
DETECCIÓN DE RESISTENCIA AL VIRUS HUASTECO VENA AMARILLA DEL CHILE Y SU HEREDABILIDAD EN GENOTIPOS SILVESTRES DE *Capsicum annuum* L.

Jesús Enrique Retes-Manjarrez, Sergio Hernández-Verdugo, Benedicte Pariaud, Claudia María Melgoza-Villagómez, Antonio Pacheco-Olvera, Saúl Parra-Terraza y José Antonio Garzón-Tiznado

RESUMEN

El Virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV) es uno de los principales patógenos que limitan la producción del cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) en México. Se efectuaron dos ensayos para buscar resistencia genética al Begomovirus PHYVV en 31 poblaciones silvestres de *C. annuum* colectadas en el noroeste de México y estimar la heredabilidad de éste carácter. Las plantas fueron inoculadas con PHYVV a través de su vector natural la mosca blanca *Bemisia tabaci* G. La identificación molecular de la fuente de inóculo y del insecto vector utilizados indicaron que pertenecen al Begomovirus PHYVV y a *B. tabaci* biotipo B, respectivamente. En el primer ensayo se identificaron tres poblaciones resistentes al PHYVV después de 60 días post inoculación y fueron seleccionadas como progenitoras para el segundo ensayo de

resistencia. En el segundo ensayo, la progenie de las poblaciones seleccionadas aumentó sus niveles de resistencia indicando una respuesta a la selección en estas poblaciones. La presencia de ADN viral detectada por PCR en el 100% de las plantas inoculadas en los dos ensayos indica que el método de inoculación por insectos puede ser utilizado como un nuevo método para la selección de resistencia al PHYVV en chile. La heredabilidad realizada de la resistencia al PHYVV en las poblaciones UAS10, UAS12 y UAS13, seleccionadas como resistentes, fueron 0,16; 0,25 y 0,11; respectivamente. Estos resultados indican la existencia de una base genética de la resistencia al PHYVV en las poblaciones seleccionadas como resistentes, lo que permitirá su uso en futuros programas de mejoramiento genético de chile.

Introducción

El virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV) es uno de los principales patógenos del cultivo del chile (*Capsicum* spp.) en México (Garzón-Tiznado *et al.*, 2002). Este virus fue reportado por primera vez en el estado de Tamaulipas, en el norte del país (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993). Se encuentra ampliamente distribuido en México y en el sur de EEUU (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). El PHYVV es miembro del gé-

nero *Begomovirus* (Subgrupo III), perteneciente a la familia *Geminiviridae* (Palmer y Rybicky, 1997). Su genoma bipartita es transmitido por *Bemisia tabaci* G y tiene como hospederos a diferentes dicotiledóneas como *Capsicum* spp., *Solanum lycopersicum* L., *Nicotiana* spp., *Physalis* spp., *Solanum rostratum* L., *Cucurbita* spp., *Helianthus annuus* L., *Datura* spp., *Carica papaya* L., *Sorghum halepense* L. y *Melia azedarach* L. (Garzón-Tiznado *et al.*, 2002; Méndez-Lozano

et al., 2003). Los síntomas principales de PHYVV en plantas de chile consisten en amarillamiento de las nervaduras, distorsión, mosaico amarillo y enrollamiento de hojas, detenimiento del crecimiento de la planta y reducción del rendimiento (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993).

De un total de ~1200 especies descritas de moscas blancas (Martin *et al.*, 2000), *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) es la más ampliamente distribuida alrededor del mundo. Este

insecto polífago tiene la capacidad de transmitir más de 100 virus fitopatógenos a través de la alimentación directa en sus hospederos (Jones, 2003). *B. tabaci* ha tenido diferentes cambios evolutivos con los cuales ha generado diferentes complejos en la especie. Los complejos constan de varios haplotipos y alrededor de 25 biotipos de *B. tabaci* (Perring, 2001; Simon *et al.*, 2003), entre los cuales existe variación en los hospedantes, adaptabilidad a plantas hospederas, habilidad de

PALABRAS CLAVE / *Begomovirus* / *Bemisia tabaci* biotipo B / *Capsicum annuum* / Heredabilidad / PHYVV / Resistencia genética /

Recibido: 09/12/2014. Aceptado: 27/06/2016.

Jesús Enrique Retes-Manjarrez. Maestro en Ciencias en Fitopatología y Estudiante de Doctorado en Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Sinaloa (UAS), México. Dirección: Facultad de Agronomía, UAS. Carretera Culiacán-El Dorado, Km. 17.5. Apartado Postal 726. Código postal 80000, Culiacán, Sina-

loa, México. e-mail: retesmje@hotmail.com
Sergio Hernández-Verdugo. Doctor en Ciencias en Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. Profesor-Investigador, UAS, México.
Benedicte Pariaud. Doctor en Fitopatología. Investigador, Vilmorin, Francia.

Claudia María Melgoza-Villagómez. Estudiante de Doctorado en Ciencias en Biotecnología Vegetal, UAS, México.
Antonio Pacheco-Olvera. Doctor en Ciencias en Biotecnología Vegetal, UAS, México. Profesor-Investigador, UAS, México.
Saúl Parra-Terrazas. Doctor en Ciencias en Edafología, Co-

legio de Postgraduados, México. Profesor-Investigador, UAS, México.
José Antonio Garzón-Tiznado. Doctor en Ciencias en Biotecnología Vegetal, Instituto Politécnico Nacional, México. Profesor-Investigador, UAS, México.

