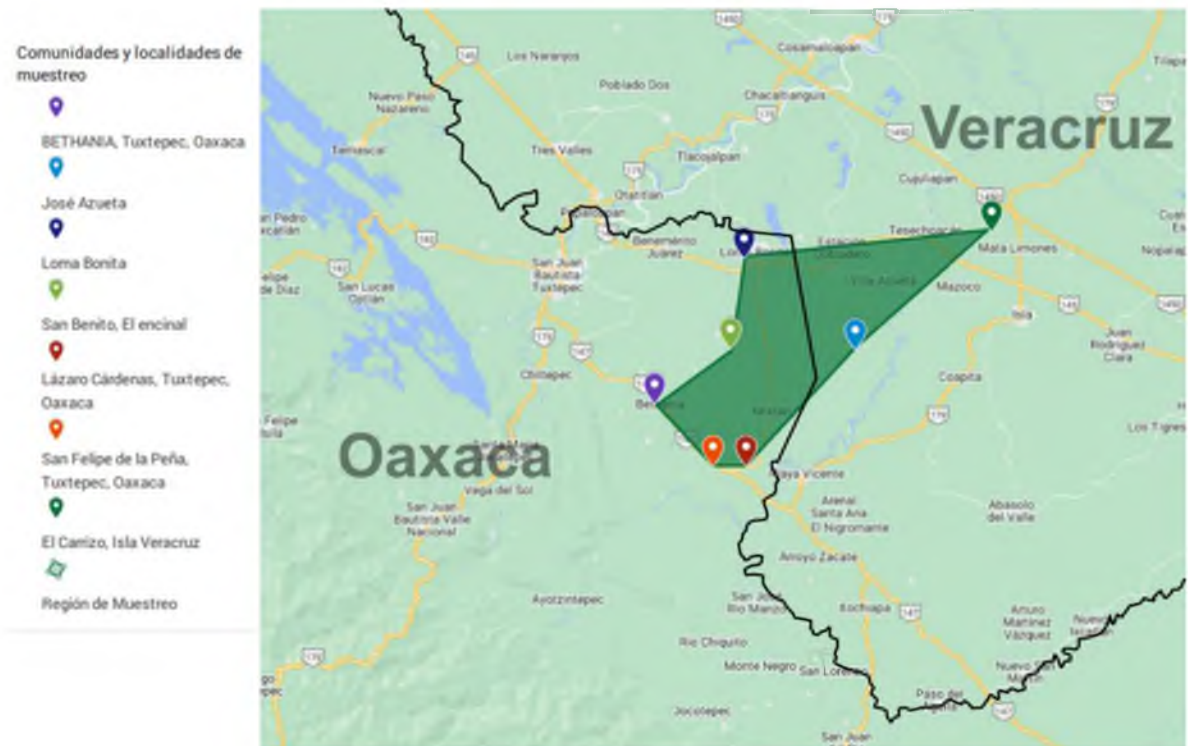
##### **5.2. Objetivos Específicos**

- Identificar y muestrear las localidades productoras de diferentes genotipos de chile soledad
- Emplear oligonucleótidos reportados en la literatura, para la detección de virus fitopatógenos en el cultivo de chile.
- Construir árbol filogenético con base a los virus detectados mediante técnica de PCR.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Localización

La presente investigación se desarrolló en la región del Papaloapan, en donde se llevó a cabo la recolección de material vegetativo en comunidades pertenecientes a cuatro municipios de la región, Loma Bonita, Tuxtepec, José Azueta y Cd. Isla, pertenecientes a los Estados de Oaxaca y Veracruz, en donde se produce chile soledad (Figura 1). El clima característico de la región es cálido húmedo, la temperatura de esta zona oscila entre los 20.5 y 29.4 °C, como temperatura mínima y máxima promedio, presentando una precipitación anual estimada de 1,902.3 mm.



**Figura 1.** Localización de las comunidades y localidades de muestreo de los estados de Oaxaca y Veracruz.

## **6.2. Material Experimental**

Para la realización de los análisis correspondientes, fueron analizadas muestras de chile soledad, de dos genotipos diferentes; criollo y CHISER-522 (genotipo mejorado perteneciente al INIFAP).

## **6.3. Toma de Muestras Experimentales**

Los muestreos se llevaron a cabo en siete comunidades distintas de los principales municipios dedicados al cultivo de chile soledad. Para cada comunidad se recolectaron tres muestras por parcela del cultivo de chile en etapa de producción (Tabla 1). Se seleccionó las plantas con síntomas característicos de virus.

Las muestras para análisis molecular en el laboratorio deben ser con tejido vegetal vivo, por ello se realizó una selección de plantas con sintomatología característica de presencia de virus. En este caso plantas que presentaron hojas enchinadas, con moteados además de ser plantas con menor tamaño en comparación con el resto del cultivo, las colectas fueron tomadas del centro de la parcela.

El material vegetativo colectado fue colocado en bolsas Ziploc® que contenía algodón con agua, con el fin de mantener la muestra fresca y de esta manera evitar la activación de enzimas que pudieran dañar la estructura de ADN y RNA de la planta, al someterse a algún tipo de estrés en el momento de su transporte al laboratorio de Biotecnología Vegetal en el Instituto de Investigación de Universidad del Papaloapan, campus Tuxtepec, donde se almacenaron en un ultracongelador (-80°C).

**Tabla 1** Localización geográfica de los sitios de recolección de material vegetativo de plantas de chile soledad (*Capsicum annuum* L.) con síntomas de presencia de virus.

<b>Localidad</b>	<b>Municipio</b>	<b>Coordenadas geográficas</b>	<b>Fecha de Colecta</b>	<b>Genotipo</b>
Loma Bonita	Loma Bonita	Latitud: 18°05' 55.1" Longitud: 95°53'48.9"	22/09/2022	Chile soledad (CHISER-522)
San Benito, el encinal	Loma Bonita	Latitud: 17° 50' 49" Longitud: 95° 57' 25.2"	20/10/2022	Chile soledad (Criollo)
Lázaro Cárdenas	Tuxtepec	Latitud: 17° 59' 03.5" Longitud: 95° 44' 52.1"	13/10/2022	Chile soledad (Criollo)
San Felipe de la Peña	Tuxtepec	Latitud: 17° 50' 37.5" " Longitud: 95° 53' 39.4"	13/10/2022	-Chile soledad (Criollo) -Chile soledad (CHISER-522)
Betania	Tuxtepec	Latitud: 17° 54'59.2" Longitud: 96°00'49.3"	20/10/2022	Chile soledad
El Carrizo	Cd. Isla	Latitud: 18° 12'05.5" Longitud: 95° 33' 51.2"	27/10/2022	Chile soledad (Criollo)
José Azueta	José Azueta	Latitud: 17° 59' 03.6" Longitud: 95° 44' 52"	06/10/2022	Chile Soledad (Criollo)

#### **6.4. Extracción de RNA**

Un estudio previo del viroma de *Capsicum* spp. (Ho *et al.*, 2017) han revelado la presencia de una gran diversidad de virus de RNA y DNA de cadena sencilla y doble (ssRNA, ssDNA, dsRNA, dsDNA), cuya identificación a gran escala ha sido posible a través del estudio del transcriptoma vegetal. Por lo tanto, para el trabajo se realizó la extracción de RNA total de plantas infectadas y sanas (con fines comparativos) como material de inicio para el análisis de la presencia de virus clave.

Como parte de análisis previos para estandarización de técnicas adecuadas para la obtención de una muestra positiva. Las muestras obtenidas en el municipio de Loma Bonita fueron procesadas con el fin de extraer RNA integro para su posterior evaluación con oligonucleótidos reportados en la literatura.

Para la realización de estas primeras pruebas se llevó a cabo la extracción de RNA. Para ello se tomaron unas hojas de chile de una planta con síntomas de virus y una planta aparentemente sana, dicha muestra se maceró en un mortero con ayudas de nitrógeno líquido, para mantener inactivas las enzimas que degradan el RNA. Se obtuvieron dos muestras, una que pertenecía a la planta con síntomas de enfermedades virales y otra muestra de una planta aparentemente sana. Para la obtención de RNA se utilizó el Kit Direct-Zol™ RNA MiniPrep, siguiendo las indicaciones establecidas por el fabricante. Una vez obtenido el RNA se procedió a su evaluación midiendo su concentración y su integridad.

#### **6.5. Cuantificación del RNA**

La concentración y pureza del RNA obtenido se analizó en un espectrofotómetro (Nanodrop 2000) y la integridad en un gel de agarosa al 1 % al tener una muestra integra y sin degradación se procedió a la realización de síntesis de cDNA, el cual sirvió como molde para la realización de PCR.

## **6.6. Síntesis de DNA complementario (cDNA)**

Las muestras de RNA tanto para plantas sanas como de plantas enfermas, que fueron obtenidas en la extracción previa de RNA, se usaron para realizar síntesis de cDNA. Para esta técnica se hizo el uso del Kit Maxima First Strand Syntesis (ThermoScientific) (Anexo 1), para ello se realizó una incubación en el termociclador con las condiciones siguientes: temperatura de 50°C por un tiempo de 40 minutos. El cDNA obtenido, se refrigeró a -20 °C para su uso posterior como molde en la técnica de PCR para prueba de oligonucleótidos de virus de RNA.

## **6.7. Amplificación de DNA complementario (RT-PCR).**

En la técnica de PCR se emplea el cDNA obtenido, para la preparación de las reacciones se utilizó la DNA Polimerasa DreamTaq Green (ThermoScientific), para ello se realizaron reacciones con volumen de 20 µL para cada molde (DNA), en tubos de 1.5 mL se realizó una preparación de una Master mix (10 µL de polimerasa, 8 µL de H<sub>2</sub>O, 0.5 µL de cada oligonucleótido) para cada reacción, para este caso se realizó para dos muestras una con síntomas de virus y otra sin presencia de los mismos, así como un negativo, que contenía H<sub>2</sub>O como molde, un total de tres reacciones, mientras las dos restantes contenían cDNA de las muestras respectivas.

Los oligonucleótidos utilizados fueron los diseñados por Nemes y Salánki, (2020), quienes detectaron los virus más comunes en Chile; Virus Y de la papa (PYV), Virus del Mosaico del Pepino (CMV), Tobamo-Tobamovirus (TMV, PMMoV), Virus del bronceado del tomate (TSWW), así como un oligonucleótido que amplifica Actina (Actin), una proteína presente en las plantas, cumpliendo la función de control positivo en las muestras. (Tabla 2)

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para virus de RNA (Nemes y Salánki, 2020).

<b>Virus</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Tamaño de producto de PCR (pb)</b>
PVY	For- GGGAATTCCGCGGAAATGACACAATYGATGCAG GAG Rev- TGTGCCATGATTTGCCTAAGTGTTG	500
CMV	For CTTTCTCATGGATGCTTCTCCGCG Rev-CGTGGTCTCCTTTTGGAGGCC	1000
TSWV	For-CCCAGCATTATGGCAAGCC Rev-GGGCTAGCGGAAAACCTCGACCAGATCA	350
tobamo	For- G(AT)CGC(GC)GA(GT)C(GT)GATTCGT(AT)TTAAATATG Rev-TGGGCC(GC)CTACC(GC)G(GC)GG3	750
Cap. actin	For-AGGGATGGGTCAAAGGATGC Rev-GAGACAACCCGCTGAATAGC	230

Para la determinación de las condiciones de la PCR (Tabla 3) está se hizo de acuerdo con la polimerasa y las condiciones de los oligonucleótidos, llevándose a cabo la técnica de PCR-Multiplex.

**Tabla 3.** Condiciones de PCR, para virus de RNA

<b>Fase</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	95° C	30 segundos
Alineación	60 °	30 segundos
Extensión	72 ° C	1 minuto
Extensión final	72 ° C	10 minutos

### **6.8. Electroforesis**

Se realizó una electroforesis, para ello previamente se realizó la preparación de gel de agarosa al 1%, en donde se colocó el producto de PCR, junto con un marcador de peso de 1kb (mil bases). Para el método se estableció un tiempo de 30 minutos

con un voltaje de 110. Para la visualización del resultado de la electroforesis, el gel es sumergido en bromuro de tres a cinco minutos, para poder visualizarlo en un fotodocumentador.

### **6.9. Extracción de DNA**

Para la evaluación de los oligonucleótidos para virus de DNA, se realizaron extracciones de muestras de chile soledad de una planta sana y una enferma, con el fin de estandarizar las técnicas para las extracciones finales.

Se utilizó un kit para extraer DNA y de igual manera se realizó por el Método modificado de Cristancho *et al.*, (2007).

En tubos Eppendorf se colocaron las muestras de hojas de chile previamente molidas con nitrógeno, para evitar degradación del DNA, se mantuvo las muestras en nitrógeno líquido, con el fin de mantenerlo para la siguiente etapa del proceso.

La extracción de DNA, al tubo con muestras se adicionó 600  $\mu$ L de buffer de lisis y se llevó al vortex para obtener una mezcla homogénea. La mezcla obtenida se incubo a baño maría en el termobloque a 80°C por 10 minutos, pasado el tiempo de incubación se dejó enfriar hasta 50°C, llegada la temperatura se le agregó 700  $\mu$ L de fenol-cloroformo-isomilalcohol (25:24:1), se mezcló suavemente y se pasó a la centrifuga a 10 000 rpm durante 10 min.

Como resultado de la centrifugación se retiró el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo, ha dicho sobrenadante se le agregó dos veces el volumen de etanol al 100 % y 1/10 de volumen de solución 3 M de acetato de sodio, para precipitar durante 2 horas a -20°C.

Los tubos almacenados a -20°C se pasaron a la centrifugadora a 10 000 rpm durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante para obtener los pellets, los cuales son lavados con 480  $\mu$ L (500  $\mu$ L) de etanol al 80% para ser centrifugado a 10 000 rpm por 10 minutos; este último proceso se repitió dos veces. Una vez terminado el lavado, se retiró el etanol y dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente el pellet se suspende en 40  $\mu$ L de agua DEPC o agua desionizada.

Se adicionó 1  $\mu$ L de RNAsa e incubó a 37°C por 30 minutos en el termobloque, pasado los 30 minutos se incubó a 65°C por 10 minutos, para la inactivación de la RNAsa.

El DNA obtenido se almacenó a -20°C para posteriormente ser analizado.

Una vez estandarizadas las técnicas utilizadas, se realizó las extracciones de las muestras de cada una de las comunidades, Loma Bonita (LB), San Benito el Encinal (SB), José Azueta (JA), Bethania (B), El Carrizo (EC), Lázaro Cárdenas (LC) y San Felipe de la Peña (SF), a cada muestra se le otorgó un código para su identificación de acuerdo con su lugar de recolección, así como el número de muestra a la que pertenecía y genotipo del chile criollo o mejorado (Cr y M)

#### **6.10. Cuantificación del DNA.**

La calidad y concentración del DNA se determinó mediante espectrofotometría (Nanodrop) a 260 nm con una relación de absorbancia de 260/280 nm respectivamente, posteriormente se almacenó a -20 °C.

La integridad del DNA se determinó mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % teñido con una solución de bromuro de etidio y se visualizó en un fotodocumentador.

#### **6.11. Amplificación de DNA (PCR).**

Al verificar tanto la integridad como la pureza del DNA, se llevó a cabo el procedimiento de la técnica de PCR, donde se probaron los oligonucleótidos utilizados por Hernández-Espinal *et al.* (2018), específicos para virus de DNA de la familia Geminiviridae (Tabla 4). El protocolo de PCR implementado para el oligonucleótido que amplifica PepGMV se indica en el Tabla 5.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos empleados para virus de DNA, por Hernández- Espinal *et al.*, (2018).

<b>Virus</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>	<b>Tamaño de producto de PCR (pb)</b>
PHYVV	HRRF- AAGATAGCTTCTTCGATGG Rev 241- GAATTAAAGGTACATGGAC	1365
PepGMV	GMRRF- CTCCACATCGTTTGAATAGAC Rev JM24-TAGGCCACACCTTGGTCACCAAG	1063
TYLCV	TYC1F-GGGCCTAGAGACCTGGCCCAC TYC1R-CCGGTAATATTATACGGATGGC	856

**Tabla 5.** Condiciones de PCR para virus del Mosaico dorado del chile (PepGMV)

<b>Fase</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	95° C	30 segundos
Alineación	58 ° C	30 segundos
Extensión	72 ° C	1 minuto
Extensión final	72 ° C	10 minutos

Para el oligonucleótido que amplifica el PHYVV, se realizó una modificación al protocolo utilizado por Hernández-Espinal *et al.* (2018). Las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de PCR para Virus Huasteco de la Vena Amarilla del Chile (PHYVV)

<b>Fase</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	95° C	30 segundos
Alineación	50.7° C	30 segundos
Extensión	72 ° C	1 minuto
Extensión final	72 ° C	10 minutos

El protocolo de PCR utilizado para TYLCV, se indica en la Tabla 7. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador modelo T-100® (Thermal Cycler BIO-RAD).

**Tabla 7.** Condiciones de PCR para Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV).

<b>Fase</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	95 °C	5 minutos
Desnaturalización	95° C	30 segundos
Alineación	56° C	30 segundos
Extensión	72 ° C	1 minuto
Extensión final	72 ° C	10 minutos

#### **6.12. Purificación de producto de PCR.**

Una vez obtenidas las muestras positivas para los virus de DNA fue purificado el producto resultante para enviarlo a secuenciar. Para la realización de la purificación, se utilizó el kit QIAquick® Extraction kit (QIAGEN), siguiendo las especificaciones del proveedor, posteriormente se llevó a cabo una electroforesis para verificar el

éxito de la purificación, en un gel de agarosa al 2% con un tiempo de 45 min a 110 volts (Anexo 2).

### **6.13. Secuenciación**

Se seleccionó de cada una de las comunidades que resultaron positivas para cada uno de los virus, una muestra de productos de PCR purificados los cuales fueron enviados a secuenciar mediante la técnica de secuenciación de Sanger, por ambos extremos al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV-Irapuato (LANGEBIO).

Las secuencias obtenidas de la amplificación de los genes del segmento ADN-A para los aislados de Loma Bonita, Bethania, San Felipe, José Azueta, El Carrizo y Lázaro Cárdenas, así como la amplificación del gen de la proteína de replicación (rep) para los aislados de San Felipe, José Azueta y Lázaro Cárdenas, fueron limpiadas y ensambladas utilizando el programa Geneious© 2024 de Dotmatics. Para determinar las identidades de las secuencias, cada ensamblaje se sometió a un análisis de homología BLASTn contra la base de datos no redundante del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **6.14. Análisis Filogenético**

Para los análisis filogenéticos, se crearon dos conjuntos de datos moleculares. El primero incluyó 68 secuencias correspondientes a la región del segmento ADN-A depositadas en el NCBI para el virus PepGMV, seleccionando al virus del rizado de la hoja de calabaza (M38183) como grupo externo. El segundo conjunto consistió en 56 secuencias de la proteína rep del NCBI para el virus PHYVV, con el virus del rizado de la hoja de okra (AJ512954) como grupo externo. Ambos conjuntos de datos se alinearon utilizando CLUSTAL OMEGA 1.2.2, y el mejor modelo de sustitución de nucleótidos se seleccionó con ModelTest-NG, basado en el criterio BIC.

Los análisis filogenéticos se realizaron mediante inferencia bayesiana con Beast2, ejecutando 40 millones de generaciones con los modelos HKY+G4 y TPM3uf+G4 para PepGMV y PHYVV, respectivamente. La salida del MCMC se evaluó con Tracer v1.7.1. Para la anotación de los árboles consenso, se descartó el 30% de los árboles iniciales y se calculó la probabilidad posterior con los árboles restantes. Finalmente, los árboles consenso se visualizaron y editaron en iTOL v6.5.8.