DETECTION OF PEPPER HUASTECO YELLOW VEIN VIRUS RESISTANCE AND HERITABILITY IN WILD GENOTYPES OF *Capsicum annuum* L.

Jesús Enrique Retes-Manjarrez, Sergio Hernández-Verdugo, Benedicte Pariaud, Claudia María Melgoza-Villagómez, Antonio Pacheco-Olvera, Saúl Parra-Terraza and José Antonio Garzón-Tiznado

SUMMARY

The huasteco pepper yellow vein virus (PHYVV) is one of the main pathogens that limit pepper (*Capsicum annuum* L.) crop production in Mexico. Plants collected in 31 wild populations of *C. annuum* from Northwest México were tested for resistance to PHYVV and to estimate the heritability. Plants were inoculated with PHYVV through its insect natural vector *Bemisia tabaci* G. The molecular identification of the inoculum source and the insect vector used on this study indicate that it belongs to the Begomovirus PHYVV and to the biotype B of *B. tabaci*, respectively. In a first trial, three resistant populations were identified after 60 days post inoculation and were selected as parents for the second resistant test. In the

second trial, the progeny of the resistant selected populations increased their level of resistant to PHYVV, indicating a response to selection of the populations. The presence of viral DNA detected by PCR in 100% of the plants used in both trials indicate that the insect transmission method can be used as a new method for PHYVV resistant selection in pepper. The PHYVV resistance heritabilities in narrow sense of the populations UAS10, UAS12 and UAS13, selected as resistant, were 0.16, 0.25 and 0.11, respectively. These results indicate the existence of a genetic basis of resistance to PHYVV in populations selected as resistant, allowing its use in future pepper breeding programs.

DETECÇÃO DE RESISTENCIA NO VÍRUS HUASTECO VEIA AMARELADA PIMENTA (PHYVV) E SUA HEREDABILIDADE EM GENÓTIPOS SILVESTRES DE *Capsicum annuum* L.

Jesús Enrique Retes-Manjarrez, Sergio Hernández-Verdugo, Benedicte Pariaud, Claudia María Melgoza-Villagómez, Antonio Pacheco-Olvera, Saúl Parra-Terraza e José Antonio Garzón-Tiznado

RESUMO

O vírus huasteco veia amarela da pimenta (PHYVV) e um dos principais patógenos que reduzem a produção em cultivo da pimenta (*Capsicum annuum* L.) em México. Foi feito dois experimentos para pesquisar a resistência genética no Begomovirus PHYVV em 31 populações silvestres de *C. annuum* obtidas na região noroeste do México e avaliar a herdabilidade. As plantas foram inoculadas com PHYVV usando o inseto vector mosca branca *Bemisia tabaci* G. A identificação molecular de uma fonte do inóculo e do inseto vector utilizado indicaram que pertence no Begomovirus PHYVV e no *B. tabaci* biótipo B, respectivamente. No primer experimento, identificou-se três populações resistentes no PHYVV depois de 60 dias post inoculação e foram selecionadas como progenitoras para o se-

gundo experimento de resistência. No segundo experimento, a progênie das populações selecionadas aumento seus níveis da resistência indicando uma resposta na seleção nas mesmas populações. As presenças de ADN viral detectada por PCR em 100% das plantas inoculadas em dois experimentos indicam que o método de inoculação por inseto pode ser utilizado como um novo método para a seleção da resistência a PHYVV. A herdabilidade realizada na resistência a PHYVV nas populações UAS10, UAS12 e UAS3, selecionadas como resistente, foram 0,16; 0,25 e 0,11; respetivamente. Esta resposta indica a existência de uma base genética da resistência a PHYVV em populações selecionadas como resistentes, que permitirá o uso em programas de melhoramento genético.

alimentación, capacidad de transmisión de virus de plantas, fecundidad, resistencia a insecticidas y capacidad de producir anomalías fisiológicas en plantas (Perring, 2001; Simon *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2012). Sin embargo, no hay reportes específicos de la interacción de PHYVV y los biotipo de *B. tabaci*.

El manejo de este *Begomovirus* se ha basado principalmente en el control químico, mediante el uso de insecticidas altamente tóxicos contra los insectos vectores. Este método ha resultado parcialmente efectivo, pero costoso y biope- ligroso (Borah y Dasgupta,

2012). Una alternativa efectiva, no biopeligrosa y aceptada en el manejo integrado de *Begomovirus*, es el desarrollo de genotipos resistentes a este grupo de patógenos (Shankarappa *et al.*, 2008). A la fecha no se han descrito cultivares de Chile resistentes a PHYVV. Se ha reportado que los parientes silvestres de las plantas cultivadas son fuente de genes de resistencia a plagas y enfermedades (Hernández-Verdugo *et al.*, 1998;). En *Capsicum* Hernández-Verdugo *et al.* (2001) y Godínez-Hernández *et al.* (2001) reportaron fuentes de resistencia al virus huasteco vena amarilla del Chile (PHYVV)

en Chile silvestres de *C. annuum* y *C. chinense*, respectivamente. Para continuar con el estudio y aprovechamiento de la diversidad genética de los parientes silvestres de *Capsicum*, es necesario seguir explorando nuevas fuentes de germoplasma para encontrar genes que puedan contribuir en la formación de cultivares resistentes a PHYVV.