#### **6.15. Análisis hospederos de la familia solanácea.**

Debido a que existen muchas plantas que tienden a ser reservorios perfectos para que el virus se mantenga latente. Se analizó muestras de tres solanáceas, que se localizan en algunas de las zonas de producción del cultivo de chile soledad. Para estos fines se recolectó muestras de chile habanero (*Capsicum chinense*) dos genotipos (híbridos Rey Pakal y variedad Jaguar), chile chilpaya (*Capsicum annum var. glabriusculum*) una variedad silvestre, así como de hierba mora (*Solanum nigrum*), una arvense, la cual es usada para consumo en la región. Las muestras fueron colectadas en los municipios de José Azueta, Isla, Tuxtepec y Loma Bonita.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1. Sintomatología presente en las localidades muestreadas.**

Derivado de la recolección de muestras, se tomaron referencia de los síntomas presentados por las plantas donde se obtuvo material vegetativo, de tal manera que dicha sintomatología se asoció a las características que se presentan en plantas infectadas con virus de la familia Geminiviridae.

Se pudo observar a nivel de campo que muchas de las plantas compartían más de un síntoma, posiblemente derivado de la infección de más de un virus.

Las plantas de los cultivos que se muestrearon presentaron diferentes síntomas, dentro de los que destacaban, plantas de tamaños menor en comparación con el resto de las plantas, así como deformación de la lámina foliar, mejor conocido como enchinamiento (Figura 2B, 2C). Algunas plantas también presentaron clorosis o amarillamiento de las hojas, manifestándose principalmente en las hojas nuevas y punto de crecimiento (Figura 2A, 2D). En el caso particular de Loma Bonita, las imágenes de los síntomas pertenecen al genotipo CHISER-522.



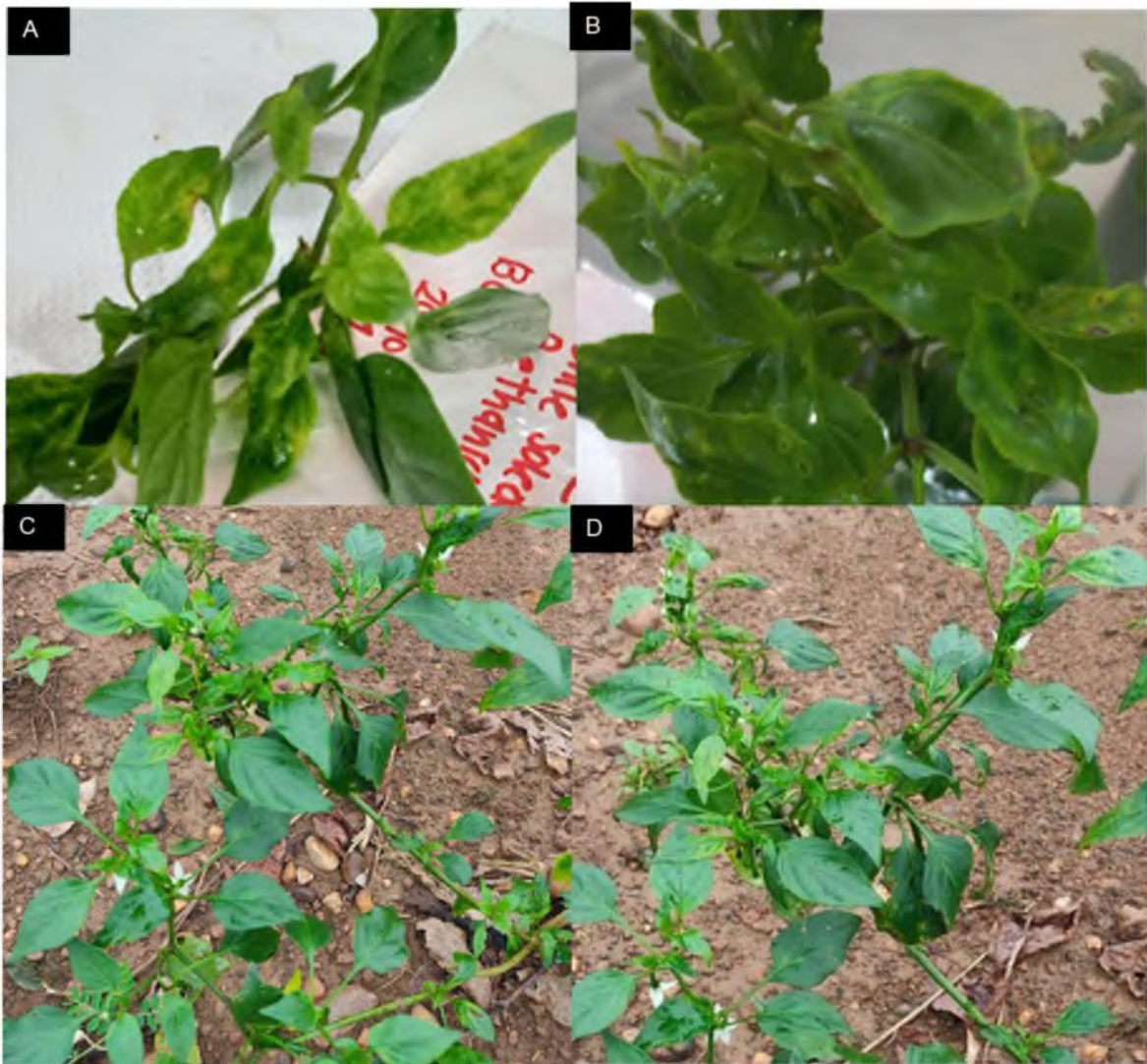
**Figura 2.** Síntomas presentados en el genotipo de Chiser-522 en la localidad de Loma Bonita. A y C) Clorosis presente en hojas nuevas, B y D) hojas con presencia de deformación (enclenchamiento) en lámina foliar.

Referente a los síntomas presentes en las muestras de la comunidad de San Felipe de la Peña, las plantas recolectadas presentaron síntomas similares a las observadas en las muestras de Loma Bonita. Estos fueron hojas con pequeñas manchas cloróticas, conocidas como moteado (Figura 3A), además de presentar enclenchamiento o deformación de la lámina foliar (Figura 3B). Estos fueron poco más severo comparado con las muestras de Loma Bonita, de igual manera se pudo observar un verde brillante en las hojas, más jóvenes y una reducción en el tamaño de las plantas (Figura 3C).



**Figura 3.** Planta con presencia de síntomas de virus, para la comunidad de San Felipe de la Peña en genotipo criollo (A y B) y CHISER-522 (C y D) respectivamente.

La sintomatología de las plantas fue similar a las presentadas en plantas con virus, se observaron plantas con moteado en las hojas, así como alguna con enchinamiento o deformación en la lámina foliar (Figura 4A y B). De igual manera las plantas no presentaron un porte alto, debido al detenimiento del desarrollo ocasionado por el patógeno (Figura 4C y D).



**Figura 4.** Muestras de sintomatología de plantas infectadas con virus en la comunidad de Bethania, A y B) Muestras de material vegetativo evaluado, C y D) Síntomas presentes en plantas establecidas en campo.

Para el municipio de Isla perteneciente al estado de Veracruz, las plantas muestreadas presentaron síntomas como deformación de la lámina foliar, así mismo se observó mosaicos o moteado en las hojas, signos de clorosis en las hojas más jóvenes, algunas plantas que se encontraban en estado productivo, presentaron frutos pequeños y síntomas de amarillamiento, comparado con plantas con apariencia sana (Figura 5 A, B, C y D).



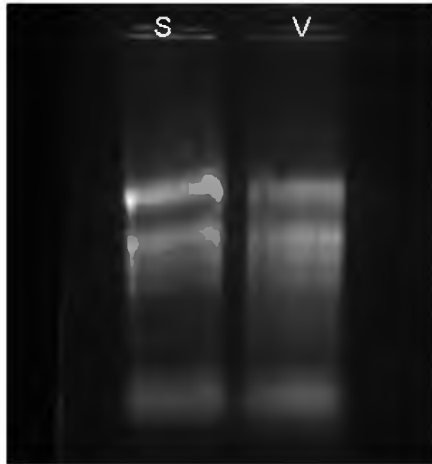
**Figura 5.** Sintomatología presente en el cultivo de chile en la localidad de El carrizo en Isla, Veracruz. A y B) Lámina foliar atrofiada, presencia de enchinamiento, C y D) amarillamiento de la lámina foliar, así como presencia de moteado en lámina foliar.

## **7.2. Extracción de RNA.**

Derivado de las extracciones de RNA realizadas a las muestras colectadas, se logró obtener concentraciones adecuadas (Tabla 8.) Además de presentar muestras integra y sin degradación (Figura 6) que fueron empleadas en reacciones de síntesis de cDNA.

**Tabla 8.** Concentración del RNA obtenido de las muestras

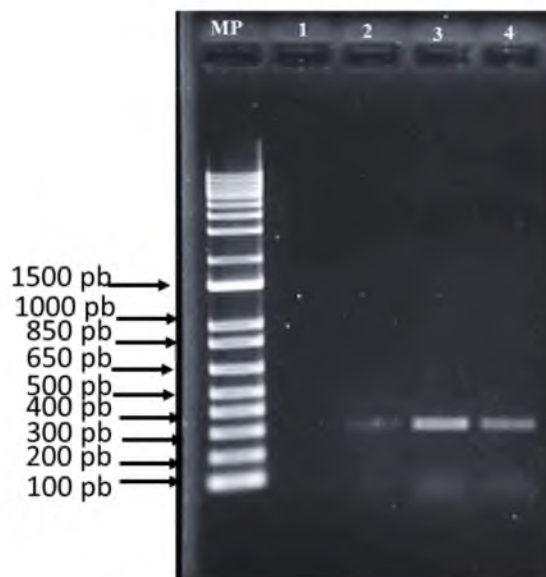
MUESTRA	CONCENTRACION (ng/ $\mu$ L)
Planta con virus	1300
Planta sana	2000



**Figura 6.** RNA total obtenido a partir de una planta sana (S) y de una planta con síntomas virales (V), visualizado en un gel de agarosa desnaturalizante al 1% en MOPS 1X.

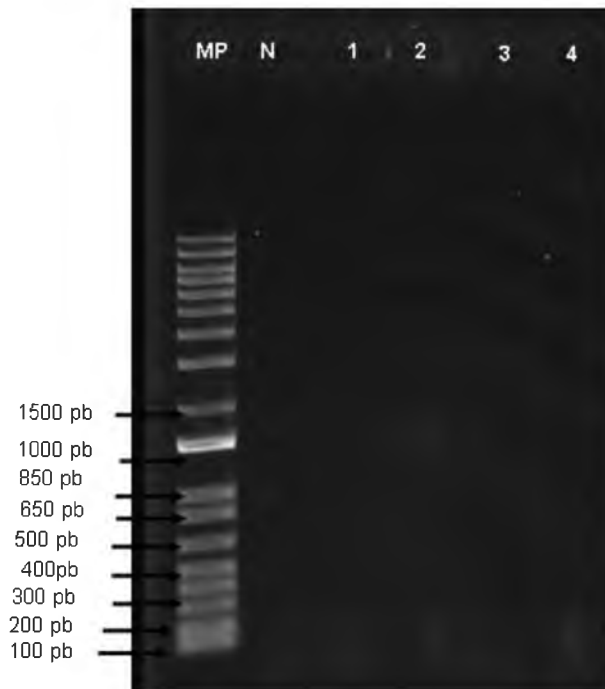
### 7.3. Productos obtenidos en virus de RNA mediante PCR.

Con la finalidad de verificar que el cDNA obtenido tiene la calidad para emplearse como molde en reacciones de PCR posteriores, se llevó a cabo la amplificación, del gen de Actina como gen de referencia Después de la amplificación, la electroforesis reveló un producto de 230 pb, que corresponde al tamaño esperado (Figura 7). Por otra parte, con el objetivo de averiguar la presencia.



**Figura 7.** Producto de PCR obtenidos con las muestras de cDNA de plantas con síntomas de virus y sanas, visualizado en gel de agarosa al 1.5 % en TAE 1X, MP; Marcador de Peso; 1: Negativo; 2: planta infectada, 3: Planta sin infección; 4: Planta infectada,

Muchos de los virus que afectan a las solanáceas, suelen ser virus de cadena sencilla (RNA) Como resultado de la PCR donde se utilizó los oligonucleótidos para los virus de RNA o cadena sencilla, no se observó la amplificación de ninguna banda para cada uno, por ello se determinó y descartó la presencia de éstos en la muestra (Figura 8.).



**Figura 8.** Productos de PCR obtenidos con oligonucleótidos para virus de RNA tomando como molde cDNA de planta con síntomas de virus, visualizado en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, MP= Marcador de peso; N= Negativo; 1= PVY; 2= TSWV; 3= Tobamovirus; 4= CMV

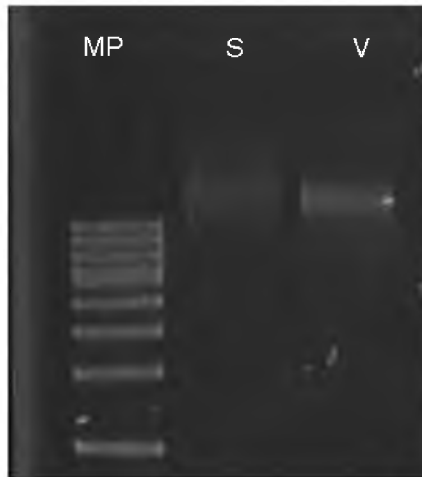
#### 7.4. Extracción de DNA.

Una vez realizada la extracción de DNA de plantas con síntomas de virus y de la planta sana, se cuantificó la muestra y mediante espectrofotometría (Nanodrop 2000) se midió la concentración (Tabla 9), al ser las concentraciones mayores a 500 ng, se realizaron diluciones 1:10, para poder usarse en las reacciones de PCR como molde y evitar efectos inhibidores por saturación.

**Tabla 9.** Concentración de DNA en las muestras de plantas con síntomas de virus y planta sana.

Muestras	Concentración (ng/ $\mu$ L)
Muestra sana	1649.8
Muestra virus	2572

Para verificar que las muestras de ADN extraídas de las plantas con y sin presencia de sintomatología de infección viral no sufrieron degradación durante el proceso de extracción, se realizó una electroforesis, observando la obtención de una banda de alto peso molecular, correspondiente a DNA genómico integro como se muestra en la Figura 9.

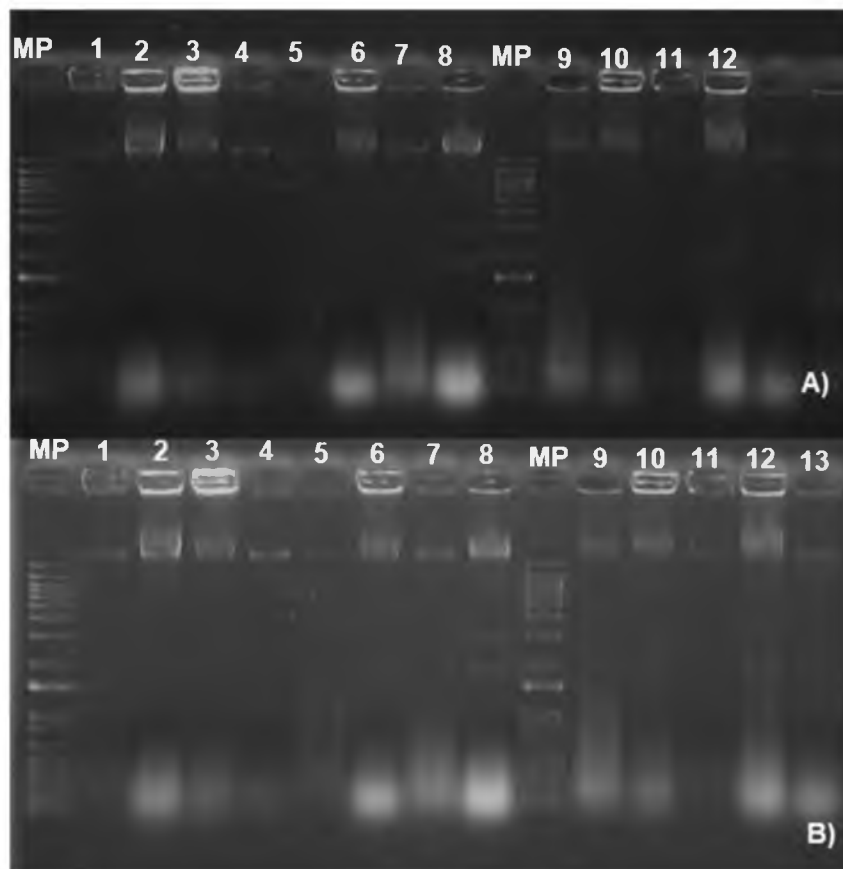


**Figura 9.** DNA genómico obtenido a partir de plantas con sintomatología de virus y sin presencia de síntomas obtenidas de plantas con sintomatología de virus y plantas sin presencia de síntomas., gel de agarosa al 1% en TAE 1X, MP: Marcador de peso 1Kb Plus DNA ladder.

Hasta este punto, las pruebas de extracción de DNA, RNA, síntesis de cDNA y amplificación por PCR realizadas previamente, demostraron que los ensayos eran adecuados para iniciar la investigación de un número mayor de muestras. En total se tomaron 26 muestras de plantas con y sin signos de infección viral en las distintas localidades (Anexo 3). A estas muestras se les extrajo DNA genómico que resultó con niveles de pureza y concentración adecuadas para los ensayos posteriores (Tabla 10). Además, el DNA genómico extraído de cada muestra mostró la integridad suficiente (Figura 10 A y B).

**Tabla 10** Medias obtenidas respecto a la concentración y pureza de las muestras de DNA.

Variable	Media	Error estándar de la media	Desv.Est.
Pureza	2.343	0.113	0.588
Concentración (Ng/ $\mu$ L)	1307	271	1407

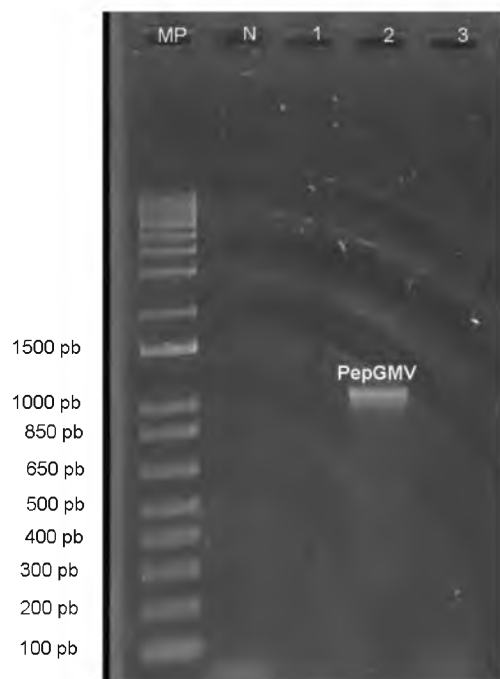


**Figura 10.** DNA genómico obtenido de plantas con síntomas virales, colectadas en distintas comunidades. A) Muestras del municipio de Loma Bonita (1-6), José Azueta (7-9), Isla (10-12), B) Municipio de Tuxtepec (1-13). Gel de agarosa al 1% en TAE 1X, MP: Marcador de peso 1Kb Plus DNA Ladder.

## 7.5. Detección de virus de DNA mediante técnica de PCR.

### 7.5.1. Virus del Mosaico dorado del chile (PepGMV).

Como resultado de la reacción de PCR, se obtuvo en la prueba un amplicón de 1065 pb (Figura 11), el cual coincide con el tamaño esperado para el virus del Mosaico dorado del chile (PepGMV, por sus siglas en inglés). La banda obtenida, se purificó y se envió al laboratorio del CINVESTAV para su secuenciación, para corroborar que era el virus esperado.

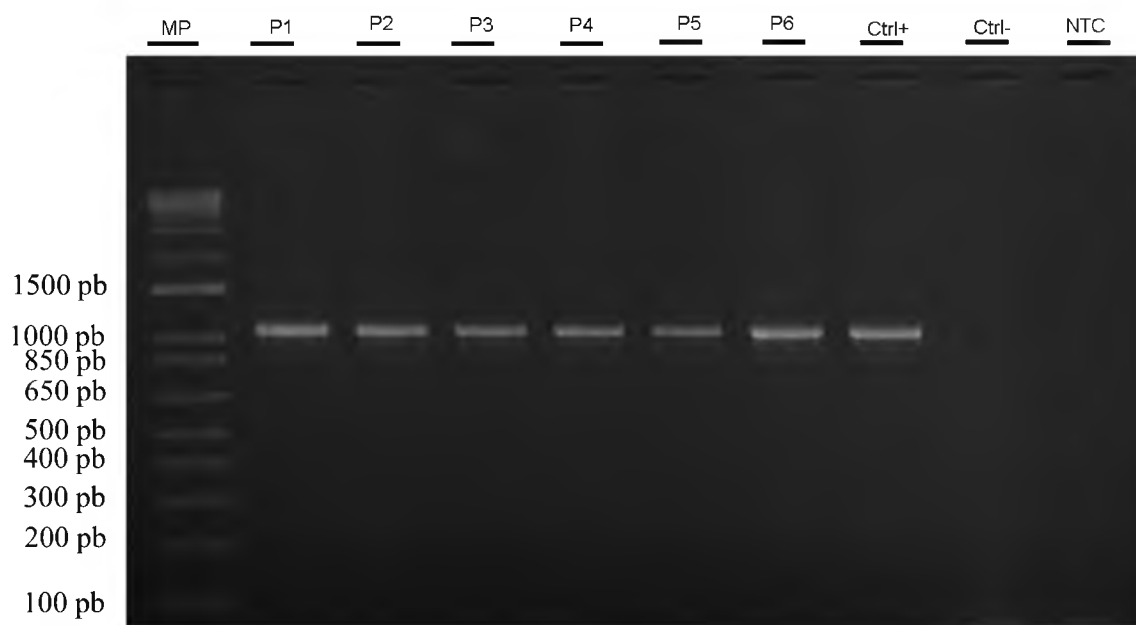


**Figura 11.** Producto de PCR obtenidos con oligonucleótidos para virus de DNA para planta con sintomatología de virosis, visualizado en gel de agarosa al 1 % en TAE 1X., MP= Marcador de peso; N= negativo; 1: Primer PHYW; 2= Primer PepGMV; 3= Primer TYLCV

En la Figura 12, se observan los productos amplificados a partir de DNA genómico de las muestras colectadas en el municipio de Loma bonita.

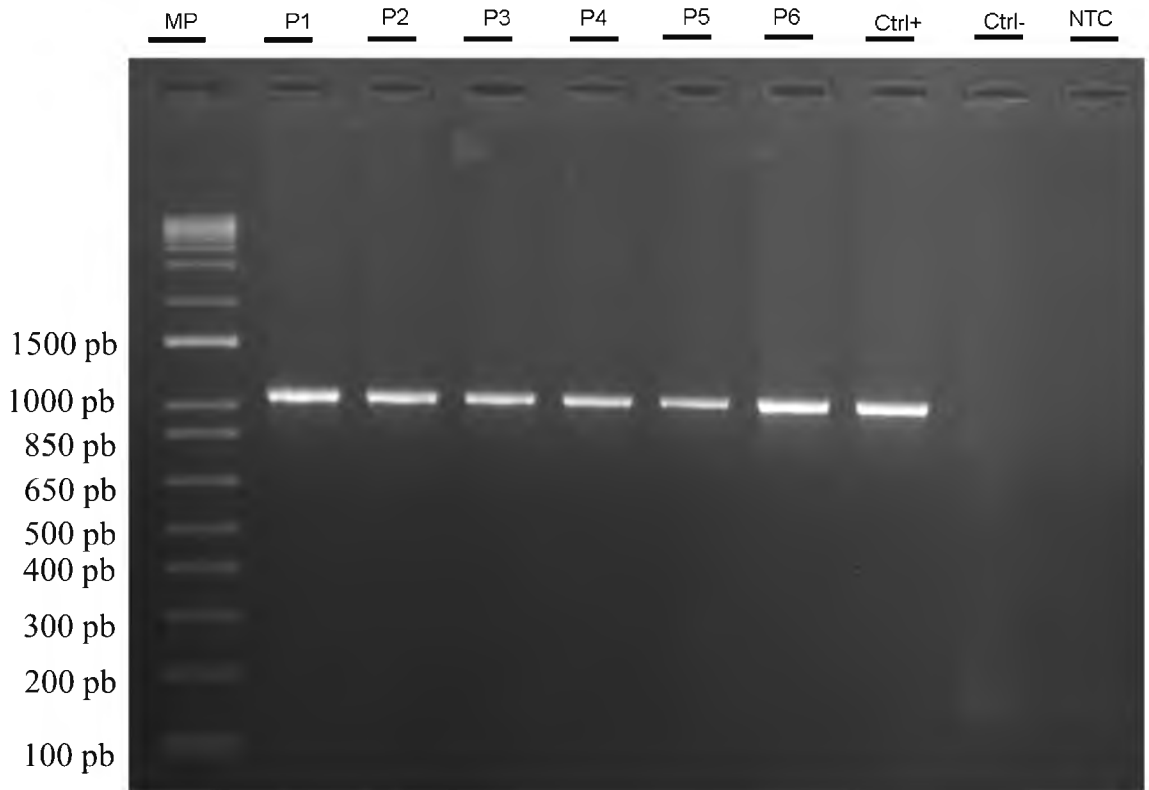
Derivado del revelado mediante electroforesis se determinó la presencia de PepGMV en las localidades de Loma Bonita y San Benito el Encinal. En el gel de agarosa se pudo observar un amplicón del tamaño esperado (Figura 12). Con estos resultados se identificó la presencia de este patógeno en la zona perteneciente al

municipio de Loma Bonita. Este fitopatógeno PepGMV se presentó en los dos genotipos, mejorado (CHISER-522) y criollo. De igual manera se analizó la sintomatología presentada por las plantas en el momento en que se obtuvo el material vegetativo para el presente análisis.



**Figura 12.** Productos de PCR obtenidos a partir de DNA de las plantas colectadas en las comunidades del municipio de Loma Bonita para PepGMV. MP=Marcador de Peso; P1-P3=Loma Bonita; P4-P6=San Benito; Ctrl+=Control positivo; Ctrl-= Control negativo (Plantas sin signos de infección); NTC= Negativo para oligonucleótidos.

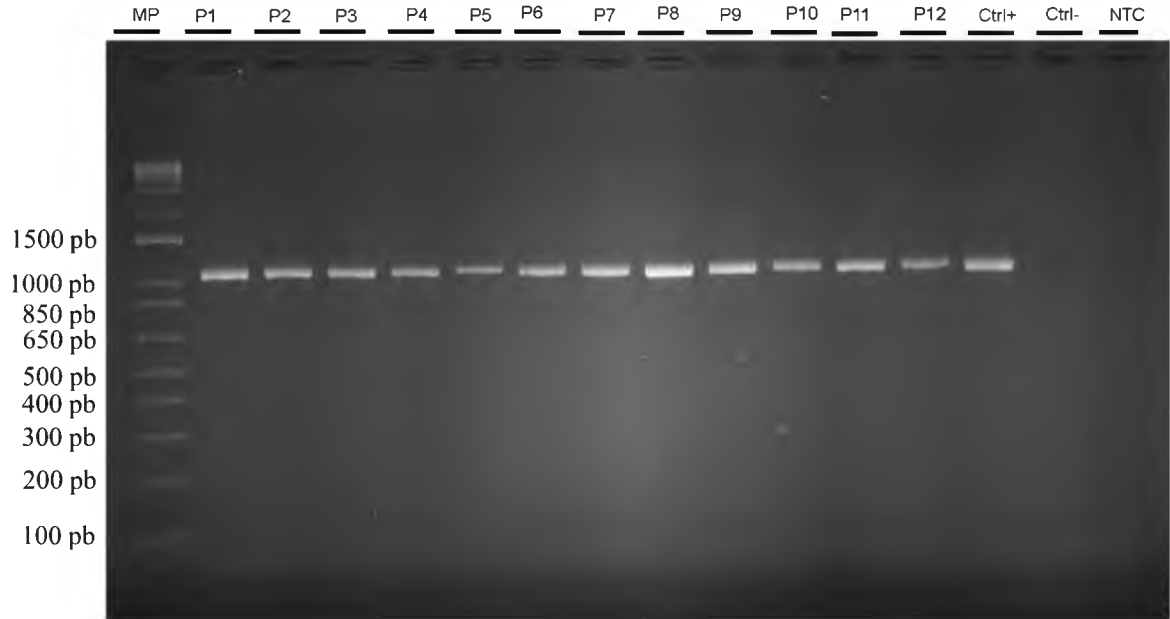
En los municipios de Isla y José Azueta, en las comunidades muestreadas, como resultado de la PCR se obtuvo positivo para PepGMV en todas las comunidades, así como genotipos analizados (Figura 13).



**Figura 13.** Productos de PCR obtenidos a partir de DNA de plantas colectadas en las comunidades del municipio de José Azueta e Isla para genotipos de chile soledad mejorado y criollo. MP=Marcador de peso; P1-P3=José Azueta (mejorado) P4-P6= El carrizo, municipio de Isla (criollo), Ctrl+= Control positivo, Ctrl-= control negativo (Plantas sin signos de infección), NTC=control negativo para oligonucleótidos

El resultado fue similar al obtenido en el municipio de Loma Bonita, donde se observó que la infección es independiente del genotipo.

Para el municipio de Tuxtepec, donde se muestrearon tres localidades diferentes, así como dos genotipos, el resultado de la evaluación de PCR fue positivo para PepGMV, con un amplicón de 1063 pb. De esta manera se suma a las comunidades con presencia del Virus Dorado del Chile (PepGMV) (Figura 14).

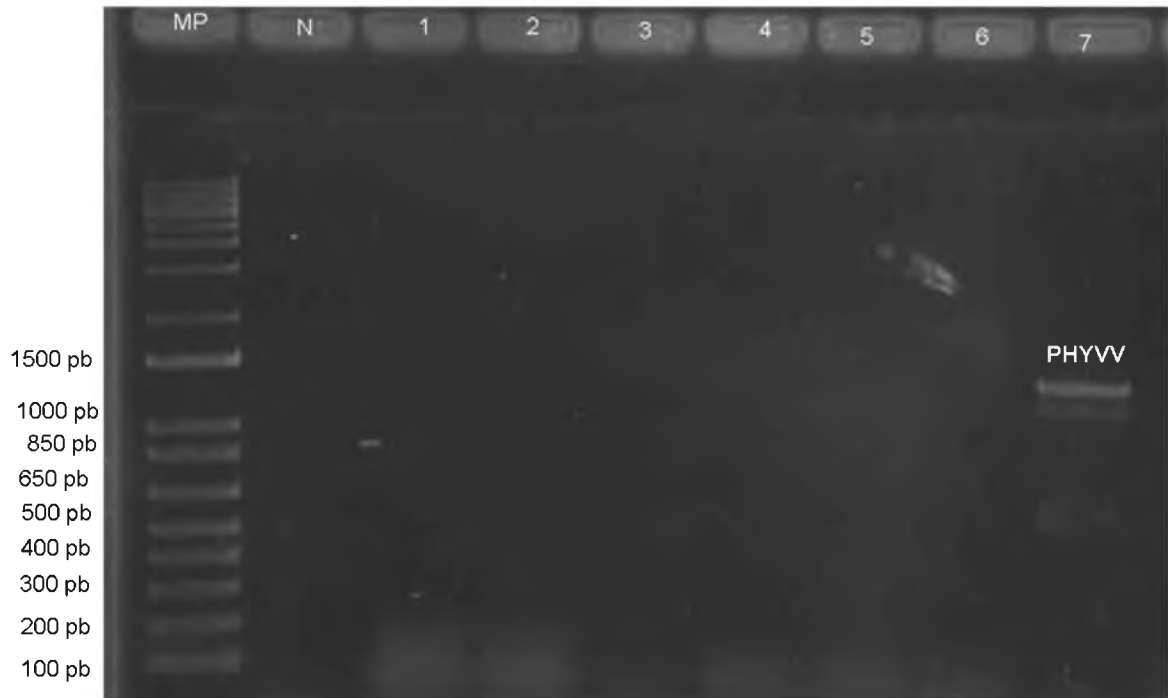


**Figura 14.** Productos de PCR obtenidos a partir de DNA de plantas colectadas en las comunidades del municipio de Tuxtepec. MP: Marcador de peso; P1-P3=San Felipe (criollo), P4-P6=San Felipe (mejorado), P7-P9=Lázaro Cárdenas, P10-P12= Bethania (criollo) Ctrl+=Control positivo, Ctrl-= Control negativo, NTC= control negativo para oligonucleótidos.

Con los resultados obtenidos en todos los municipios, se pudo determinar la prevalencia del virus en la región. Para este caso, la prevalencia de PepGMV fue del 100 por ciento en las zonas muestreadas en este estudio en la región del Papaloapan.

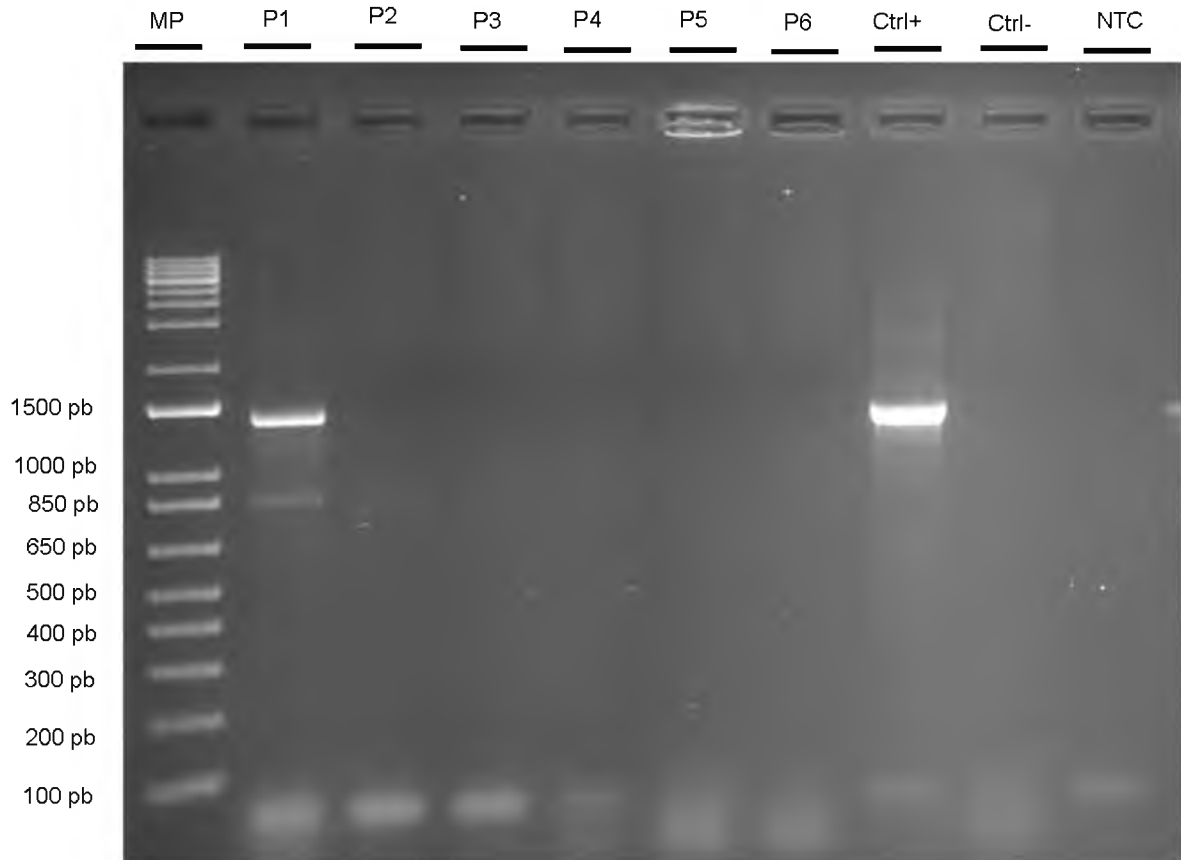
#### 7.5.2. Virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV).

Con relacional PHYVV, en la Figura 15 se muestra el primer amplicón obtenido para el PHYVV, con un peso de 1365 pb. Este amplicón se purificó y secuenció. Además, fue tomado como el control positivo para las siguientes evaluaciones con las muestras de cada uno de los municipios.



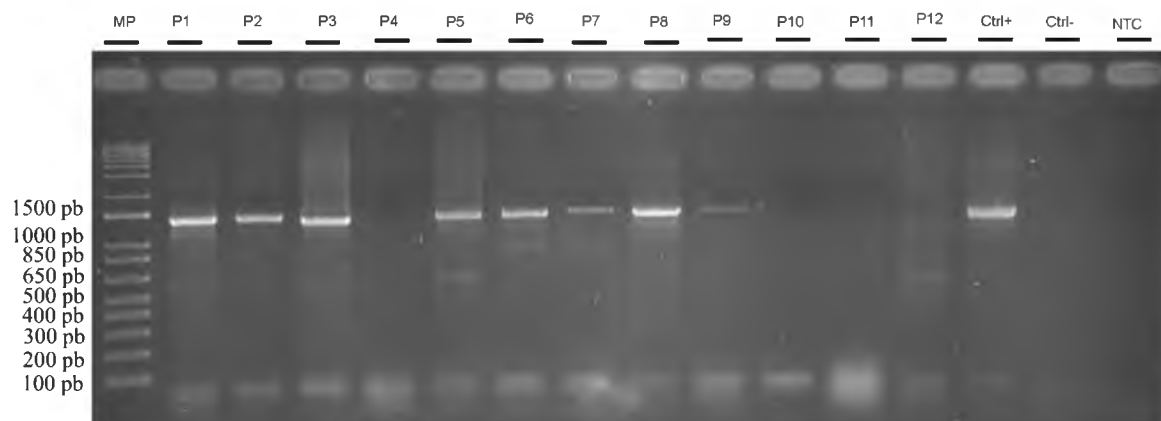
**Figura 15.** Productos de PCR, donde se obtuvo un control positivo para el patógeno que provoca el virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV) visualizado en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, MP: Marcador de peso 1kb plus DNA ladder.

Derivado de las pruebas realizadas a cada una de las muestras de los municipios evaluados para el presente trabajo, se obtuvo en el municipio de José Azueta, muestras positivas, pues en la revelación de los geles por medio de electroforesis, se logró apreciar una banda o amplicón del tamaño esperado para PHYVV. Las muestras obtenidas de este municipio corresponden a chile soledad criollo y la banda se puede visualizar en la Figura 16, en el carril P1 se aprecia la banda con un peso de 1365 pb.