Para que un carácter agronómico pueda ser sujeto a selección es necesario que tenga una base genética y que sea heredable. La heredabilidad (h^2) mide la proporción de la varianza fenotípica total que es debida a causas genéticas y

es determinante del ritmo en que se modifica la media poblacional y cómo evoluciona la población en respuesta a la selección natural o artificial. El aspecto más importante de la h^2 es su función predictiva en los caracteres de interés para ayudar a los mejoradores en el diseño de programas de mejoramiento genético. La determinación de la heredabilidad es uno de los principales objetivos del estudio genético en un carácter métrico (Falconer y Mackay 1996). A pesar de su importancia, no existen reportes sobre la heredabilidad de la resistencia a PHYVV en *Capsicum*.

El objetivo de este estudio fue identificar resistencia genética a PHYVV en poblaciones de *Capsicum annuum* L. silvestres del Noroeste de México y estimar la heredabilidad de este carácter. Esto permitirá incorporar la resistencia genética al PHYVV en futuros programas de mejoramiento genético de cultivares de Chile.

Materiales y Métodos

Material vegetal y fuente de inóculo viral

Se recolectaron frutos de 10 plantas de cada una de 31 poblaciones de Chile silvestre durante la temporada otoño-invierno del año 2010 en los estados de Sinaloa y Sonora (Figura 1). El cultivar Maverick (United Genetics) fue utilizado como control por su alta susceptibilidad a PHYVV. Las semillas fueron germinadas en charolas de 200 cavidades de poliestireno a 25°C.

Se recolectaron púas de plantas de Chile cultivar Grande® (Seminis) con los síntomas causados por PHYVV y se injertaron en plantas de Chile cultivar Maverick® para el incremento y conservación de la fuente de inóculo viral. Las plantas injertadas fueron mantenidas en jaulas entomológicas de madera a prueba de insectos (40cm de largo, 40cm de ancho

y 60cm de altura) y cubiertas con tela de organza.

Identificación del virus

Se identificó PHYVV mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando los iniciadores MotCP2118 y MotCP2123, que amplifican un segmento de 650 pares de bases del componente A de *Geminivirus*, el cual incluye la región común y parte del gen de la proteína de la cápside (Cervantes-Díaz *et al.*, 2009). La extracción de ADN fue realizada por el método de Dellaporta *et al.* (1983). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo según descrito por Cervantes-Díaz *et al.* (2009), en un termociclador (Bio-Rad C 1000 TM Thermal Cycler). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. El fragmento amplificado fue purificado con el uso de microcolumnas comerciales (PureLink) y posteriormente secuenciado de acuerdo con lo descrito por Sanger *et al.* (1977), en el Laboratorio Nacional de Genómica y Biodiversidad, CINVESTAV-Irapuato, México, para confirmar la presencia de PHYVV. La secuencia obtenida se comparó con las de otros aislamientos de PHYVV registradas en el Gen Bank (NCBI). La estimación de la similitud de

las secuencias analizadas se hizo con el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST; Altschul *et al.*, 1990). Con los resultados obtenidos se construyó un dendrograma con la técnica Clustal W en MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, version 5.05; www.megasoftware.net/), usando el método de *neighbor-joining* (Tamura *et al.*, 2011) para conducir un análisis *bootstrap* (1000 réplicas).

Fuente, mantenimiento e identificación del insecto vector

Con la intención de tener altas poblaciones del insecto vector libre de virus, se recolectaron adultos de mosca blanca con un succionador entomológico en un cultivo de Chile en condiciones de campo abierto. Las moscas fueron colocadas en plantas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) en jaulas entomológicas de madera cubiertas con tela de organza y se mantuvieron durante 12 meses (~12 generaciones) en un invernadero a temperatura promedio de 28°C. Las plantas de algodón fueron sustituidas por plantas jóvenes cada dos meses. Ha sido reportado que mantener aisladas las poblaciones de *B. tabaci* en plantas libres de virus durante 3-4 generaciones permite que el insecto vector se mantenga libre de virus (Czosnek *et al.*, 1993). También ha sido demostrado que *G. hirsutum* no es hospedero de *Begomovirus* que infecte *Solanáceas* (Czosnek *et al.*, 1993).

El biotipo B de *B. tabaci* fue corroborado mediante PCR, tomando dos muestras de 50 adultos para su posterior análisis con los iniciadores biotipo F y biotipo R, que amplifican un fragmento de 292pb. La extracción de ADN de insectos se efectuó con el método de Doyle y Doyle, (1990) y las reacciones de PCR se hicieron de acuerdo a Kang *et al.* (2012). Las reacciones amplificadas fueron llevadas a cabo en un termociclador (Bio-Rad C 1000 TM Thermal Cycler) y los

productos de PCR analizados por electroforesis en gel de agarosa 1%.

Primer ensayo de resistencia genética

Este se realizó en febrero de 2011, utilizando el método de inoculación por insectos. Las moscas libres de virus fueron colocadas en botellas de plástico en la fuente de inóculo de PHYVV (cultivar Maverick) durante 48h para la adquisición del virus. Se inocularon 20 plantas individualmente de cada población a los 60 días después de la siembra. En la inoculación se utilizaron 20 adultos virulíferos por un periodo de transmisión de 48h. Después del periodo de inoculación se eliminó a las moscas con el insecticida Imidacloprid (Confidor®, Bayer Crop Sciences). Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones de cinco plantas.