**Figura 16.** Productos de PCR obtenidos a partir de DNA genómico obtenido de plantas colectadas en los municipios de José Azueta e Isla, análisis para PHYVV, MP=Marcador de peso; P1-P3=José Azueta (criollo), P4-P6= El carrizo. Isla (criollo), Ctrl+ = Control positivo, Ctrl- = Control negativo, NTC = Negativo para oligonucleótidos.

La evaluación de los municipios de Tuxtepec, en donde se recolectó muestras de tres comunidades, se logró obtener resultados positivos para dos de éstas. En la comunidad de San Felipe de la Peña, se obtuvieron resultados que indican la presencia del virus en ambos genotipos (criollo y CHISER-522), por su parte en la comunidad de Lázaro Cárdenas, también se apreció la banda con el tamaño esperado para PHYVV (Figura 17).

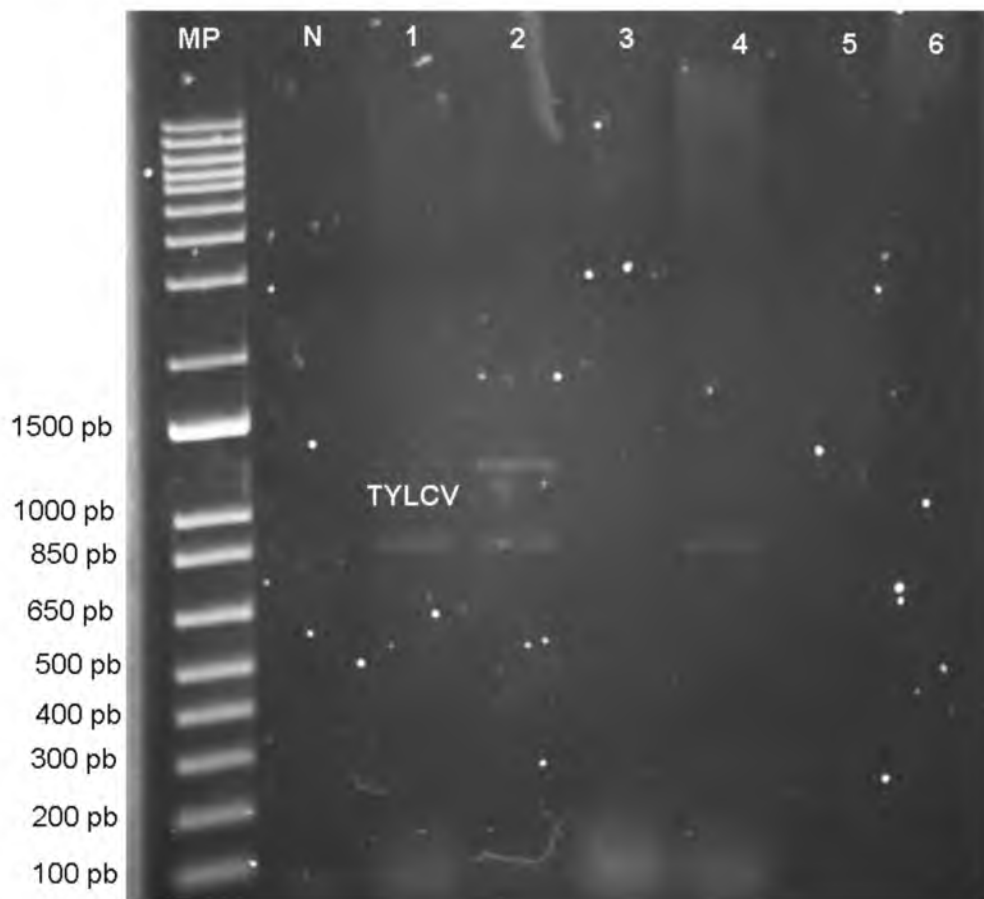


**Figura 17.** Productos de PCR amplificados a partir de muestras de DNA obtenidas de plantas de las localidades pertenecientes al municipio de Tuxtepec. Donde MP= Marcador de Peso, P1-P3= Muestras de San Felipe (criollo), P4-P6; San Felipe (mejorado), P7-P9; Lázaro Cárdenas, P10-P12; Bethania, Ctrl+= Control positivo; Ctrl-=Control negativo (Plantas sin signos de infección), NTC=control negativo para oligonucleótidos.

Cabe señalar que, para los municipios de Loma Bonita, así como Cd. Isla presentaron resultados negativos para PHYVV. Referente a la prevalencia de este virus en la región se mantiene con un 34 por ciento, presentándose en municipios de Oaxaca y Veracruz. Esto indica una distribución menor del virus en la región, pero no menos importante. Sin embargo, se destacó que en las mismas muestras evaluadas para PepGMV, fueron las mismas que dieron positivo a PHYVV, lo cual nos indica una infección mixta, es decir que ambos virus estaban presentes en una misma planta.

### 7.5.3. Virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV).

Previo a los análisis para las muestras en cada una de las localidades para el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV, por sus siglas en inglés), se realizó una prueba para la obtención de un control positivo (Figura 18.). Los resultados obtenidos no fueron del todo favorables debido a que las bandas no presentaban la suficiente cantidad de ADN viral por lo que no se lograba apreciar con claridad en el producto de PCR.



**Figura 18.** Muestras positivas para TYLCV en las localidades de San Benito, Bethania y San Felipe de la Peña, para genotipos criollos. MP=Marcador de peso; N= Negativo; Pozo 1= Muestra San Benito; Pozo 2-3= Bethania; 4-6= San Felipe de la Peña.

Para este virus se realizó pruebas con más muestras de otros municipios, sin embargo, se obtuvieron resultados negativos, por lo cual se determinó la ausencia del mismo en esta zona productora.

### **7.6. Resultado de Secuenciación**

Los resultados del análisis de homología mediante BLASTn revelaron que las secuencias DNA-A de los aislados de Loma Bonita, Bethania, San Felipe, José Azueta, El Carrizo y Lázaro Cárdenas presentan una alta similitud con la secuencia del segmento DNA-A del aislado PepGMV PVE95L2004 (LN848791) (Anexo 4), con una identidad del 95.81% al 99.05% y un valor E de 0 (Tabla 11). Por otro lado, las

secuencias rep (gen de replicación) de los aislados de San Felipe, José Azueta y Lázaro Cárdenas mostraron una identidad del 95.70% al 96.01% con las secuencias rep de los aislados de PHYVV GAHOD44HUAS (KY366178), GGUASD27HUAS (KY499896) y GCONA21HUAS (KY288518) (Anexo 5), respectivamente, con valores E de 0.

**Tabla 11.** Resultado de la mejor coincidencia con blastn.

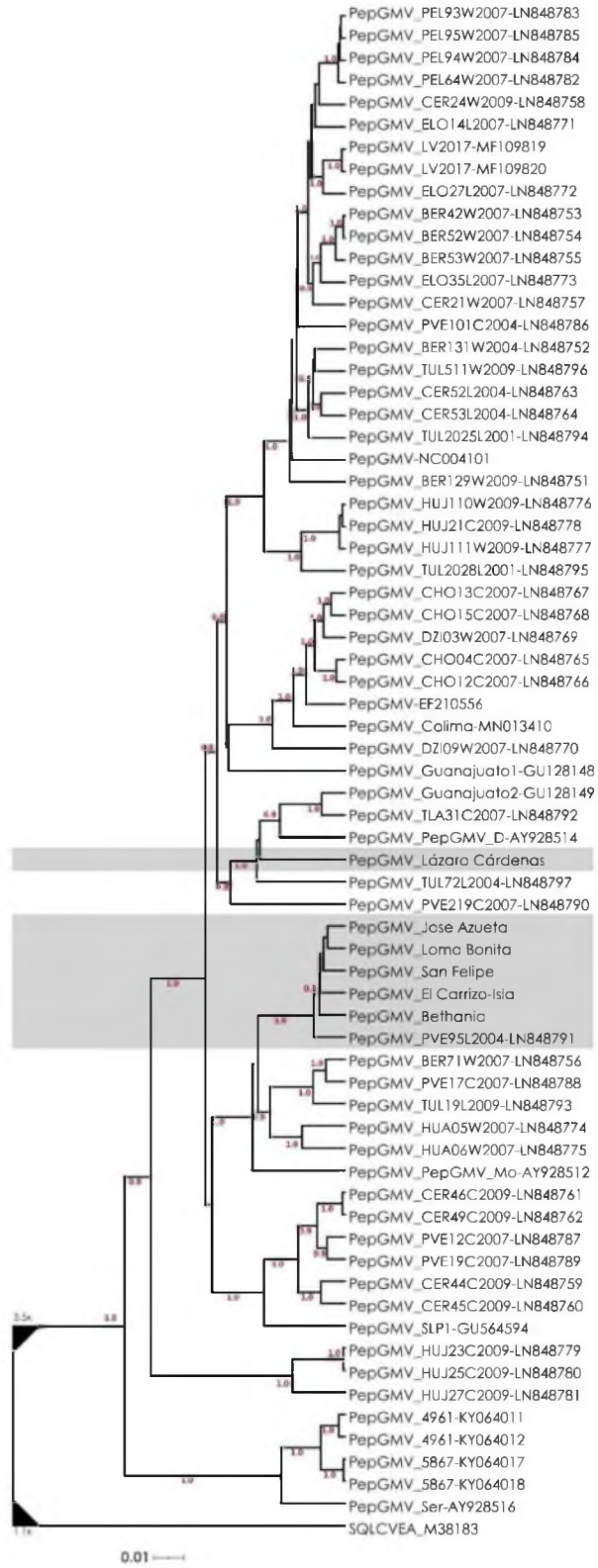
Aislado	Descripción	Especie	Número de acceso	Evalue	Identidad %	Cobertura%
DNA-A Loma Bonita	segmento DNA-A	PepGMV	LN848791	0	98.25	100
DNA-A Bethania	segmento DNA-A	PepGMV	LN848791	0	97.99	90
DNA-A San Felipe	segmento DNA-A	PepGMV	LN848791	0	99.05	90
DNA-A José Azueta	segmento DNA-A	PepGMV	LN848791	0	98.94	100
DNA-A El Carrizo	segmento DNA-A	PepGMV	LN848791	0	98.72	91
DNA-A Lázaro Cárdenas	segmento DNA-A	PepGMV	LN848792	0	95.81	99
RepA San Felipe	rep	PHYVV	KY366178	0	96.01	98
RepA José Azueta	rep	PHYVV	KY499896	0	95.61	99
RepA Lázaro Cárdenas	rep	PHYVV	KY288518	0	95.70	99

### 7.7. Análisis filogenético

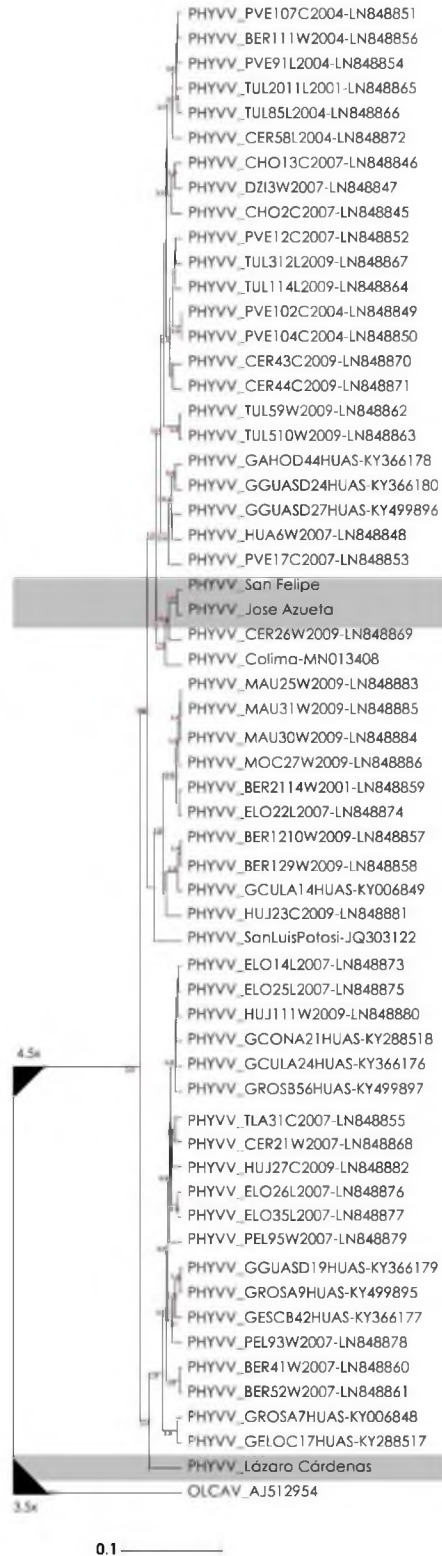
El análisis filogenético de estas secuencias respaldó los resultados obtenidos en la búsqueda de similitud. Utilizando métodos de inferencia bayesiana, se construyeron dos árboles filogenéticos. Como se observa en la Figura 19, las secuencias DNA-A de los aislados de Loma Bonita, Bethania, San Felipe, José Azueta y El Carrizo se agruparon en un clado interno junto con el aislado PepGMV LN848791 con una

probabilidad posterior del 100%. Por otro lado, el aislado de Lázaro Cárdenas se agrupó en otro clado con las secuencias DNA-A de los PepGMV de Guanajuato2 (GU128149), TLA31C2007 (LN848792), D (AY928514) y TUL72L2004 (LN848797), también con un soporte del 100%.

Asimismo, las secuencias rep de los aislados de San Felipe y José Azueta se agruparon en el mismo clado con secuencias de los PHYVV CER26W2009 (LN848869) y Colima (MN013408), con un soporte del 100%. La secuencia rep del aislado de Lázaro Cárdenas, al igual que para el segmento DNA-A, se agrupó en un clado diferente con 20 secuencias reportadas para PHYVV, con una probabilidad posterior del 100% (Figura 20).



**Figura 19.** Árbol filogenético correspondientes a la región del segmento ADN-A depositadas en el NCBI para el virus PepGMV.



**Figura 20.** Árbol filogenético con secuencias de la proteína rep del NCBI para el virus PHYVV

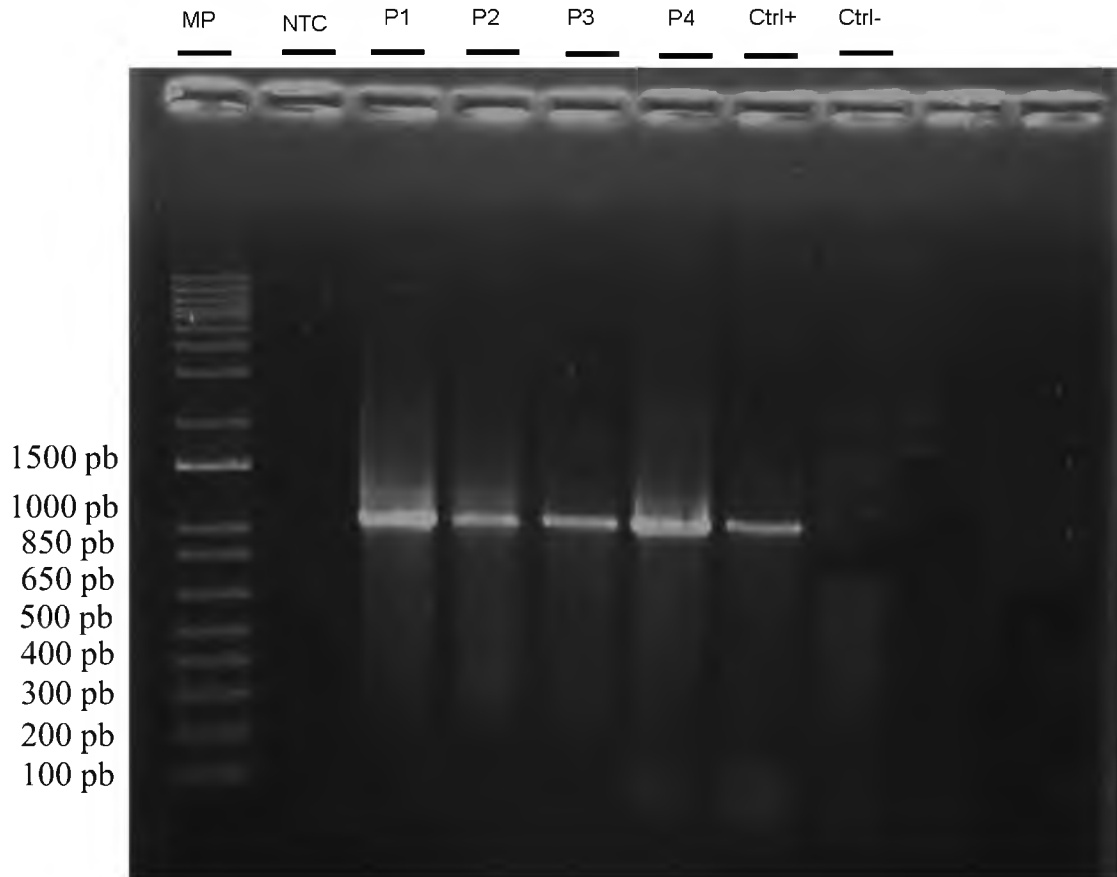
## **7.8. Hospederos de la familia Solanaceae**

Ambos genotipos presentaron síntomas de virosis, como la deformación de la lámina foliar, al igual que plantas con tamaño reducido, resaltando hojas con moteado o manchas amarillas. En el caso de las plantas del municipio de Isla, el total del área foliar presentó deformación, pero era más severo en los puntos de crecimiento u hojas jóvenes, los frutos presentaron un menor tamaño, lo que se reduce en frutos que no cumplen con la calidad para venta en mercados, la severidad de los síntomas se puede atribuir a la presencia de ambos virus en este genotipo. El caso del municipio de José Azueta, la planta presentó un verde brillante de igual manera un enchinamiento o deformación de la lámina foliar, la planta se tornó más pequeña comparadas con las plantas sanas, los frutos fueron más pequeños, la clorosis no se presentó de manera severa (Figura 21). Ambos cultivos se encontraban en condiciones de campo abierto, el híbrido Rey Pakal con sistema de riego por goteo y la variedad Jaguar en condiciones de temporal.



**Figura 21** Muestras recolectadas de chile habanero A Y B) plantas del municipio de Isla, comunidad el carrizo, habanero Rey Pakal C y D) plantas de habanero Variedad Jaguar, del municipio de José Azueta.

Derivado de los análisis realizados a las muestras obtenidas de chile habanero, chile chilpaya, así como hierba mora, se obtuvo como producto de PCR un amplicón, dando positivo a PepGMV (Figura 22). A pesar de que la hierba mora no presentó síntomas, el producto de PCR dio positivo a virus (Figura 23).



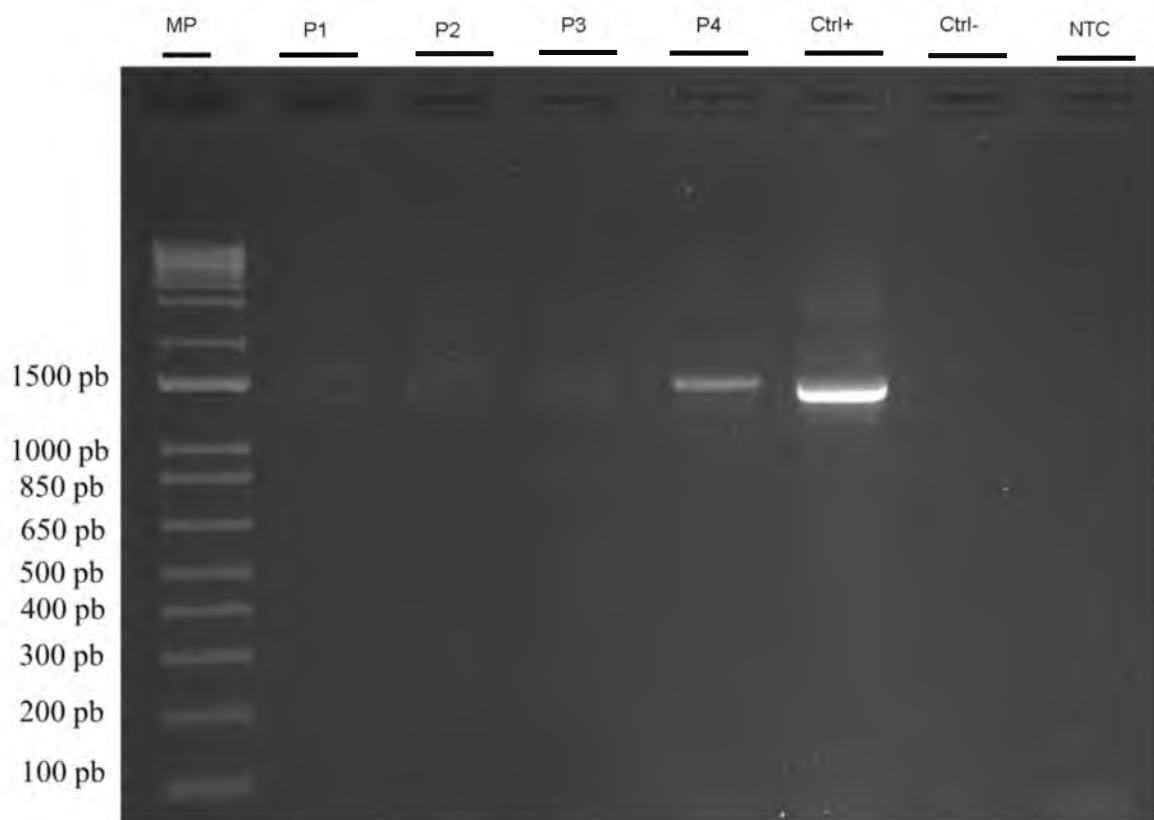
**Figura 22.** Productos de PCR para posibles hospederos del virus del mosaico dorado del chile. MP= Marcado de peso; NTC= Control negativo para oligonucleótidos; P1= chile habanero (Jaguar), P2= chile habanero (Rey Pakal); P3=Chile chilpaya; P4= Hierba mora; Ctrl+= Control positivo; Ctrl-=Control negativo (Planta sin signos de infección)

En la figura 23 se muestra una planta de hierba mora, la cual es usada para consumo en la región por ello la mayor parte de los productores las mantienen dentro de los terrenos de cultivo. En el caso de la planta analizada, se apreció que no presentó algún síntoma característico de plantas infectadas con virus, ya que no se observó ningún tipo de deformación en la lámina foliar, así como ausencia de algún tipo de clorosis o moteado, a pesar de estar en conjunto con una planta de chile.



**Figura 23.** Planta de hierba mora, localizada en un cultivo de chile soledad, A) Planta de chile soledad y B) planta de hierba mora, recolectada para análisis con técnica de PCR.

Por su parte el chile habanero dio positivo, para PHYVV, en una muestra recolectada en el municipio de Isla, perteneciente al estado de Veracruz (Figura 24).



**Figura 24.** Productos de PCR para detección de virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV). Mp= Marcador de peso; P1=Hierba Mora, P2= Chile chilpaya; P3= Habanero Jaguar; P4= Habanero Rey Pakal; Ctrl+=Control Positivo; Ctrl-= Control negativo; NTC= control Negativo para oligonucleótidos.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. Presencia del virus del Mosaico dorado del chile (PepGMV)

Utilizando la técnica de PCR el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) tuvo una mayor prevalencia, debido a que se tuvo un 100 por ciento de infecciones respecto al número de muestras analizadas, este es uno de los virus del género Begonovirus con una amplia distribución (Torres-Pacheco, 1996). Como infecciones simples en la zona se tuvo una prevalencia de 65.4 por ciento, difiriendo de lo obtenido por Hernández- Espinal *et al.*, (2018) quien reportó una prevalencia de 31.4 % en infecciones simples y 53.7 % respecto a las muestras evaluadas con positivos en chile ancho (poblano), Anaheim, morrón y Cayenne. Por otra parte, Gracia-Medrano *et al.* (2022) reportaron un 82.5 % en infecciones simples, detectadas en hojas de diferentes especies de *Capsicum* y en algunas malezas, en el estado de Yucatán, teniendo una mayor prevalencia a la obtenida en el presente estudio.

En países como Colombia evaluaron variedades de chile como cayena, habanero, tabasco y jalapeño, en donde la presencia de la familia de este virus fue de 85.5 % de diez municipios muestreados (Vaca-Vaca *et al.*, 2019). De la misma manera se ha reportado infecciones en Costa Rica donde se detectó en 18,2 % en plantas de pimiento dulce, sin embargo, para el municipio de Cartago, su presencia fue del 100 % (Barboza *et al.*, 2017) coincidiendo con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde los municipios de Loma Bonita e Isla presentaron un 100% de infecciones simples de PepGMV, mientras que los municipios José Azueta y Tuxtepec presentaron 67% y 33% respectivamente de infecciones simples.

Uno de los factores que podrían influir en la distribución de este patógeno son las condiciones en las que se establece el cultivo. En condiciones de campo abierto se presenta una mayor diversidad, debido a que el control de los vectores es menor a diferencia de condiciones protegidas donde el control de diversos factores ayuda a la prevención, así como a detener la propagación. En Costa Rica se destacó infecciones de PepGMV de 74% en condiciones de campo y en invernadero un 12.9 % (Barboza *et al.*, 2017), lo cual explicaría que las condiciones en las que se

establece un cultivo influyen mucho en la frecuencia, así como en la diversidad de Begonovirus.

## **8.2. Presencia del Virus de la vena Amarilla del Chile Huasteco (PHYVV)**

PHYVV es otro de los virus de bipartita de importancia ya que afecta cultivos de importancia económica de la familia solanácea, principalmente chile, reportado por primera vez en México en 1993 (Torres-Pacheco, 1996). En el presente estudio se detectó su presencia en dos municipios de los evaluados, infectando plantas de chile soledad en dos genotipos, criollo y un mejorado (CHISER-522). A pesar de esto, su presencia fue menor en comparación con el virus PepGMV. De acuerdo a Hernández-Espinal *et al.* (2018) el virus PHYVV es el más predominante en cultivo de chile. En Sinaloa, las infecciones simples de este virus se presentaron con un porcentaje mayor al PepGMV, con 74.4% para cultivos de chile serrano y jalapeño, difiriendo de los resultados obtenidos en el presente estudio, de igual manera no se detectó la presencia de infecciones simples de este patógeno en el cultivo de chile soledad. En el estado de Yucatán, las evaluaciones en especies de *Capsicum*, habanero y algunas malezas, reportan su presencia en solo un 5% (Gracia-Medrano *et al.*, 2022) lo cual indica una menor presencia

## **8.3. Detección de infecciones mixtas.**

Dentro de los dos virus que fueron reportados en el presente estudio, cabe señalar que solo uno de ellos se presentó en infecciones simples (PepGMV), mientras el otro su presencia fue en conjunto o mediante una infección mixta (PHYVV). Dos de los municipios muestreados, dieron positivo a los dos begomovirus, en este caso fueron José Azueta y dos localidades del municipio de Tuxtepec (San Felipe de la Peña y Lázaro Cárdenas) infectando genotipos criollos y mejorados (CHISER-522) respectivamente, representado un 34.6% respecto al total de las muestras analizadas. Las infecciones mixtas se pueden dar entre begomovirus, Morales-Aguilar *et al.*, (2019) reportaron infecciones mixtas entre tres begomovirus,

PepGMV-TYLCV-PHYVV, así como TYLCV-PepGMV infectando híbridos de chile en México.

El PHYVV y PepGMV son virus asociados y se presentan en infecciones mixtas. Ambos virus fitopatógenos presentan la distribución más amplia en México. Las infecciones que se dan entre ambos virus son recurrentes en los cultivos hortícolas en el país, donde la distribución e infección de los mismo suelen sobreponerse (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Hernández- Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019; Gracia-Medrano *et al.*, 2022).

Hernández- Espinal *et al.*, (2018) señalaron a PHYVV como un virus predominante en cultivo de chile, detectando así su presencia en genotipos como serrano, jalapeño y ancho, que al presentarse en infecciones mixtas con PepGMV alcanzó hasta un 38% en predominancia, siendo similares a los datos obtenidos en la presente investigación donde se presentó en 34.6 %. Respecto a su prevalencia por municipio, esta fue de 33.3% y 66.6 % en José Azueta, Ver y Tuxtepec, Oax respectivamente con infecciones mixtas de PHYVV-PepGMV, con mayor presencia en genotipos criollos. De igual manera, Gracia-Medrano *et al.*, (2022) analizaron el género *Capsicum* en la península de Yucatán para plantas cultivadas, semicultivadas y silvestres obteniendo, asociaciones de igual manera entre PepGMV-PHYVV en habanero, y en chile dulce PepGMV-TYLCV, destacando que las infecciones mixtas se presentaron principalmente en chiles cultivados.

Por su parte Gonzales-Franco *et al.* (2014), reportaron cerca de 12 virus dentro de los cuales se presentaron infecciones mixtas de PHYVV-PepGMV en la zona sur de Chihuahua con una prevalencia y severidad del 44%. Lebsky *et al.* (2011), detectó PepGMV en coinfección con TYLCV en tomate y en chile al igual que en infección mixta entre un fitoplasma y ambos virus.

Las infecciones mixtas suelen ser comunes en cultivos de chile, dando pauta a que este pueda influir en la severidad con la que se pueden presentar los síntomas en los cultivos (Morales-Aguilar *et al.*, 2019). La interacción que se presenta entre PepGMV-PHYVV da lugar a sinergismo entre estos dos patógenos, ya que los síntomas que presentan las plantas infectadas son más severos ocasionando que

aumente la gravedad de la patología (Méndez-Lozano, 2003; Hernández- Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019).

Este tipo de interacciones brinda la posibilidad a estos virus de llevar a cabo recombinaciones, lo cual ayuda en el surgimiento de una nueva recombinación que presente sintomatología más severa (Lafeuvre y Moriones, 2015; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). Esto también conlleva a que exista un fuerte potencial en la variabilidad de los begomovirus, la presencia de genomas virales y ciclos cortos de replicación de las células y así favorecer la presencia de mutaciones (Méndez-Lozano, 2003; Rentería-Canett *et al.*, 2011; Lafeuvre y Moriones, 2015; Hernández- Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019).

La diversidad genética que se presentan en estas especies, de igual manera el aumento de las mutaciones neutrales en PepGMV está asociado a la transformación del hábitat. PepGMV es un virus con una alta tasa de recombinación dependiendo del hábitat, mientras que PYHVV su frecuencia es similar en todos los hábitats (Rodelo-Urrego *et al.*, 2015). En algunos países como Brasil, Argentina, la presencia de ambos Begonovirus causa pérdidas en el rendimiento que van del 20 hasta el 50 % (Inoue-Nagata, *et al.*, 2016; Bornancini *et al.*, 2020).

#### **8.4. Sintomatología**

Las plantas de Chile están expuestas a los patógenos como lo son los virus, esto debido a que, al ser un cultivo en condiciones de temporal, la propagación de la enfermedad es aún más efectiva debido a la presencia de posibles vectores que ayudan en la diseminación de la enfermedad. Algunos síntomas que no eran tan marcados como en otras zonas, puede deberse al tiempo de infección o a la presencia del agente causal en el sistema de la planta infectada.

Los Begonovirus pueden presentar síntomas como mosaicos, motas, rayas, deformación de las hojas, enanismo, coloración amarillenta o clorosis (Velarde-Felix *et al.*, 2018). Los síntomas que se presentaron para cada uno de los virus involucrados suelen ser compartidos y cuando son de manera conjunta dificulta la

identificación del patógeno específico que está generando el daño. La presencia de plantas con clorosis, deformación de la lámina foliar, frutos pequeños, así como el retraso del crecimiento en chile soledad, muestra sintomatología similar a la reportada por Gracia-Medrano *et al.*, (2022), en *Capsicum annuum var. annuum*, donde se observó síntomas como mosaicos dorados, deformación de la hoja, así como un retraso en el crecimiento. El chile dulce y habanero fueron los que mostraron los síntomas más notorios.

De acuerdo con Inoue-Nagata *et al.*, (2016), las plantas que son infectadas por geminivirus tienden a mostrar un gran rango de síntomas, incluyendo retraso en el crecimiento de la planta, distorsión de las hojas, estrías y crecimiento distorsionado en plantas monocotiledóneas, arrugamiento, distorsión de hojas, mosaico/moteados verdosos o dorados, manchas amarillas, así como amarillamiento intervenal en plantas dicotiledóneas.

### **8.5. Filogenia**

De acuerdo con los árboles filogenéticos obtenidos y al realizarse la comparación con las secuencias obtenidas en trabajos anteriores se encontró similitud y baja variación genética del PepGMV en muestras evaluadas en el presente trabajo con las reportadas por otros autores (Brown, 2005; Carrillo-Tripp *et al.*, 2009; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015), lo que indica que estos virus son similares a los reportados en México, así como en otros países. Referente al PHYVV la variación genética que se presenta es menor, esto comparado con las secuencias obtenidas en especies pertenecientes a la familia solanácea, así como el reporte de una especie en la familia cucurbitácea (Rodelo-Urrego *et al.*, 2015; Sanchez-Chavez *et al.*, 2020)

Con ello se amplía la distribución de ambos virus, de igual manera se genera información que ayude a la caracterización del genoma para estos virus.

### **8.6. Hospederos de la familia solanácea**

Los virus, así como otros patógenos, suelen tener hospederos alternativos, en donde se mantienen latentes hasta el momento en que comienza un nuevo ciclo

productivo del cultivo principal. En la región se detectó como hospedante alternativo el chile chilpaya, chile habanero y hierba mora, este último como un hospedante asintomático para el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV). Cabe señalar que la hierba mora es una arvense, la cual es utilizada por la población para consumo, por lo que muchos de los productores los mantienen dentro de sus campos de cultivo, evitando su eliminación al momento de realizar labores de limpieza. La hierba mora pertenece a la misma familia que el chile soledad, por lo que se probó su posible infección con alguno de los virus a pesar de no presentar ningún tipo de síntoma. El virus se limita a infectar cultivos de la familia solanácea, en Baja California se reportó como cultivos hospederos el toloache, manzanita del Perú y tabaquillo silvestre. De igual manera se tuvo este último como asintomático (Peña *et al.*, 2004). En el estado de Yucatán se reportó como plantas hospederas al chile habanero, así como un chile regional y una maleza que presentaban sintomatología característica de virus (Gracia-Medrano *et al.*, 2022).

Para el cultivo de chile habanero en el municipio de CD. Isla, dio positivo a PHYVV, el cual se ha reportado de igual manera en otros trabajos como hospedero de este virus, así también lo reportó Vaca-Vaca *et al.*, (2019) en Colombia, y por Gracia-Medrano *et al.*, (2022) en el estado de Yucatán en conjunto con PepGMV en cultivos de chile habanero. Para este virus se contemplaba que solo afectaba a cultivos de la familia solanácea, sin embargo, se reportó su presencia infectando cultivo de soya en el estado de Sinaloa con ello se amplió el rango de familias en donde se desarrolla este virus (Velarde-Félix *et al.*, (2018).

La importancia de la detección de los virus, principalmente del género Begomovirus, es debido a que al ser un virus de fácil dispersión y sobre todo de estar asociado con un vector tan efectivo como mosca blanca (*Bemisa tabaci*) requiere de técnicas más adecuadas para su manejo agronómico (Luan *et al.*, 2013), debido a que suele tener hospederos alternos, dentro de los cuales destacan algunas malezas.

## 9. CONCLUSIONES

Los virus presentes en el cultivo de chile soledad, fueron el Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) y el Virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV). Ambos virus fitopatógenos se reportan por primera vez en la región y a su vez se reporta por primera vez infectando al cultivo de chile soledad.

El virus con mayor presencia en la región fue el PepGMV el cual se manifestó tanto en plantas mejoradas, así como en cultivos con genotipos criollos. Las infecciones mixtas de PepGMV-PHYVV, se manifestaron en dos municipios: José Azueta y Tuxtepec.

Derivado de los análisis filogenéticos se obtuvieron secuencias que tienen modificaciones en su ADN, lo cual infiere en las condiciones ambientales, así como distancias entre los municipios muestreados.

Existe un mejor conocimiento acerca de la distribución de los virus PepGMV y PHYVV, así mismo se da a conocer algunos hospederos alternativos que albergan el virus temporalmente como chile habanero (*Capsicum chinense* Jaq.), chile chilpaya (*C. annuum var. glabriusculum* L. ), hierba mora (*Solanum nigrum* L.). La hierba mora es una fuente de inóculo importante debido a la ausencia de síntomas, además de mantenerse dentro del cultivo como una planta de consumo, ayudando a la propagación del patógeno.

## 10. PERSPECTIVAS

Conociendo la distribución que tienen los begomovirus encontrados en la región se espera que esto brinde una pauta para la realización de más trabajos en los que se pueda evaluar más plantas silvestres que puedan funcionar como reservorios temporales de los virus. Así mismo poder llevar a cabo un manejo adecuado en la prevención de infecciones virales mediante el control de los principales vectores. Existen algunas técnicas útiles en el control de la diseminación de enfermedades virales como lo son el uso de trampas para control del vector. En el caso de mosca blanca (*B. tabaci*), el uso de barreras vivas incluso el uso de trampas que ayuden a reducir las poblaciones del vector podría ser de utilidad.

La biología molecular es de gran utilidad para la identificación de genes de resistencia en las plantas que permiten limitar los síntomas causados por el virus. Retes-Marijarrez *et al.*, (2016) en un estudio realizado en el noroeste de México, reporta que la variabilidad genética que existe en las poblaciones silvestres de *C. annuum* es muy alta para encontrar genes de resistencia a PYHVV. La activación de estos genes de resistencia ayuda a que se pueda generar una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de esta manera activar mecanismos de señalización en la planta ayudando a combatir al patógeno, como es el caso de la proteína GLP codificada por CchGLP es un componente importante en la resistencia a geminivirus en *Capsicum chinense* (Mejía-Teniente *et al.*, 2015). Por otra parte, el control biológico también es una aplicación útil para el control de las infecciones por ejemplo en El Salvador realizaron pruebas con preparados orgánicos y aplicaciones de *Trichoderma harzianum* Rifai, en fase de plántulas de chile dulce, para inducir resistencia a PepGMV. Esta aplicación de *Trichoderma* tuvo un efecto retardante en la manifestación de los síntomas del virus en la planta, ayudando en el fortalecimiento de las defensas y prolongando el tiempo de incubación (López *et al.*, 2019).