Los síntomas de la virosis se midieron mediante la escala reportada por Hernández-Verdugo *et al.* (2001) con modificaciones, donde 1 es sin síntomas y 9 corresponde a planta con los síntomas más severos, los cuales incluyen plantas enanas, con hojas rizadas y deformes, con mosaico claramente definido. Se seleccionaron como resistentes y se autofecundaron las plantas que obtuvieron una calificación ≤ 4 en la escala descrita anteriormente para su utilización en el segundo ensayo. El cultivar Maverick fue utilizado como control susceptible.

Segundo ensayo de resistencia genética

Este se realizó en febrero de 2012, utilizando el mismo método de inoculación con insectos y el mismo diseño experimental que se utilizó en el primer ensayo. Se inocularon entre 23 y 28 plantas descendientes de cada planta seleccionada como resistente en el primer ensayo y el control susceptible a PHYVV (Maverick). La inoculación y la evaluación de síntomas del patógeno fueron igual al primer ensayo.



Figura 1. Localización geográfica de las 31 poblaciones silvestres de *Capsicum annuum* L. recolectadas en los estados de Sinaloa y Sonora México.

En los dos ensayos se tomaron lecturas diariamente hasta la aparición de síntomas y a 60 días después de la inoculación se realizó la evaluación de resistencia de acuerdo con la escala descrita previamente. Las plantas de los dos ensayos fueron mantenidas en invernadero a una temperatura media de 29°C con una humedad relativa promedio de 50%.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza no paramétrico con la prueba de Kruskal-Wallis y la de medianas de Dunn ($p \leq 0,05$). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa computacional SAS (1996).

Heredabilidad

Se estimó la heredabilidad realizada (h^2) mediante la ecuación

$$h^2 = R/S$$

donde R: respuesta a la selección y S: diferencial de selección. La respuesta a la selección (R) es determinada por la diferencia entre la media de la población progenitora y la media de población descendiente. El diferencial de selección (S) se obtuvo mediante la diferencia entre la media de la población progenitora y la media de las plantas seleccionadas como resistentes (Falconer y Mackay, 1996).

Resultados y Discusión

Identificación del virus

Las muestras tomadas de las plantas de Chile fuente de inóculo resultaron positivas para la amplificación del fragmento predicho de 650pb correspondientes al *Begomovirus* PHYVV (Figura 2). La secuencia del fragmento amplificado mostró 99% de identidad nucleotídica con el aislado HE967657 del GenBank, que corresponde a un gen de la proteína de la cápside de PHYVV (Rodelo-Urrego *et al.*, 2013). El análisis filogenético de la secuencia M53 agrupó a la cepa utilizada en este estudio dentro de la especie PHYVV, y la diferenció claramente de los *Begomovirus* PepGMV y ToSLCV (Figura 3). Estos re-

sultados muestran que el virus aislado y utilizado en este estudio es PHYVV. El aislamiento e identificación de una cepa patogénica de cualquier organismo es fundamental para comenzar un programa de selección de resistencia genética en plantas. El virus aislado de este estudio (M53) pertenece al género *Begomovirus*, especie PHYVV, de acuerdo con los diferentes análisis moleculares por PCR, secuenciación y análisis filogenético de las muestras tomadas de las plantas de Chile fuente de inóculo. Este *Begomovirus* es el que se encuentra más ampliamente distribuido en el cultivo de Chile (*Capsicum* spp.) en México y es una de las principales limitantes de este cultivo (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Garzón-Tiznado *et al.*, 2002). El virus

PHYVV fue identificado por primera vez en el norte de México, en el estado de Tamaulipas, por Garzón-Tiznado *et al.* (1993) y reportado en el estado de Sinaloa en el 2003 por Méndez-Lozano *et al.* (2003).

Identificación del vector

El análisis por PCR mostró que los insectos utilizados como vectores para la inoculación del *Begomovirus* pertenecen a *Bemisia tabaci* biotipo B (Figura 4). Una de las principales características del biotipo B de *B. tabaci* es la alta capacidad de transmisión de diferentes *Begomovirus* en plantas, en contraste con otros biotipos de esta misma especie (Jones, 2003). Los insectos identificados como *B. tabaci* biotipo B usados en nuestros experimentos lograron un 100% de eficiencia de transmisión con 20 adultos por planta con la cepa M53 de PHYVV, resultado que coincide con estudios de transmisión de otros *Begomovirus* (Chirinos *et al.*, 2009; Geraud-Pouey *et al.*, 2009; Romay *et al.*, 2010). Los resultados son la primera evidencia de una interacción altamente eficiente entre *B. tabaci* biotipo B y el virus PHYVV.

Primer ensayo de resistencia genética

Se analizó la resistencia genética a PHYVV en 31 poblaciones de Chile silvestre bajo condiciones controladas en invernadero, mediante la inoculación del virus por su insecto vector *B. tabaci*. En el primer experimento la mayoría de las plantas mostraron los síntomas de la enfermedad, aunque la severidad (Tabla I) varió entre las poblaciones ($H = 379,73$; $gl = 30$; $p \leq 0,0001$). Después de dos meses post inoculación, la población UAS12 mostró el mayor grado de resistencia a PHYVV, con un índice de síntomas promedio de 4,6 y 50% de plantas resistentes. Las poblaciones UAS13 Y UAS10 mostraron una resistencia intermedia, con medias de síntomas de 6,7 y 6,9, respectivamente y

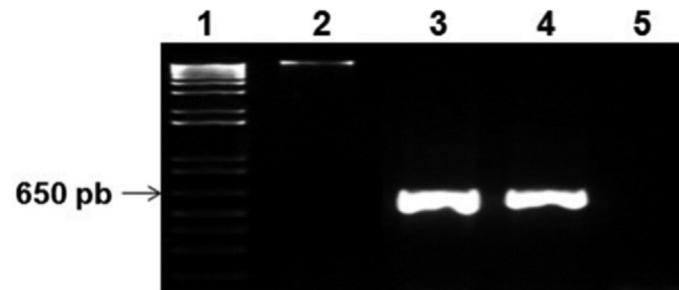


Figura 2. Detección del ADN de PHYVV con el empleo del par de iniciadores: MotCP2118/MotCP2123. Carril 1, MTM 1Kb Plus ADN Ladder. Carril 2, ADN extraído de *Bemisia tabaci* Genn (Mb) no virulíferas, sin señal de amplificación; Carriles 3 y 4, corresponden a fragmentos esperados de 650 pb, a partir del ADN extraído de Mb virulífera y planta de Chile enferma respectivamente. El control negativo en el carril 5 no muestra señal de amplificación.

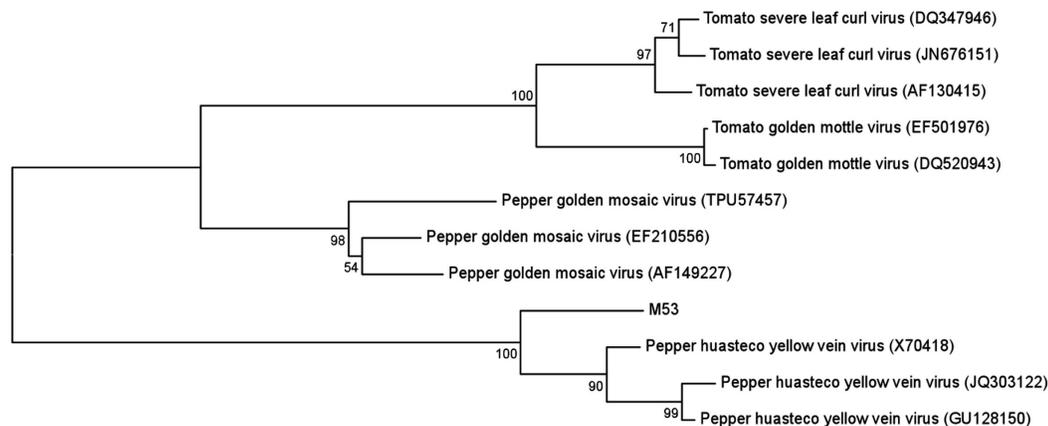


Figura 3. Resultado del análisis filogenético basado en la secuencia de nucleótidos de ADN viral de PHYVV del aislado UAS SIN MEX R1 (M53) procedente de la fuente de inóculo del presente estudio y otras accesiones representativas fitopatógenas de PHYVV y PepGMV.

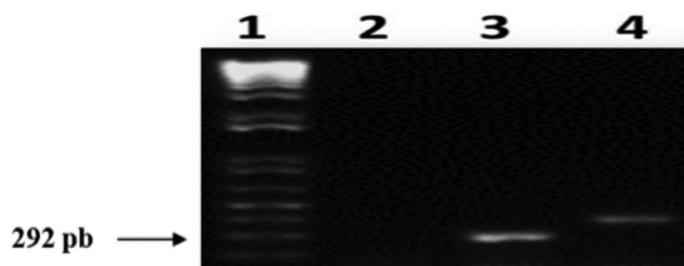


Figura 4. Identificación de los biotipos B y Q de *Bemisia tabaci* Genn con el par de iniciadores Biotipo F y Biotipo R. 1: MTM 1Kb Plus ADN Ladder, 2: ADN extraído de planta de Chile sana, 3: fragmento amplificado de 292pb esperado para el biotipo B correspondiente a la colonia del ensayo de resistencia a PHYVV, 4: fragmento predicho para el biotipo Q colectado en campo.

ambas con 20% de plantas resistentes. El resto de las poblaciones y el cultivar Maverick fueron altamente susceptibles, con valores promedio de síntomas entre 7,3 y 9,0. Se detectó ADN viral de PHYVV en todas las plantas analizadas en

este ensayo (Tabla II). Estos resultados coinciden con los reportados por Hernández-Verdugo *et al.* (2001) y Godínez-Hernández *et al.* (2001), quienes encontraron resistencia al virus PHYVV en poblaciones silvestres de

C. annuum y *C. chinense*, respectivamente.

El primer paso para el desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades es el escrutinio de los recursos genéticos silvestres y/o domesticados, para después ser utilizados en los programas de mejoramiento genético de cultivos agrícolas (Pickersgill, 1997). Las poblaciones silvestres de Chile tuvieron una amplia variación en los niveles de resistencia a PHYVV. Las tres poblaciones que se diferenciaron del resto son fuentes de resistencia prometedoras para futuros estudios de mejoramiento genético en el cultivo de Chile. Las poblaciones UAS10, UAS12 y UAS13, que desarrollaron menores niveles de síntomas, mostraron elevada variación en la resistencia entre ellas. Esta variación en la resistencia

permitió seleccionar plantas con bajos índices de los síntomas dentro de cada población para el siguiente ensayo de búsqueda de resistencia contra el PHYVV. Esta elevada variación en la resistencia coincide con la alta variación estimada con marcadores moleculares RADPs, y microsatélites entre y dentro de las poblaciones de Chile silvestre del noroeste de México (Oyama *et al.*, 2006; Pacheco-Olvera *et al.*, 2012).