Teniendo identificado los agentes virales se puede realizar estrategias de manejo adecuado, en este caso al ser la mosca blanca el principal vector, se recomienda el control de este insecto. El fin es mantener las poblaciones bajas, complementando el uso de *Trichoderma* en fase de plántulas o semillero y de esta manera ayudar al

desarrollo del sistema de defensas de las plantas una vez que se trasplanten a las áreas de cultivo.

Se recomienda realizar más estudios que ayuden a la generación de alternativas que ayuden a la inducción de resistencia, así como ampliar la búsqueda de hospederos no solo de la familia solanácea.

Se recomienda evitar dejar en las parcelas de cultivo, arvenses como hierba mora, que son hospederos temporales del virus, ayudando a que se propague en el cultivo.

## 11. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Mancilla, C.L., Iturriaga de la Fuente G., Ramírez-Pimentel J.G., Covarrubias-Prieto J., Chablé-Moreno F., Raya-Pérez J.C., 2017. El chile (*C. annum* L.), cultivo y producción de semilla. Ciencia y Tecnol. Agrop. México Vol. 5 Núm. 1: 19-31
- Aguirre H. E. y Muñoz O. V. 2015. El chile como alimento. Revista Ciencia, 16-23
- Ascencio C. D. O. 2013. Evaluación del rendimiento de variedades de chile poblano (*Capsicum annum* L.) en campo abierto y macro túnel. Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía y Veterinaria. Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.: 45 p
- Barahona Pimentel, A. J. (2019). Prospección de virus asociados al cultivo de Pimentón (*Capsicum annum* L.) en Panamá (Doctoral dissertation, Universidad de Panamá. Vicerrectoría de Investigación y Postgrado).
- Barboza, N., Blanco-Meneses, M., Esker, P., Moriones, E., & Inoue-Nagata, A. K. (2018). Distribution and diversity of begomoviruses in tomato and sweet pepper plants in Costa Rica. *Annals of Applied Biology*, 172(1), 20-32.
- Bornancini, V. A., Irazoqui, J. M., Flores, C. R., Vaghi Medina, C. G., Amadio, A. F., & López Lambertini, P. M. (2020). Reconstruction and characterization of full-length begomovirus and alphasatellite genomes infecting pepper through metagenomics. *Viruses*, 12(2), 202.
- Brown, J. K., Idris, A. M., Ostrow, K. M., Goldberg, N., French, R., & Stenger, D. C. (2005). Genetic and phenotypic variation of the Pepper golden mosaic virus complex. *Phytopathology*, 95(10), 1217-1224.
- Cambrón-Crisantos JM, Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna JB, Alcasio-Rangel S, García-Ávila CJ, López-Buenfil JA and Ochoa-Martínez DL. 2019. First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 185-192. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5
- Cih-Dzul, I. R., Jaramillo-Villanueva, J. L., Tornero-Campante, M. A., Schwentesius-Rindermann, R. (2011). Caracterización de los sistemas de producción de

- tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el estado de Jalisco, México. *Tropical and subtropical agroecosystems*, 14(2), 501-512
- Chew, M. Y. I., Vega, P. A., Palomo, R. M., & Jiménez, D. F. (2008). Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). INIFAP-Centro de Investigación Regional Norte Centro. Campo Experimental, La Laguna. México, DF Folleto Técnico, (153), 2.
- Choi, H., Jo, Y., Cho, W. K., Yu, J., Tran, P. T., Salaipeth, L., Choi H. S. and Kim, K. H. (2020). Identification of viruses and viroids infecting tomato and pepper plants in vietnam by metatranscriptomics. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(20), 7565.
- Coordinación General del Comité Estatal de Planeación para desarrollo de Oaxaca (COPLADE), (2017). Diagnóstico Regional Papaloapan. Universidad del Papaloapan.
- Cristancho-Ardila, M. A., Escobar-Ochoa, C., & Ocampo-Muñoz, J. D. (2007). Evolución de razas de *Hemileia vastatrix* en Colombia. *Cenicafé*, 58(4), 340-359.
- de la Osa, A. D., Pantoja, M. Q., & Rodríguez, A. H. (2015). Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa para el diagnóstico molecular de potyvirus que afectan a *Capsicum annuum* L. en Cuba. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46(2), 144-155.
- Encalada, M. C., Morales, C. L., & Santana, J. R. (2014). Competitividad Mundial de la Producción de Chile Verde de México. *Revista de Economía, Facultad de Economía, Universidad Autónoma de Yucatán*, 31(83), 96-96.
- Enciso A. M. A., 2011, Desarrollo de un controlador de variedad para invernadero de jitomate de variedad Aztec. (Tesis de Licenciatura). División de Ingeniería Mecánica e Industrial. Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de México, 116 p.
- FAO, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura 2018. El trabajo de la FAO sobre el cambio climático, Conferencia de las naciones unidas sobre el cambio climático 2018. Boletín Informativo,

Disponible : <https://www.fao.org/3/ca2607es/CA2607ES.pdf> Consultado (12/enero/2022)

- Fierro, F. F. (2014). Electroforesis de ADN. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 27.
- García M. C.A., García M. A. M., Castelum F. W. K., Enríquez G. F., Pérez S. M. 2016. Virosis Vegetal: Fitopatología de cultivos en México, Primera edición, México.
- Garza U.E. 2002. Manejo integrado de las plagas del chile en la Planicie Huasteca. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Ébano. Folleto Técnico Núm. 10. San Luis Potosí, México. 47 p.
- Gergerich, R. C., y Dolja, V. V. (2006). Introducción a los Virus Vegetales, el Enemigo Invisible. Trans. Silvina LG. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0122-01
- Gilbertson, R. L., Batuman, O., Webster, C. G., & Adkins, S. (2015). Role of the insect supervectors *Bemisia tabaco* and *Frankliniella occidentalis* in the emergence and global spread of plant viruses. *Ann. Rev. Virol.* 2, 67–93. doi: 10.1146/annurev-virology-031413-085410
- González-Garza R. 2017. Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, Vol. 35 (3): 591-610 pp. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-1> ISSN 0185-3309
- González-Franco, A. C., Gill Langarica, E. M., Robles Hernández, L., Núñez Barrios, A., Pérez Leal, R., Hernández Rodríguez, O. A., & Pérez Moreno, L. (2014). Detección de virus que afectan al cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 32(1), 38-51.
- Gracia-Medrano, R. M., Maldonado-Borges, J. I., Sánchez-Cach, L. A., Minero-García, Y., Hernández-Zepeda, C., & Moreno-Valenzuela, O. A. (2022). Preliminary identification and phylogenetic relationships of begomoviruses associated with *Capsicum* spp. in the Yucatan peninsula, Mexico. *Revista mexicana de fitopatología*, 40(3), 377-400.
- Hernández-Espinal, L. A., Enríquez-Verdugo, I., Melgoza-Villagómez, C. M., Retes-Manjarrez, J. E., Velarde-Félix, S., Linares-Flores, P. J., & 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), 149-157.
- Hernández-Hernández, I., Medina-Miranda, E., Pérez-Pérez, R., Chávez-Avilés, M. N., & Sánchez-Calderón, L. (2022). Etiología de la marchitez del chile (*Capsicum annuum* L.) de una zona productora de Zacatecas, México. *Ciencia Transdisciplinar en la Nueva Era*, 84.
- Hernández-Pérez, T., Gómez-García, M. D. R., Valverde, M. E., & Paredes-López, O. (2020). *Capsicum annuum* (hot pepper): An ancient Latin-American crop with outstanding bioactive compounds and nutraceutical potential. A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 2972-2993.
- Hogenhout, S. A., Ammar, E. D., Whitfield, A. E., & Redinbaugh, M. G. (2008). Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 327-359.
- Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F., & Gilbertson, R. L. (2016). A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira*, 34, 8-18.
- Jo, Y., Choi, H., Kim, S-M., Kim, S-L., Lee, B.C., Cho, W.K. 2017. The pepper virome: natural co-infection of diverse viruses and their quasispecies. *BMC Genomics* 18:453.
- Lefeuvre, P., & Moriones, E. (2015). Recombination as a motor of host switches and virus emergence: geminiviruses as case studies. *Current Opinion in Virology*, 10, 14-19
- Lebsky, V., Hernandez-Gonzalez, J., Arguello-Astorga, G., Cardenasconejo, Y., & Poghosyan, A. (2011). Detection of phytoplasmas in mixed infection with begomoviruses: a case study of tomato and pepper in Mexico.
- López, M. T., Rivas-Flores, A. W., & Cienfuegos, M. P. (2019). Inducción de resistencia al virus del mosaico dorado del chile dulce (*Capsicum annuum* L.) mediante el uso de preparados orgánicos y *Trichoderma harzianum* Rifai en fase de vivero. *Revista Agrociencia*, 3(13), 50-63.

- Li, P., Shu, Y. N., Fu, S., Liu, Y. Q., Zhou, X. P., Liu, S. S., & Wang, X. W. (2017). Vector and nonvector insect feeding reduces subsequent plant susceptibility to virus transmission. *New Phytologist*, 215(2), 699-710.
- Liu, B., Preisser, E. L., Chu, D., Pan, H., Xie, W., Wang, S., ... & Zhang, Y. (2013). Multiple forms of vector manipulation by a plant-infecting virus: *Bemisia tabaci* and tomato yellow leaf curl virus. *Journal of virology*, 87(9), 4929-4937.
- Luan, J. B., Yao, D. M., Zhang, T., Walling, L. L., Yang, M., Wang, Y. J., & Liu, S. S. (2013). Suppression of terpenoid synthesis in plants by a virus promotes its mutualism with vectors. *Ecology Letters*, 16(3), 390-398.
- Mauck, K. E. (2016). Variation in virus effects on host plant phenotypes and insect vector behavior: what can it teach us about virus evolution?. *Current opinion in virology*, 21, 114-123.
- Mejía-Teniente, L., Joaquin-Ramos, A. D. J., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R. F., Guevara-Olvera, L., Rico-García, E., & Guevara-Gonzalez, R. G. (2015). Silencing of a germin-like protein gene (CchGLP) in geminivirus-resistant pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) BG-3821 increases susceptibility to single and mixed infections by geminiviruses PHYVV and PepGMV. *Viruses*, 7(12), 6141-6151.
- Méndez-Lozano, J., Torres-Pacheco, I., Fauquet, C. M., & Rivera-Bustamante, R. F. (2003). Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: Pepper huasteco virus and Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 93(3), 270-277.
- Morales-Aguilar, J. J., Rodríguez-Negrete, E. A., Camacho-Beltrán, E., López-Luque, C. A., Leyva-López, N. E., Jiménez-Díaz, F., ... & Méndez-Lozano, J. (2019). Identification of Tomato yellow leaf curl virus, Pepper huasteco yellow vein virus and Pepper golden mosaic virus associated with pepper diseases in northern Mexico. *Canadian journal of plant pathology*, 41(4), 544-550.
- Moreno-Delafuente, A., Garzo, E., Moreno, A., & Fereres, A. (2013). A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. *PLoS One*, 8(4), e61543.

- Nemes, K., & Salánki, K. (2020). A multiplex RT-PCR assay for the simultaneous detection of prevalent viruses infecting pepper (*Capsicum annuum* L.). *Journal of Virological Methods*, 278, 113838.
- Ng, J. C., & Falk, B. W. (2006). Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 44, 183-212.
- Peña, R. J. H., Juárez, R. V., & Bustamante, R. F. R. (2004). Rango de hospedantes, incidencia y filogenia del virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en Baja California Sur, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 206-215.
- Pérez Cardona, A., & Gómez Piñerez, L. M. (2018). Electroforesis de ácido desoxirribonucleico (ADN) en gel de agarosa. Recuperado de: <https://dspace.tdea.edu.co/handle/tdea/1468>
- Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R., & Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology journal*, 8, 1-14.
- Retes-Manjarrez, J. E., Hernández-Verdugo, S., Pariaud, B., Melgoza-Villagómez, C. M., Pacheco-Olvera, A., Parra-Terraza, S., & Garzón-Tiznado, J. A. (2016). Detección de resistencia al virus huasteco vena amarilla del chile y su heredabilidad en genotipos. *Interciencia* Vol. 41(8)
- Robles- Hernández, L., González-Franco, A.C., Gill-Langarica, E.M., Pérez-Moreno, L., López-Díaz, J.C. 2010. Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección TECNOCENCIA Chihuahua, vol. 4 (2): 72-86 pp.
- Robles-Hernández, L., Salas-Salazar, N. A., Hernández-Huerta, J., & González-Franco, A. C. (2019). Principales enfermedades que afectan el potencial productivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua, México, pp:21. En Porras F.D.A.; Luján A. R. S.; Flores C. M.A. Primera Edición. Chiles Regionales: Variedad, Producción e Inocuidad, Convención Mundial del Chile, Universidad Autónoma de Chihuahua, México: 136 pp.

- Rodelo-Urrego, M., García-Arenal, F., & Pagan, I. (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).
- Rodríguez-Mendoza, J., García-Ávila, C. D. J., López-Buenfil, J. A., Araujo-Ruiz, K., Quezada-Salinas, A., Cambrón-Crisantos, J. M., & Ochoa-Martínez, D. L. (2019). Identification of Tomato brown rugose fruit virus by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP). *Revista mexicana de fitopatología*, 37(2), 345-356.
- Rodríguez L. Y y Carbonell R. J.A. 2012. Comportamiento del virus y de la papa en el cultivo del pimiento (*Capsicum annuum* L.) *Temas de Ciencia y Tecnología* 16(46), 21-40.
- SADER, Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. 2024. México, entre los principales productores de chile verde en el mundo: Agricultura Ciudad de México: Comunicado: 28 de enero. Pagina de consulta: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/mexico-entre-los-principales-productores-de-chile-verde-en-el-mundo-agricultura?idiom=es>
- SAGARPA: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación. 2008. Principales enfermedades del chile (*Capsicum annuum* L.). Folleto técnico Núm. 15: 32pp ISBN :978-607-425-055-08.
- SAGARPA, Secretara de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2012, México: El sector agropecuario ante el desafío del cambio climático. Food and Agriculture Organization (FAO). Volumen 1. 428 p.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2017) Chiles y pimientos mexicanos. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. 1-32.
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B. W., & Turina, M. (2016). A new Tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology*, 161(2), 503-506.
- Sanchez-Chavez S, Regla-Marquez CF, Cardenas-Conejo ZE, Garcia-Rodriguez DA, Centeno-Leija S, Serrano-Posada H, Liñan-Rico A, Partida-Palacios BL,

- Cardenas-Conejo Y. 2020. First report of begomoviruses infecting *Cucumis sativus* L. in North America and identification of a proposed new begomovirus species. *PeerJ*, 8, e9245 <https://doi.org/10.7717/peerj.9245>
- Shi, X., Zhang, Z., Zhang, C., Zhou, X., Zhang, D., & Liu, Y. (2021). The molecular mechanism of efficient transmission of plant viruses in variable virus–vector–plant interactions. *Horticultural Plant Journal*, 7(6), 501-508.
- Sistema de Información Agrícola y Pesquera (SIAP), 2010. Un panorama del cultivo de chile. Recuperado de: <http://infosiap.siap.gob.mx/images/stories/infogramas/100705-monografia-chile.pdf>
- SIAP, Sistema de Información Agrícola y Pesquera. 2024. Cierre de producción agrícola. Anuario Estadístico de Producción Agrícola por Entidad Federativa. Página de consulta: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> Consultado: 14/Marzo/2024
- Su, Q., Preisser, E. L., Zhou, X. M., Xie, W., Liu, B. M., Wang, S. L., ... & Zhang, Y. J. (2015). Manipulation of host quality and defense by a plant virus improves performance of whitefly vectors. *Journal of Economic Entomology*, 108(1), 11-19.
- Stafford, C. A., Walker, G. P., & Ullman, D. E. (2011). Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(23), 9350-9355.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Brown, J. K., Becerra-Flora, A., & Rivera-Bustamante, R. F. (1996). Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology*, 86(11), 1186-1192.
- Vaca-Vaca, J. C., Morales-Euse, J., Rivera-Toro, D. M., & López-López, K. (2019). Primer reporte de begomovirus infectando cultivos de ají (*Capsicum* spp.) en Colombia. *Acta biológica colombiana*, 24(3), 452-462.
- Velarde-Félix, S., Rodríguez-Cota, F. G., Cortez-Mondaca, E., Saucedo-Acosta, R. H., Melgoza-Villagómez, C. M., & Almeyda-León, I. H. (2018). Primera incidencia del virus de la vena amarilla del chile huasteco en soya en México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9(7), 1389-1398.

- Velásquez-Valle, R., & Amador-Ramírez, M. D. (2014). Epidemiología de virus y fitoplasmas de chile para secado. *Virus y fitoplasmas de chile: una perspectiva regional*. Libro Técnico, (14), 179-204.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L. R., & Mena-Covarrubias, J. (2012). Incidencia y sintomatología de cinco virus en parcelas comerciales de chile seco en Aguascalientes, San Luis Potosí y Zacatecas, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 3(2), 381-390.
- Velásquez-Valle, R., Reveles-Torres, L.R., Chew-Madinaveitia, Y.I. y Mauricio-Castillo, J.A. 2013. Virus y fitoplasmas asociados con el cultivo de chile para secado en el norte centro de México. Folleto Técnico. Núm 49. Campo Experimental Zacatecas. CIRNOC – INIFAP, 54 páginas.
- Zhou, J. S., Drucker, M., & Ng, J. C. (2018). Direct and indirect influences of virus–insect vector–plant interactions on non-circulative, semi-persistent virus transmission. *Current opinion in virology*, 33, 129-136.

## 12. ANEXOS

### Anexo 1. Reacción de C<sub>DNA</sub>

Reacciones	Cantidades (µL)
H <sub>2</sub> O	8
dT	2
Buffer complete	4
dNTP mix	1
DTT stock solution	1
RNAasa Inhibitor	1
Script reverse transcriptase	1
RNA	2
Volumen final	20

### Anexo 2. Protocolo de extracción de productos de PCR con Kit de extracción QIAquick , (QIAGEN.)

1. Mezclar 80 µL de producto de PCR con 240 µL de buffer QG.
2. Incubar a 50° C por 10 minutos (la mezcla debe tornarse amarilla).
3. Añadir isopropanol (80 µL) a la mezcla.
4. Colocar la columna en un tubo de recolección y añadir la mezcla, centrifugar por 1 minuto a 17, 000 g. descartar el líquido y colocar la columna en el mismo tubo.
5. Si el ADN se secuenciará, añadir 500 µL de Buffer QG a la columna y centrifugar por 1 minuto. Descartar el líquido y colocar en el mismo tubo.
6. Para lavar, añadir 750 µL de Buffer PE a la columna y centrifugar por un 1 minuto. Descartar el líquido y colocar el mismo tubo.  
Si el ADN será usado en procesos sensibles a sales, dejar reposar la columna de 2-5 minutos más después de agregar el buffer PE. Centrifugar 1 minuto para remover el Buffer residual.
7. Colocar la columna en el tubo de 1.5 mL limpio.
8. Para eluir el ADN añadir 40 µL de Buffer EB o agua libre de nucleasas en el centro de la membrana y centrifugar 1 minuto.

Para incrementar la concentración del ADN, añadir en dos partes el Buffer EB.

Se puede dejar reposar la columna hasta 4 minutos a temperatura ambiente para incrementar el rendimiento del ADN purificado.