El periodo de incubación del virus en las poblaciones de Chile silvestre varió de 10 hasta 28 días post inoculación (dpi). Las poblaciones UAS10, UAS12 y UAS13 manifestaron los primeros síntomas del virus entre 22 y 28 dpi. El resto de las poblaciones y el cultivar Maverick mostraron los primeros síntomas entre los 9 y 20 dpi. El tiempo de aparición de los primeros síntomas se correlaciona negativa y significativamente con los valores promedio de los síntomas en las poblaciones estudiadas ($r = -0,938$; $P = 0,007$). Las plantas de las poblaciones con bajos niveles de los síntomas presentaron un retardo significativo en el tiempo de su aparición, indicando que mientras mayor es el retraso en la aparición de los primeros síntomas en las plantas, existe mayor probabilidad de que los genotipos muestren bajos niveles en los síntomas de PHYVV.

Se seleccionaron como progenitores resistentes para ser utilizadas en el segundo ensayo a 10 plantas de la población UAS12 con un índice promedio de la enfermedad de 2,1; cuatro plantas de la población UAS10 con un promedio de la enfermedad de 2,5; y cuatro plantas de la población UAS13 con un promedio de la enfermedad de 4,0.

Segundo ensayo de resistencia genética

Se analizó la resistencia genética a PHYVV en la progenie de las plantas seleccionadas como resistentes en el primer ensayo bajo condiciones controladas en invernadero. La mayoría de las plantas inoculadas

TABLA I
RESULTADOS DEL PRIMER ENSAYO DE 31 POBLACIONES SILVESTRES DE *Capsicum annuum* RECOLECTADAS EN EL NOROESTE DE MÉXICO Y EL CULTIVAR SUSCEPTIBLE MAVERICK, INOCULADAS CON PHYVV MEDIANTE *Bemisia tabaci* BIOTIPO B

Población	NPS/TP	IVD	M	R	Población	NPS/TP	IVD	M	R
Maverick	20/20	9	8,4	8-9	UAS25	20/20	10	8,5	7-9
UAS29	20/20	10	9,0	9-9	UAS23	20/20	10	8,5	8-9
UAS28	20/20	10	9,0	9-9	UAS14	20/20	12	8,4	7-9
UAS21	20/20	14	9,0	9-9	UAS24	20/20	10	8,3	7-9
UAS30	20/20	13	8,8	7-9	UAS03	20/20	12	8,3	7-9
UAS20	20/20	10	8,8	8-9	UAS17	20/20	14	8,2	7-9
UAS19	20/20	10	8,8	8-9	UAS11	20/20	14	8,2	7-9
UAS27	20/20	10	8,7	7-9	UAS06	20/20	14	8,2	7-9
UAS16	20/20	13	8,7	8-9	UAS04	20/20	15	8,2	8-9
UAS22	20/20	10	8,7	7-9	UAS15	20/20	10	8,1	6-9
UAS31	20/20	10	8,6	7-9	UAS08	20/20	18	8,0	7-9
UAS26	20/20	10	8,6	8-9	UAS07	20/20	20	7,7	6-9
UAS09	20/20	10	8,6	7-9	UAS18	20/20	20	7,3	6-9
UAS01	20/20	15	8,6	8-9	UAS10	16/20	22	6,9	2-9
UAS05	20/20	10	8,5	7-9	UAS13	16/20	22	6,7	4-9
UAS02	20/20	10	8,5	7-9	UAS12	10/20	28	4,6	2-7

NPS: número de plantas susceptibles, TP: total de plantas probadas, IVD: incubación del virus en días, M: media de índice de severidad de los síntomas, y R: rango de síntomas.

TABLA II
RESULTADOS* DEL SEGUNDO ENSAYO DE LA PROGENIE DE LAS PLANTAS DE LAS POBLACIONES SELECCIONADAS COMO RESISTENTES DEL PRIMER ENSAYO INOCULADAS CON PHYVV MEDIANTE *Bemisia Tabaci* BIOTIPO B COMPARADAS CON EL CULTIVAR SUSCEPTIBLE MAVERICK.

Población	No plantas susceptibles/ Total probadas	Tiempo de incubación del virus (días)	Índice de severidad de los síntomas Medianas Valoración
Maverick	56/56	9	8,5 a
UAS13	28/40	22	6,4 b
UAS10	99/112	22	6,2 b
UAS12	19/60	28	4,0 c

* Incidencia de la enfermedad, incubación del virus (días) e índice de severidad de síntomas. Comparaciones de medianas hechas con la prueba de Dunn ($P \leq 0,05$). Medianas con igual letra no difieren significativamente.

con moscas blancas desarrollaron síntomas de la infección de PHYVV. Las medias de los síntomas de la descendencia de las poblaciones seleccionadas fueron significativamente menores que el cultivar Maverick, utilizado como testigo susceptible (Tabla III). La progenie de la población UAS12 presentó el mayor nivel de resistencia a PHYVV con un valor promedio de síntomas significativamente menor (media= 4,0) que las progenies de las poblaciones UAS10 (media= 6,2) y UAS13 (media= 6,4).

La expresión de los síntomas varió ampliamente dentro de las tres poblaciones consideradas resistentes. Este resultado sugiere que en la resistencia al *Begomovirus* PHYVV participa más de un gen. Es necesario efectuar investigaciones adicionales mediante cruza y segregación de la descendencia para estimar el número de genes involucrados en el carácter de resistencia.

La descendencia de las poblaciones UAS10, UAS12 y UAS13 respondió a la selección y mostró una disminución de los valores medios de los síntomas con respecto a sus progenitores, indicando una base genética de la resistencia al virus PHYVV.

Heredabilidad de la resistencia al PHYVV

La heredabilidad realizada (h^2) de la resistencia a PHYVV fue 0,16; 0,25 y 0,11 para las poblaciones UAS10, UAS12 y UAS13, respectivamente (Tabla III). El cultivar Maverick mostró una heredabilidad de susceptibilidad a PHYVV de 0,17. Los valores de heredabilidad obtenidos en este estudio son menores que los obtenidos por Mazyad *et al.* (2007) y Griffiths y Scott (2001) en los

Begomovirus TYLCV y ToMoV en genotipos silvestres de tomate (*Lycopersicon hirsutum* y *L. chilense*), respectivamente. Mazyad *et al.* (2007) estimaron heredabilidades de 0,55 en la resistencia a TYLCV, mientras que Griffiths y Scott (2001) estimaron valores de heredabilidad de 0,87 en la resistencia a ToMoV. Las diferencias en las heredabilidades estimadas en este estudio con las reportadas por Mazyad *et al.* (2007) y Griffiths y Scott (2001) pueden deberse a las diferencias genéticas entre las especies estudiadas y los *Begomovirus* probados. Finalmente, estos resultados son el primer reporte de heredabilidad en el carácter de resistencia a PHYVV.

La variación en los valores de heredabilidad mostrados en las poblaciones seleccionadas como resistentes sugiere que el potencial para responder a la selección varía entre las tres poblaciones seleccionadas.

Las plantas de la segunda generación de las tres poblaciones consideradas como resistentes son fuentes prometedoras de resistencia a PHYVV y podrán ser utilizadas en futuros estudios genéticos que contribuyan a la incorporación de la resistencia en cultivares comerciales de Chile.

Conclusiones

Se identificaron tres poblaciones de Chile resistentes (UAS10, UAS12 y UAS13) al PHYVV con valores de síntomas significativamente menores que el resto de las 28 poblaciones y el cultivar Maverick utilizado como control susceptible. Los valores de la heredabilidad para la resistencia al virus PHYVV, aunque relativamente bajos, indicaron que hubo respuesta a la selección y que esta caracterís-

tica tiene una base genética. El método de inoculación por insectos con *B. tabaci* empleado para la selección de plantas de Chile resistentes al PHYVV tuvo una eficacia de infección de 100% en el total de las plantas inoculadas, por lo que se propone como un nuevo método de inoculación para la selección de resistencia al PHYVV. Finalmente, las poblaciones silvestres de *Capsicum annuum* del noroeste de México tuvieron suficiente variabilidad genética para encontrar resistencia genética a PHYVV, indicando que esta especie es un valioso recurso genético que debe ser estudiado para mejorar su uso y conservación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la empresa Vilmorin INC, por el apoyo brindado para realizar esta investigación, al CONACYT por la beca otorgada a Jesús Enrique Retes Manjarrez para sus estudios de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y a la Universidad Autónoma de Sinaloa por el apoyo financiero a Sergio Hernández Verdugo (proyecto PROFAPI 2014/087) y a José Antonio Garzón Tiznado (proyecto PROFAPI 2015/078).

REFERENCIAS

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-440.
 Borah BK, Dasgupta I (2012) Begomovirus research in India: a critical appraisal and the way ahead. *J. Biosci.* 37: 791-806.
 Cervantes-Díaz L, Zavaleta-Mejía E, Rojas-Martínez RI, Alanís-Martínez L, Ochoa-Martínez DL, Valadez-Moctezuma E, Grimaldo-Juárez O (2009) Detección de geminivirus asociados a la alstromeria (alstromeria l.) en villa guerrero, estado de México. *Interciencia* 34: 903-908.

Chirinos DT, Geraud-Pouey F, Romay G, Güerere P, Franco MA, Galindo-Castro I (2012) Evaluación de genotipos comerciales de tomate por su resistencia a Begomovirus. *Interciencia* 37: 451-456.

Czosnek H, Kheyri-Pour A, Gronenborn B, Remetz E, Zeidan M, Altman A, Rabinowitch HD, Vidavsky S, Kedar N, Gafni Y, Zamir D (1993) Replication of *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) DNA in agroinoculated leaf discs from selected tomato genotypes. *Plant Mol. Biol.* 22: 995-1005.

Dellaporta SL, Woods J, Hicks JB (1983) A plant miniprep preparation, Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.

Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Falconer DS, Mackay TFC (1996) *Introduction to quantitative genetics*. Pearson. Nueva York, EEUU. 464 pp.

Garzón-Tiznado JA, Acosta-García G, Torres-Pacheco I, González-Chavira M, Rivera-Bustamante RF, Maya-Hernández V, Guevara-González RG (2002) Presencia de los Geminivirus, huasteco del Chile (PHV), Texano del Chile variante Tamaulipas (TPV-T) y Chino del tomate (VCDT), en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20: 45-52.