9. Cuantificar en Nanodrop y almacenar a -20 °C hasta su uso.

**Anexo 3.** Tabla con concentraciones y absorbancia para cada muestra de DNA de las localidades.

Muestras	Concentración (ng/μL)	Absorbancia			
		A260(Abs)	A290(Abs)	260/290	260/230
LBOC-1	4699.9	93.999	40.569	2.32	1.48
LBOC-2	4923.7	98.475	50.736	1.95	1.23
LBOC-3	3261.1	65.222	27.234	2.39	1.19
LBOC-4	4220.1	84.402	43.403	1.94	1.55
SBCS-1	997.5	19.949	11.974	1.67	0.81
SBCS-2	492.7	9.254	2.655	3.48	1.65
SBCS-3	227.3	4.546	2.074	2.19	1.23
SFSCr-1	312.3	6.247	3.557	1.76	0.93
SFSCr-2	1958.2	39.164	25.899	1.51	0.66
SFSCr-3	143.7	2.874	1.045	2.75	1.33
SFSC-1	477	9.539	4.107	2.32	1.15
SFSC-2	478.5	9.569	3.752	2.55	1.56
SFSC-3	569.4	11.388	5.376	2.12	0.82
LCSC-1	305.5	6.11	2.791	2.19	2.09
LCSC-2	1582	31.64	11.461	2.76	1.46
LCSC-3	2210.9	44.218	10,085	4.38	1.25
LCSC-4	433	8.661	4.004	2.16	1.94
JASC-1	148.2	2.964	1.407	2.11	0.9
JASC-2	762.2	15.245	2.282	1.84	0.82
JASC-3	1615.3	32.307	15.957	2.02	1.76
ECSC-1	647.1	12.941	5.313	2.44	1.52
ECSC-2	235.3	4.705	1.879	2.5	0.85
ECSC-3	609.6	12.192	5.363	2.27	1.12
BSC-1	1712.8	34.255	12.911	2.65	1.63
BSC-2	941.1	18.822	7.285	2.58	1.39
BSC-3	217.2	4.343	1.58	2.75	1.24

Codigo: LBOC; Loma bonita, Criollo, SBCS; San Benito Soledad Criollo; SFSCr; San Felipe soledad criollo, SFSC; San Felipe soledad Chiser, LCSC; Lázaro cárdenas, soledad, criollo, JASC; José Azueta soledad criollo, ECSC; el carrizo, soledad criollo. BSC; Bethania soledad criollo, BHM; bethania, hierba mora.

**Anexo. 4** Secuencia con mayor similitud con los aislados de Loma Bonita, Bethania, San Felipe, José Azueta, El Carrizo y Lázaro Cárdenas, para PepGMV

1. Virus del mosaico dorado del chile, Segmento DNA-A, secuencia completa, aislado PVE95L2004 (LN848791)

ACTGGATGGCCGCGATTTTTTTGGAGTCTTTGGGGGACCACTCACAATGGAG  
GGCCGAGATTAATAGATAAAGGGATGGGACCACCAATTATTGGATATTTGAC  
TGACCAATCACATCCCGCCTGTCAAGTCTAGATATTTGTGCCTTGGTGACAAA  
GGTGTGGTCTATAAATGCACGTGTATGTGCATTAACACCTTTAATTCAAATG  
GTTAAGCGGGATGCCCATGGCGTTTAATGGCGGGGACCTCTAAGGTTTCCC  
GCTCAGCTAATTATTACGTGGCACGGGTATGGGCCCTAAATTCGATAAGGC  
CGCTGCTTGGGTAAACAGGCCCATGTACAGGAAGCCAGGATATATCGGACG  
TATAGAAGCCCAGATGTTCCCTAGAGGTTGTGAAGGGCCTTGTAAAGGTCCAGT  
CATTCGAGCAGCGGCATGATATCTCCCATGTTGGGAAGGTCATGTGCATTTCT  
GACGTGACACGTGGTAACGGTATCACTCATCGTGTAGGCAAGCGTTTCTGCG  
TCAAGTCTGCATACGTTCTGGGTAAGATATGGATGGACGAAAATATCAAGCTC  
AAGAACCACACCAACAGCGTCATGTTTTGGCTCGTGAGAGATAGGAGACCAT  
ATGGTACCCCTATGGATTTTGGGCAGGTGTTCAACATGTATGACAACGAGCCC  
AGTACAGCCACTGTGAAGAACGATCTTCGCGATCGTTTCCAAGTCATGCACAG  
GTTCTCGGCTAAGGTCACAGGTGGACAGTATGCCAGCAACGAGCAGGCGTTG  
GTTAGGCGTTTCTGGAAGGTGAACAACACTACGTTGTCTACAACCACCAGGAAG  
CTGGCAAATACGAGAATCATACTGAGAACGCCCTCCTATTGTATATGGCATGT  
ACTCATGCATCTAACCCCGTGTACGCCACATTGAAAATTCGAATCTATTTTTAT  
GATTCGATAACAAATTAATAAAGTTTGAATTTTATTTTCATGATTTTCAAGTACAG  
CATTTACATAGGATTTGTCCGTGCAAAACGAACAGCTCGTATTACATTGTTTA  
TGCCTATGGCCCCTAGCCTATGTAAATACAACATGACGCGAAATTTGAATCTA  
CTTAAATATGTCGTCCCAGAAGCTGTCATCGAAGTCGTCCAGATTTGGAAATG  
GAGGTATGCCTTGTGGAGAGCCAATGCTCGGCGTAGGTTGTGGTTGAACCGG  
ACTTCGATGTGGTATATCCTGGTCTGGTGAACAACGGGTCTCCACGTGCT  
GTATCCTGAAAATAGGGGATTTGGAACCTCCCAAATAAAAACGGAATTCTCT  
GCCTGATGCACAGTGATGCTCTCCCCGGTGCCTGAATCCATTATTAGCGCAG  
TTGATGTGGAGAAAGATAGAGCAGCCGAGTTTAGGTCTATGCGTCTGCTCC  
GGATAGGTCGCTTCTTAGCTATCCTGTGCTGTGCTTTTATAGAGGGGAGCGT  
GGAGGATGACGAATTGAGCATTTTTTTTGTGTCCACGCTCTCAATGATGCATTT  
TCCTCTTTGTTGAGGAAAGCTATATAGCTGCTACCTTCCCCTGGACTGCACAG  
CACAATTGATGGTATCCCGCCTTTAATTTGAACTGGCTTTCCGTATTTACAGTT  
GGACTGCCAGTCTTTTTGGCCCCAATAAGCTCTTTCCAGTGTTTCAGCTTTA  
GATATTGGGGCGTGATATCATCAATGACGTTATACTCCACATCGTTGGAATAG  
ACCTTTGCATTGAAATCAAGATGACCGCTCAAATAATTATGTGGGCCTAATGC  
ACGTGCCACATTGTCTTGCCGCTTCGCGAATCACCTCAATGACAATACTAA  
TCGGTCTATCTGGCCGCGCAGCGGAACTCCGACCAAATATTAGCAACCCA  
ATGTTGCATATCCTCAGGAACGTTATTAACGAGGATAATGGATAAGGGGGAG  
TCCATGGCGTAGGAGGAGTTGTAATAGGCGCTCGATGTTAGCCGATATGTT  
ATGATAACTAACAATGAACGTTTTAGGATCACCAGCCTTGATTATGTCCAGCG  
CCTCCACCGCACTTGCAGCATTACTGCGTTATAGTAGACGTCGTCTTTATTT  
GCTTTGGAACCCCGGAAACTTTGTACTTCCCAGTTTCACAATAATCACCATC  
TTTCGTGATGTAATTCTTTACGGCATTGCGTCTTTGGCTGCCTGAACGTTT

GGTGAAACTGGGCTGATCTCCGGGGGTGAGTAATGTCAAAGAAACGTGCATC  
TTTGATGTTGCACTTTCCACTTAGTTGGATTAGACAGTGCAAGTGCGGGAACC  
CATCGGAATGCTCCTCTCGTGATACCCGAATATAGCTGGGTTTTACCACTGAC  
CATTTTAAAGAACGGAGCATTTCGAGAGCTTCATCTTTTGGGATATCACATTGT  
GGATATGTTAAGAAAATGTTTTTACATTGTAAACGAAATGATTTAGGAGGTAGT  
GGCATTTTTGCAAATATGGTGTAGGACTCCAGGAGAGTCCCTCAACTTCTGTC  
ATATATTGTGGAGTCCCTGGAGTCCCTTATATACATAAAGCCTCTTGGGGACTC  
CAAGGGCAAAGCGGCCATCCTATAATATT

**Anexo. 5** Secuencias con mayor similitud con los aislados de San Felipe, José Azueta y Lázaro Cárdenas, para PHYVV.

1. Virus huasteco de la vena amarilla del chile, aislado GAHOD44HUAS (KY366178), gen de la proteína de replicación (rep), Parcial.

AGTCATTGAGGCTTCTATTTTTCTCTTCGCTGAGGTAATCTTTATAGGAGGACT  
GGGGACCGGGATTGCAAAGAAAGATAGTGGGTATCCCACCTTTAATTTGAATT  
GGTTTGCCGATTTTGCAGTTTGATTGCCAATCCCGTTGGGCCCCCATAACTC  
TTTAAAGTGCTTAACATAATGCGGAGGGATGTCATCAATGACGTTATACCATG  
CATTATTGGAGTAGATTTTTGGGCTGAGATCCATATGACCACATATGTAATTGT  
GTGGGCCGAGACTTCGGGCCCATACGTTTTGCCGGTCTCGAAGGACCCCTC  
GACCACTAATGACAATGGTCTCATTGGCCGCGCAGCGGCATCACACACATTTT  
CAGACACCCATTGTGTCATTATTTTCAAGGTACATTATTAAGGACGACAGTTGAA  
ATGGAGGAACCCACGGTTCGGGGGAGTATGAAATATCCGGTTAGCGTTTGA  
CACAATATTATGAAATTGGAGGAAGAAATGCTGGGGTTGTTCTTCTTGATGA  
TCTGCAGAGCTTCTTCTGCAGATGCTGAATTTAACGCCTTAGCATATGTGTCA  
TTAGCAGACTGCTGTCCTCCTTAGCAGATCTGCCGTCTATTTGGAATTCTCC  
CCATTCTACTGTATCGCCGTCTTTGTCGATGTACGTCTTGACATCGGAGCTTG  
ATTTAGCTCCCTGAATGTTCCGGATGGAAATGTGCTGATCTGGTTGAGGATACG  
AGGTCAAAGAATCTGTTGTTCTGTCATTGATATTTTCTTTCGAACTGAATAAGC  
ACGTGCAAATGAGGTTTCCCATCTTCATGAGATTCTTTGCATATCTTGATGTAT  
TTCTTGTTTACCGGCGTCGAGAGATTTTGTATTTGAGCGAGAGCCTCTTCTTT  
GGAAATGGAACATTGAGGATAGGTGAGGAAATAGTTCTTTGCATTTAAACGAA  
ATCGTTTAGGCAATGGCATATTTGTAATAAGAGAGGTGTACACCGATTGGAGC  
TCTTAACCTGTGCTTATGGTATGGTGTATTGGTAGCCAATATATAGTATATGGG  
GAGTATCTAGGATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACCGGA  
TGGCCGACCGCTTCCCTTATCTTGCCGTACGGCTTTAATTTGAATTAAGATG  
TACTTTTTATGCTATCCAATGAGCGTGCCTGCGCAAGCTTAGATAACCGTTC  
CAGACGTGGGGACCAAGTAGTTGATGACCACTTTATTGACTGTCAGCGTATAT  
CA

2. Virus huasteco de la vena amarilla del chile, aislado GAHOD44HUAS (KY499896), gen de la proteína de replicación (rep), Parcial

AGTCATTGAGGCTCCTATTTTTCTCTTCGCTGAGGTAATCTTTATAGGAGGACT  
GGGGACCGGGATTGCAAAGAAAGATAGTGGGTATCCCACCTTTAATTTGAATT  
GGTTTGCCGATTTTGCAGTTTGATTGCCAATCCCGTTGGGCCCCCATAACTC  
TTTAAAGTGCTTAACATAATGCGGAGGGATGTCATCAATGACGTTATACCATG

CATTATTGGAGTAGATTTTTGGGCTGAGATCCATATGACCACATATGTAATTGT  
GTGGGTCCATACTTCCTCCCCCTAATGTTTCTCTCGTCCCTGTAGGGCCCTCA  
ACCACTAATGACAATGGTCTCATCGGCCGCGCAGCGGCATCACACACATTTT  
CAGACACCCATTGTGTCATTATTTAGGTACATTATTAAGGACGACAGTTGAA  
ATGGAGGAACCCACGGTTCGGGGGAGTATGAAATATCCGGTTAGCGTTTGA  
CACAATATTATGAAATTGGAGGAAGAAATGCTGGGGTGTCTTCTTCTGATGA  
TCTGCAGAGCTTCTTCTGCAGATGCTGAATTTAACGCCTTAGCATATGTGTCG  
TTAGCAGACTGCTGGCCTCCTCTAGCAGATCTGCCGTCTATTTGGAATTCTCC  
CCATTCTACTGTATCGCCGTCTTTGTCGATGTACGTCTTGACATCGGAGCTTG  
ATTTAGCTCCCTGAATGTTCCGGATGGAAATGTGCTGATCTGGTTGAGGATACG  
AGGTCAAAGAATCTGTTGTTTCGTGCATTGATATTTTCTTCGAACTGAATAAGC  
ACGTGCAAATGAGGTTGCCCATCTTCATGAGATTCTTTGCATATCTTGATGTAT  
TTCTTGTTTACCGGCGTCGAGAGATTTTGTATTTGAGCGAGAGCCTCTTCTTT  
GGAAATGGAACATTGAGGATAGGTGAGGAAATAGTTCTTTGCATTTAAACGAA  
ATCGTTTAGGCAATGGCATATTTGTAATAAGAGAGGTGTACACCGATTGGAGC  
TCTTTAACCTGTGCTTATTGTATTGGTGTATTGGTAGCCAATATATAGTATATG  
GGAGTTATCTAGGATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACCG  
GATGGCCGACCGCTTCCATTATCTTTCCGTA CTGCTTTAATTTGAATTAAGAT  
GTCAC TTTTAGACTGACCAATGAGGATGCGTCTGGCGAGCTTAGATAACCGTT  
CCAGACGTGGGGACCAAGTAGTGTGGACC ACTTTATTGACTGTCAGCTTATA  
TCA

3. Virus huasteco de la vena amarilla del chile, aislado GCONA21HUAS (KY288518), gen de la proteína de replicación (rep), Parcial

GTCATTGAGGCTCCTATTTTTCTCCTCGCTGAGGTA CTCTTTATAGGAGGACT  
GGGGGCCCGATTGCAAAGAAAGATAGTGGGTATCCACCTTTAATTTGAATT  
GGTTTTCCGTATTTACAGTTTGATTGCCAATCCCGTTGGGCCCCCATAACTC  
TTTGAAGTGCTTTACGTAGTGCGGAGGGATGTCATCAATGACGTTATACCATG  
CATTATTGGAGTAGATTTTTGGGCTGAGATCCATATGACCACATATGTAATTGT  
GTGGACCGAGACTTCGGGCCATAATGTTTTGCCGGTCCGTGAAGGACCCTC  
AACCACTAATGACAATGGTCTCAGCGGCCGCGCAGCGGCATCACAAACATTT  
TCAGACACCCATTGTGTCATTATTTCTGGGACATTATTGAACGACGCCTGCTG  
AAATGGAGGAACCCATGGTTCCGGAGGTGTTTGAATATCCGGTTAGCGTTT  
GACACAATGTTATGAAATTGTAGGAAGAAATGTTGGGGTGTCTTCTTCTTATT  
ATCTGCAGAGCGTCTTCTGCAGATGCTGAATTTAACGCCTTAGCATATGTGTC  
GTTAGCAGATTGTTGTCCTCCTCTAGCAGATCTGCCGTCTATTTGGAATTCAC  
CCCATTCAACGGTATCACCGTCTTTGTCGATGTATGTCTTGACATCGGAGCTG  
GATTTAGCTCCCTGAATGTTCCGGATGGAAATATGTTGATCTGGTTGAGGATAC  
GAGATCAAAGAATCTGATGTTTCGTGCATTGGTATTTTCTTCGAAATTGAATAAG  
CACGTGCAGATGAGGTTGCCCATCTTCATGAGATTCTTTGCATATTTTATGATGA  
TTTCTTGTTTACCGGCGTCGAGAGGTTTTGTAATTGAGCGAGAGCGTCTTCTT  
TGGAATGGAACATTGAGGATATGTGAGGAAGTAGTTCTTGGCATTTTAAACGA  
AATCGTTTAGGCAGTGGCATATTTGTAATAAGAGAGGTGTACACCAATTGGAG  
CTCTTTAACCTGGGCTGATTGTATCGGTGTATTGGTAGCCAATATATAGTATAT  
GGGAGTTATCTAGGATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACC  
GGATGGCCGACCGCTTCCATTATCTTTCCGTA CTGCTTTAATTTGAATTAAGA  
TGTCAC TTTTAGACTGACCAATGAGGATGCGTCTGGCGAGCTTAGATAACCGT

TCCAGACGTGGGGACCAAGTAGTGTTGGACCACTTTATTGACTGTCAGCTTAT  
AAATC

**Anexo 6.** Tabla con concentraciones y absorbancia para cada muestra de DNA de los hospederos analizados.

Muestras	Concentración (ng/μL)	Absorbancia			
		A260(Abs)	A290(Abs)	260/290	260/230
LBOCh-4	4220.1	84.402	43.403	1.94	1.55
JAJH-1	788.9	15.778	6.736	2.34	1.73
JAJH-2	543.5	10.869	4.400	2.47	1.55
JAJH-3	1303.3	26.067	14.392	1.81	0.82
ECHM-1	2974.5	59.491	43.425	1.37	0.68
ECHM-2	570.1	11.401	5.855	1.95	0.71
ECHM-3	421.4	8.428	3.925	2.15	1.20
BHM	1110.2	22.203	13.269	1.67	0.90

**Anexo 7.** Listado de secuencias obtenidas para cada una de las comunidades correspondientes al virus del mosaico dorado del chile (PepGMV).