Garzón-Tiznado JA, Torres-Pacheco I, Ascencio-Ibañez JT, Herrera-Estrella L, Rivera-Bustamante RF (1993) Inoculation of peppers with infection clones of a new geminivirus by biolistic procedure. *Phytopathology* 33: 514-521.
 Geraud-Pouey F, Chirinos DT, Romay G, Santana MA, Bastidas L, Flores L (2009) Transmisión del TYLCV a diferentes materiales de tomate (*Lycopersicon esculentum* Miller) mediado por el Biotipo B del complejo *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Venezuela. *Bioagro* 21: 21-33.

Godínez-Hernández Y, Anaya-López JL, Díaz-Plaza R, González-Chavira M, Torres-Pacheco I, Rivera-Bustamante RF, Guevara-González RG (2001) Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatan, Mexico. *HortScience* 36: 139-142.

Griffiths PD, Scott JW (2001) Inheritance and linkage of Tomato Mottle Virus resistance genes derived from *Lycopersicon chilense* accession LA 1932. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 126: 462-467.

Hernández-Verdugo S, Guevara-González RG, Rivera-Busta-

TABLA III

VALORES DE LA HEREDABILIDAD REALIZADA EN LA RESISTENCIA A PHYVV

Población	Media de población base	Media de plantas seleccionadas	Media de progenie	R	S	h^2
UAS10	6,9	2,5	6,2	0,7	4,4	0,16
UAS12	4,6	2,1	4,0	0,6	2,5	0,25
UAS13	6,7	4,0	6,4	0,3	2,7	0,11
Maverick	8,4	9,0	8,5	0,1	0,6	0,17

R: respuesta de la selección, S: diferencial de selección, y h^2 : heredabilidad realizada.

- mante RF, Oyama K (1998) Los parientes silvestres del chile (*Capsicum* spp.) como recursos genéticos. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 62: 171-181.
- Hernández-Verdugo S, Guevara-González RG, Rivera-Bustamante RF, Oyama K (2001) Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to *Pepper huasteco virus* (PHV): Presence of viral DNA and differentiation among populations. *Euphytica* 122: 31-36.
- Jones DR (2003) Plant viruses transmitted by whiteflies. *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 195-219.
- Kang S, Kim YH, Lee HJ, Kim BJ, Lim KJ, Lee SH (2012) One-step identification of B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* based on intron variation of carboxylesterase 2. *J. Asia Pac. Entomol.* 15: 383-388.
- Martin JH, Mifsud D, Rapisarda C (2000) The whiteflies (Hemiptera: Aleyrodidae) of Europe and the Mediterranean Basin. *Bull. Entomol. Res.* 90: 407-448.
- Mazyad HM, Khalil EM, Rezk AA, Abdel HMA, Aboul AAE (2007) Genetic studies on tomato Yellow Leaf Curl Begomovirus (TYLCV) resistance in Egypt: Six-population analysis. *Int. J. Virol.* 3: 88-95.
- Méndez-Lozano J, Torres-Pacheco I, Fauquet CM, Rivera-Bustamante RF (2003) Interactions between geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 93: 270-277.
- Oyama K, Hernández-Verdugo S, Sánchez C, González-Rodríguez A, Sánchez-Peña P, Garzón-Tiznado JA, Casas A (2006) Genetic structure of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from northwestern Mexico analyzed by RAPDs. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55: 553-562.
- Pacheco-Olvera A, Hernández-Verdugo S, Rocha-Ramírez V, González-Rodríguez A, Oyama K (2012) Genetic diversity and structure of Pepper (*Capsicum annuum* L.) from northwestern Mexico analyzed by microsatellite markers. *Crop Sci.* 52: 231-241.
- Palmer EK, Rybicky EP (1997) The use of geminiviruses in biotechnology and plant molecular biology with particular focus on mastreviruses. *Plant Sci.* 129: 115-130.
- Perring TM (2001) The *Bemisia tabaci* species complex. *Crop Protect.* 20: 725-737.
- Pickersgill B (1997) Genetic resources and breeding of *Capsicum* spp. *Euphytica* 96: 129-133.
- Rodelo-Urrego M, Pagan I, González-Jara P, Betancourt M, Moreno-Letelier A, Ayllon MA, Fraile A, Pinero D, García-Arenal F (2013) Landscape heterogeneity shapes host-parasite interactions and results in apparent plant-virus codivergence. *Mol. Ecol.* 22: 2325-2340.
- Romay G, Geraud-Pouey F, Chirinos DT, Herrera E, Fernández C, Morales F, Martínez KA (2010) Transmisión del Tomato Venezuela Virus (ToVEV) por *Bemisia tabaci* (Gennadius), Hemiptera: Aleyrodidae, en Maracaibo, Venezuela. *Neotrop. Entomol.* 39: 2 66-274.
- Sanger F, Niklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- SAS (1999) *SAS/STAT. User's Guide*. Rel. 6.03. SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU. 1028 pp.
- Shankarappa KS, Sriharsha, Rangaswamy KT, Aswathanarayana DS, Prameela HA, Kulkarni RS, Muniyappa V, Rao AM, Maruthi MN (2008) Development of tomato hybrids resistant to tomato leaf curl virus disease in South India. *Euphytica* 164: 531-539.
- Simon B, Cenis JL, Demichelis S, Rapisarda C, Caciagli P, Bosco D (2003) Survey of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) biotypes in Italy with the description of a new biotype (T) from *Euphorbia characias*. *Bull. Entomol. Res.* 93: 259-264.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Torres-Pacheco I, Garzón-Tiznado JA, Brown JK, Becerra-Flora A, Rivera-Bustamante RF (1996) Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.