1. Secuencia de comunidad de Bethania

AATAATTATGTGGGCCTAATGCACGTGCCACATTGTCTTGCCGCTTCGCGAAT  
CACCTCAATGACAATACTAATCGGTCTATCTGGCCGCGCAGCGGAACTCCGA  
CCAAAATATTCAGCAACCCAATGTTGCATATCCTCAGGAACGTTATTAACGA  
GGATAATGGATAAGGAGGAGTCCATGGCGTAGGAGGAGTTGTAAATAGGCGCT  
GGATGTTAGCCGATATGTTATGATAACTAACAATGAACGTTTTAGGATCACCAG  
CCTTGATTATGTCCAGCGCCTCCACCGCACTTGCAGCATTTACTGCGTTATAGT  
AGACGTCGTCTTTATTTGCTTTGGAACCCCGGAACTTTGTACTTCCCAGTTTC  
ACAATAATCACCATCTTTCGTGATGTAATTCTTTACGGCATTGCGTCTTTGGCT  
GCCTGAACGTTTTGGATGAAACTGGGCTGATCTCCGGGGGTGAGTAATGTCAA  
GAAACGTGCATCTTTGATGTTGCACTTTCNNCTTAGTTGGATTAGACAGTGCAA  
GTGCGGGAACCCATCGGAATGCTCCTCTCGTGATACCCGAATATAGCTGGGTTT  
TACCACTGACCATTTTAAAGAACGGAGCATTTCGAGAGCTTCATCTTTTGGGAT  
ATCGCATTGTGGATATGTTAAGAAAATGTTTTTACATTGTAAACGAAATGATTT  
AGGAGGTAGTGGCCTTTTTGCAAATATGGTGTAGGACTCCCGGAGAGTCCCTC  
AAATTTTGCATATATTGGGGAGTCCCGGAGTTCCTTATATACATAAATCCTTTT  
GGGGAATCCAAGGGCAAAGCGGCCCTCCTATAATATTACTGGATGGCCGCGA  
TTTTTTTGGAGTCTTTGGGGGACCACTCAGAATAGAGGGCTGAGATTAAATAGA  
TAAAGAGATGGGACCACCAATTAT

## 2. Secuencia para comunidad de San Felipe de la Peña

AATAATTATGTGGGCCTAATGCACGTGCCACATTGTCTTGCCGCTTCGCGAAT  
CACCTCAATGACAATACTAATCGGTCTATCTGGCCGCGCAGCGGAACTCCGA  
CCAAAATATGCAGCAACCAATGTTGCATATCCTCAGGAACGTTATTAACGA  
GGATAATGGATAAAGGAGGAGTCCATGGCGTAGGAGGAGTTGTAAATAGGCGCT  
GGATGTTAGCCGATATGTTATGATAACTAACAATGAACGTTTTAGGATCACCAG  
CCTTGATTATGTCCAGCGCCTCCACCGCACTTGCAGCATTTACTGCGTTATAGT  
AGACGTCGTCTTTATTTGCTTTGGAACCCCCGAAACTTTGTACTTCCCAGTTTC  
ACAATAATCACCATCTTTCGTGATGTAATTTTTTACGGCATTGCGTCTTTGGCT  
GCCTGAACGTTTTGGATGAAACTGGGCTGATCTCCGGGGGTGAGTAATGTCAA  
GAAACGTGCATCTTTGATGTTGCACTTCCACTTAGTTGGATTAGACAGTGCAA  
GTGCGGGAACCCATCGGAATGCTCCTCTCGTGATACCCGAATATAGCTGGGTTT  
TACCACTGACCATTTTAAAGAACGGAGCATTTTCGAGAGCTTCATCTTTTGGGAT  
ATCGCATTGTGGATATGTTAAGAAAATGTTTTTGCATTGTAAACGAAATGATTT  
AGGAGGTAGTGGCATTTTTGCAAATATGGTGTAGGACTCCAGGAGAGTCCCTC  
AACTTCTGTCATATATTGTGGAGTCCTGGAGTCCCTTATATACATAAATCCTCTT  
GGGACTCCAAGGGCAAAGCGGCCATCCTATAATATTACTGGATGGCCGCGA  
TTTTTTGGAGTCTTTGGGGGACCACTCAGAATAGAGGGCTGAGATTAATAACG  
TAAAGAGATGGGACCACCAATTA

## 3. Secuencia para comunidad de José Azueta

AATAATTATGTGGGCCTAATGCACGTGCCACATTGTCTTGCCGCTTCGCGAAT  
CACCTCAATGACAATACTAATCGGTCTATCTGGCCGCGCAGCGGAACTCCGA  
CCAAAATATCCAGCAACCAATGTTGCATATCCTCAGGAACGTTATTAACGA  
GGATAATGGATAAAGGAGGAGTCCATGGCGTAGGAGGAGTTGTAAATAGGCGCT  
GGATGTTAGCCGATATGTTATGATAACTAACAATGAACGTTTTAGGATCACCAG  
CCTTGATTATGTCCAGCGCCTCCACCGCACTTGNAGCATTNACTGCGTTATAGT  
AGACGTCGTCTTTATTTGCTTTGGAACCCCCGAAACTTTGTACTTCCCAGTTTC  
ACAATAATCACCATCTTTCGTGATGTAATTCTTNACGGCATTGCGTCTTTGGCT  
GCCTGAACGTTTTGGATGAAACTGGGCTGATCTCCGGGGGTGAGTAATGTCAA  
GAAACGTGCATCTTTGATGTTGCACTTCCACTTAGTTGGATTAGACAGTGCAA  
GTGCGGGAACCCATCGGAATGCTCCTCTCGTGATACCCGAATATAGCTGGGTTT  
TACCACTGACCATTTTAAAGAACGGAGCATTTTCGAGAGCTTCATCTTTTGGGAT  
ATCGCATTGTGGATATGTTAAGAAAATGTTTTTACATTGTAAACGAAATGATTT  
AGGAGGTAGTGGCATTTTTGCAAATATGGTGTAGGACTCCAGGAGAGTCCCTC  
AACTTCTGTCATATATTGTGGAGTCCTGGAGTCCCTTATATACATAAATCCTCTT  
GGGACTCCAAGGGCAAAGCGGCCATCCTATAATATT

## 4. Secuencia para la comunidad de El Carrizo, Isla

AGATGACCGCTCAAATAATTATGTGGGCCTAATGCACGTGCCACATTGTCTTG  
CCGCTTCGCGAATCACCTCAATGACAATACTAATCGGTCTATCTGGCCGCGCA  
GCGGAACTCCGACCAAATATTCAGCAACCAATGTTGCATATCCTCAGGAAC  
GTTATTAACGAGGATAATGGATAAAGGAGGAGTCCATGGCGTAGGAGGAGTTG

TAAATAGGCGCTGGATGTTAGCTGATATGTTATGATAACTAACAATGAACGTTT  
TAGGATCACCAGCCTTGATTATGTCCAGCGCCTCCACCGCACTTGCAGCATTTA  
CTGCGTTATAGTAGACATCGTCTTTATTCGCTTTGGAACCCCCGAAACTTTGT  
ACTTCCCAGTTTCACAATAATCACCATCTTTCGTGATGTAATTCTTTACGGCATT  
TGCGTCTTTGGCTGCCTGAACGTTTGGATGAAACTGGGCTGATCTCCGGGGGTG  
AGTAATGTCAAAGAAACGTGCATCTTTGATGTTGCACTTTCCGGTTAGTTGGAT  
TAGACAGTGCAAGTGCGGGAACCCATCGGAATGCTCCTCTCGTGATAACCGAA  
TATAGCTGGGTTTTACCACTGACCATTTTTAAAGAACGGAGCATTTTCGAGAGCTT  
CATCTTTTGGGATATCGCATTGTGGATATGTTAAGAAAATGTTTTTACATTGTA  
AACGAAATGATTTAGGAGGTAGTGGCATTTTTTGCAAATATGGTGTAGGACTCC  
AGGAGAGTCCTTCAACTTCTGTCATATATTGTGGAGTCCTGGAGTCCCTTATAT  
ACATAAATCCTCTTGGGGACTCCAAGGGCAAAGCGGCCATCCTATAATATTA  
CTGGATGGCCGCGATTTTTTTTGGAGTCTTTGGGGGACCACTCAGAATAGAGGGC  
TGAGATTAAATAGATAAAGAGATGGGA

#### 5. Secuencia para la comunidad de Lázaro Cárdenas

TAAGATGACCGCTCAAATAATTATGTGGGCCTAATGCACGCGCCACATTGTCT  
TGCCGCTTCGGAATCACCTCAATGACAATACTAATCGGTCTATCTGGCCGCG  
CAGCGGAACCTCCGACCAAATATTCAGCAACCCAATGTTGCATATCCTCAGGA  
ACGTTATTAACGAGGATAATGGATAAGGAGGAGTCCATGGCGTAGGAGGAGT  
TGTAATAGGCGCTGGATGTTAGCCGATATGTTATGATAACTAACAATGAACG  
TTTTAGGATCACCAGCCTTGATTATGTCCAGCGCCTCCACCGCACTTGCAGCAT  
TAACCGCGTTATAGTAGACGTCGTCTTTATTTGCTTTGGTACCCCCGAAACTTT  
GTACTGCCAGATTCACAATAATCACCTCTTTGGTGATGTAATTTTTAACGGC  
ATTCGCGTCTTTGGCCGCTGAACGTTTGGATGGAACCTGGGCAGATCTCCGGGG  
GTGAGTAATGTGCAAGAATCGTGCATCTTTGATGTTGCATTTCCCGGATAACTG  
GATTAGACAGTGCAAGTGCGGGAACCCATCGGAATGCTCCTCTCGTGCTACCC  
GGATGTAGATGGGTTTTACCACTGACCATTTTAGACAACGGAGCATTTTCGAGA  
GCTTCATCTTTTGGGATATCGCATTGTGGATATGTTAAGAAAATGTTTTTACATT  
GTAAGCGAAATGATTTAGGAGCTAGTGGCATTTTTTGCAAATACGGTGTAGGAC  
TCCAGGAGAGTCCCTCAACTTCTGTCATATATTGTGGAGTCCTGGAGTCCCTTA  
TATACATAAATCCTCTTGGGGACTCCAAGGGCAAAGCGGCCATCCTATAATA  
TACTGGATGGCCGCGATTTTTTTTGGAGTCTTTGGGGGACCACTCAGAATAGAG  
GGCTGAGATTAAATAGATAAAGAGT

#### 6. Secuencia para Loma Bonita

TGACCGCTCAAATAATTATGTGGGCCTAATGCACGTGCCACATTGTCTTGCCG  
CTTCGCGAATCACCTCAATGACAATACTAATCGGTCTATCTGGCCGCGCAGCG  
GAACTCCGACCAAATATCCAGCAACCCAATGTTGCATATCCTCAGGAACGTT  
ATTAAGAGGATAATGGATAAGGAGGATTCCATGGCGTAGGAGGAGTTGTAA  
ATAGGCGCTGGATGTTAGCCGATATGTTATGATAACTAACAATGAACGTTTTAG  
GATCACCAGCCTTGATTATGTCCAGCGCCTCCACCGCACTTGAAGCATTCCTG  
CGTTATAGTAGACGTCGTCTTTATTTGCTTTGGAACCCCCGAAACTTTGTATTT  
CCCAGTTTCACAATAATCACCATCTTTCGTGATGTAATTCTTGACGGCATTTC  
GTCCTTGGCTGCCTGAACGTTTGGATGAAACTGGGCTGATCTCCGGGGGTGAGT

AATGTCAAAGAAACGTGCATCTTTGATGTTGCACTTTCCACTTAGTTGGATTAG  
ACAGTGCAAGTGCGGGAACCCATCGGAATGCTCCTCTCGTGATACCCGAATGT  
AGCTGGGTTTTACCACTGACCATTTTAAAGAACGGAGCATTTCGAGAGCTTCAT  
CTTTGGGATATCGCATTGTGGATATGTTAAGAAAATGTTTTTACATTGTAAAC  
GAAATGATTTAGGAGGTAGTGGCATTTTTGCAAATATGGTGTAGGACTCCAGG  
AGAGTCCCTCAACTTCTGTTCATATATTGTGGAGTCCCTGGAGTCCCTTATATA  
TAAATCCTTTTGGGGACTCCAAGGGCAAAGCGGCCATCCTATAATATTACTGG  
ATGGCCGCGATTTTTTGGAGTCTTTTGGGGACCACTCAGAATAGAGGGCTGAG  
ATTAAGTAGATAAAGATATGGGACCACCAATTATTGGATATTTGACTGACC

**Anexo 8.** Listado de secuencias obtenidas para cada una de las comunidades correspondientes al virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV)

1. Secuencia para comunidad de Lázaro Cárdenas

CCAGTCATTGAGGCTCCTATTCTTTTCTCCTCGTTGAGGTA CTCTTTATAGGAGGAC  
TGGGGGCCCCGGATTGCAAAGAAAGATAGTGGGTATCCCACCTTTAATTTGAAT  
TGGTTTGCCGTATTTACAGTTTGATTGCCAATCCCTTTGGGCCCCCATAACTCT  
TTGAAGTGCTTTACGTAGTGCGGAGGGATGTCATCAATGACGTTATACCATGCA  
TTATTGGAGTAGATTTTTGGGCTGAGATCCATATGACCACAAATGTAGTTGTGT  
GGGCCGAGACTTCTGGCCCATAATGTTTTGCCGGTCCGGGAAGGACCCTCAAC  
CACTAATGACAATGGTCTCAGCGGCCGCGCAGCGGCATCACACACATTTTCAG  
ACACCCATTGTGTCATTATTTAGGCACATTATTAAGGACGACAGTTGAAATG  
GAGGAACCCACGGTTCGGGGGAGTATGAAATATCCGGTTAGCATTGGACACA  
ATGTTATGAAATTGGAGGAAGAAATGCTGAGGTTGTTCTTCTTTATGATCTGC  
AGAGCTTCTTCTGCAGATGCGGAATTTAACGCCTTAGCATATGTGTCATTTGCA  
GACTGCTGTCCTCCTCTAGCAGATCTGCCGTCTATTTGGAATTCTCCCCATTCTA  
ATGTATCGCCGTCTTTGTCGATGTACGTCTTGACGTCGGAGCTTGATTTAGCTCC  
CTGAATGTTCCGGATGGAAATGTGCTGATCTGGTAGAGGATACGAGGTCAAAGA  
ATCGGTTGTTCGTGCATTGGTATTTTCTTCGAACTGAATAAGCACGTGCAAAT  
GAGGTTGCCCATCTTCATGAGATTCTTTGCATATTTTGATGTATTTCTTGTTTAC  
CGGCGTTCGAGAGGTTTTGTATTTGAGCGAGAGCCTCTTCTTTGGAAATGGAACA  
TTGAGGATAGGTGAGGAAATAGTTCTTGGCATTAAACGAAATCGTTTAGGCA  
ATGGCATATTTGTAATAAGAGAGGTGTACACCGATTGGAGCTCTTTAACCTGTG  
CTTATGGTATTGGTGTATTGGTAGCCAATATATAGTATATGGGAGTTATCTAGG  
ATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCGACCGCT  
TCCCTTATCTTTCCGTACTGCTTTAATTTGAATTAAGATGTTACTTTTATGCTA  
TCCAATGAGCGTGCCTGTCGAGCTTAGATAACCGTTCCAGACGTGGGGACC  
AAGTAGTGTCTGACCACTTTATTGACTGGCAGCTTATAAAATCAAATAAACCG

2. Secuencia obtenida para comunidad de San Felipe de la Peña

ACCAGTCATTGAGGCTCCTATTTTTCTCCTCGCTGAGGTA CTCTTTATAGGAGG  
ACTGGGGGCCCCGGATTGCAAAGAAAGATAGTGGGTATCCCACCTTTAATTTGA  
ATTGGTTTGCCGTATTTACAGTTTGATTGCCAATCCCTTTGGGCCCCCATAACT  
CTTTGAAGTGCTTTACGTAGTGCGGAGGGATGTCATCAATGACGTTATACCATG

CATTATTGGAGTAAATTTTTGGGCTGAGATCCATATGACCACAAATGTAGTTGT  
GTGGGCCGAGACTTCTGGCCATAATGTTTTGCCGGTCCGGGAAGGACCCTCA  
ACCACTAATGACAATGGTCTCAGCGGCCGCGCAGCGGCATCACACACATTTTC  
AGACACCCATTGTGTCATTATTTAGGCACATTATTAAGGACGACAGTTGAAA  
TGGAGGAACCCACGGTTCCGGGGGAGTATGAAATATGCGGTTAGCATTGGACA  
CAATGTTATGAAATTGGAGGAAGAAATGCTGGGGTTGTTCTTCTTTATGATCT  
GCAGAGCTTCTTCTGCAGATGCGGAATTTAACGCCTTAGCATATGTGTCATTAG  
CAGATTGCTGTCCTCCTCTAGCAGATCTGCCGTCTATTTGGAATTCTCCCCACTC  
TAATGTATCGCCGTCTTTGTGATGTACGTCTTCACGTTCGGAGCTTGATTTAGCT  
CCCTGAATGTTCCGGATGGAAATGTGCTGATCTGGTAGAGGATACGAGGTCAA  
GAATCGGTTGTTTCGTGCATTGGTATTTTCTTTCGAATGAATAAGCACGTGCAA  
ATGAGGTTGCCCATCTTCATGAGATTCTTTCATATTTTGATGTATTTCTTGTT  
ACCGGCGTCGAGAGGTTTTGTATTTGAGCGAGAGCCTCTTCTTTGGAAATGGAA  
CATTGAGGATAGGTGAGGAAATAGTTCTTGGCATTAAACGAAATCGTTTAGG  
CAATGGCATATTTGTAATAAGAGAGGTGTACACCGATTGGAGCTCTTTAACCTG  
TGCTTATGGTATTGGTGTATTGGTAGCCAATATATAGTATATGGGAGTTATCTA  
GGATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCGACCG  
CTTCCCTTATCTTTCCGTACTGCTTTAATTTGAATTAAGATGTCACTTTAAGAC  
TGACCAATGAGGATGCGTCTGGCAAGCTTAGATAACCGTTCAAGACGTGGGGA  
CCAAGTAGTGGAGGACC

### 3. Secuencia obtenida para José Azueta

CCAGTCATTGAGGCTCCTATTTTTTTCTTCGCTGAGGTA CTCTTTATAGGAGGAC  
TGGGGGCCCGGATTGCAAAGAAAGATAGTGGGTATCCCACCTTTAATTTGAAT  
TGGTTTGCCGTATTTACAGTTAGATTGCCAATCCCTTTGGGCCCCCATAACTCT  
TTGAAGTGCTTTACGTAGTGCGGAGGGATGTCATCAATGACGTTATACCATGCA  
TTATTGGAGTAGATTTTTGGGCTGAGATCCATATGACCACAAATGTAGTTGTGT  
GGGCCGAGACTTCTGGCCATAATGTTTTGCCGGTCCGGGAAGGACCCTCAAC  
CACTAATGACAATGGTCTCAGCGGCCGCGCAGCGGCATCACATACATTTTCAG  
ACACCCATTGTGTCATTATTTAGGGACATTATTGAATGACTGTTGTTGAAATG  
GAGGAACCCACGGTTCCGGGGGAGTTTGAATATACGGTTAGCGTTTGACACA  
ATGTTATGAAATTGGAGGAAGAAATGTTGGGGTTGTTCTTCTTTATGATCTGC  
AGAGCTTCTTCTGCAGATGCTGAATTTAACGCTTTAGCATATGTGTCATTAGCA  
GACTGCTGACCTCCTCTAGCAGATCTGCCGTCTATTTGGAATTCACCCATTCA  
ACGGTATCGCCGTCTTTGTGATGTACGTCTTGACGTTCGGAGCTTGATTTAGCT  
CCCTGAATGTTCCGGATGGAAATGTGTTGATCTGGTTGAGGATACGAGGTCAA  
GAATCGGCTGTTTCGTGCATTGGTATTTTCTTTCGAATTGAATAAGCACATGCAG  
ATGTGGTTGCCCATCTTCATGCGATTCTTTCATATCTTGATGTATTTCTTGTT  
CACCGGCGTTGAGAGGTTTTGTAGTTGAGCGAGAGCGTCTTCTTTGGAAATGGA  
ACATTGAGGATATGTGAGGAAGTAGTTCTTGGCATTAAACGAAATCGTTTAG  
GCAATGGCATATTTGTAATAAGAGAGGTGTACACCGATTGGAGCTCTTTAACCT  
GTGCTGATGGTATCGGTGTATTGGTAGCCAATATATAGTATATGGGAGTTATCT  
AGGATCTTCGTACACGTGGAGGCCATCCGTTATAATATTACCGGATGGCCGACC  
GCTTCCCTTATCTTTCCGTACTGCTTTAATTTGAATTAAGATGTCACTTTAAGA  
CTGACCAATGAGGATGCGTCTGGCAAGCTTAGATAACCGTTCCAGACGTGGGG  
ACCAAGTAGTGGAGGACCAC