



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

**Centro de Ciencias Básicas
Doctorado en Ciencias Biológicas**

Tesis

Identificación de resistencia contra *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) en chiles mexicanos con diferente grado de domesticación mediante agroinoculación y biobalística

Presenta

M. en C. Karla Vanessa De Lira Ramos

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias Biológicas

Tutor

Dr. José de Jesús Luna Ruíz

Integrantes del Comité Tutoral

Dr. Joaquín Sosa Ramírez

Dr. Ernesto González Gaona

Aguascalientes, Ags. Marzo 2026

Mtro. Guillermo Domínguez Aguilar
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

P R E S E N T E

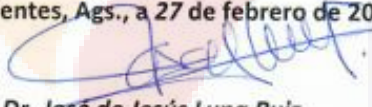
Por medio del presente como **DIRECTOR** designado del estudiante **KARLA VANESSA DE LIRA RAMOS** con ID 358922 quien realizó la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DE RESISTENCIA CONTRA PEPPER GOLDEN MOSAIC VIRUS (PEPGMV) Y PEPPER HUASTECO YELLOW VEIN VIRUS (PHYVV) EN CHILES MEXICANOS CON DIFERENTE GRADO DE DOMESTICACIÓN MEDIANTE AGROINOCULACIÓN Y BIOBALÍSTICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de febrero de 2026.


Dr. José de Jesús Luna Ruiz
Director

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

Mtro. Guillermo Domínguez Aguilar
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

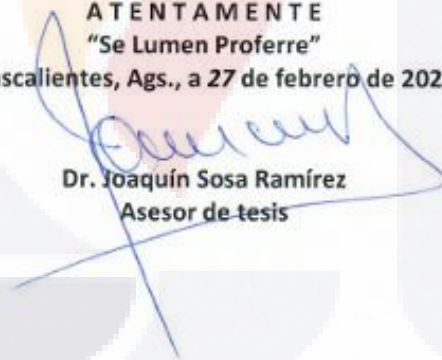
PRESENTE

Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **KARLA VANESSA DE LIRA RAMOS** con ID 358922 quien realizó la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DE RESISTENCIA CONTRA PEPPER GOLDEN MOSAIC VIRUS (PEPGMV) Y PEPPER HUASTECO YELLOW VEIN VIRUS (PHYVV) EN CHILES MEXICANOS CON DIFERENTE GRADO DE DOMESTICACIÓN MEDIANTE AGROINOCULACIÓN Y BIOBALÍSTICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de febrero de 2026.


Dr. Joaquín Sosa Ramírez
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado

Mtro. Guillermo Domínguez Aguilar
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

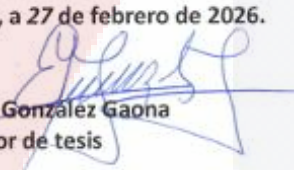
Por medio del presente como **ASESOR** designado del estudiante **KARLA VANESSA DE LIRA RAMOS** con ID 358922 quien realizó la tesis titulada: **IDENTIFICACIÓN DE RESISTENCIA CONTRA PEPPER GOLDEN MOSAIC VIRUS (PEPGMV) Y PEPPER HUASTECO YELLOW VEIN VIRUS (PHYVV) EN CHILES MEXICANOS CON DIFERENTE GRADO DE DOMESTICACIÓN MEDIANTE AGROINOCULACIÓN Y BIOBALÍSTICA**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en la fracción IX del Artículo 43 del Reglamento General de Posgrados, doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 27 de febrero de 2026.


Dr. Ernesto Gonzalez Gaona
Asesor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Coordinación del Programa de Posgrado



INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES
FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS
CALLE DE LA INVESTIGACIÓN
1. Pabellón de Investigación

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión Integral.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 02
Emisión: 13/08/25

Fecha de dictaminación (dd/mm/aaaa): 05/03/2026

NOMBRE: Karla Vanessa de Lira Ramos

ID: 358922

PROGRAMA: Doctorado en Ciencias Biológicas, Modalidad Tradicional

LGAC (del posgrado): Ecología y Biodiversidad

MODALIDAD DEL PROYECTO DE GRADO: Tesis (X) Tradicional *Tesis por artículos () científicos **Tesis por Patente () Trabajo Práctico ()

TÍTULO: Identificación de resistencia contra Pepper golden mosaic virus (PepGMV) y Pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV) en chiles mexicanos con diferente grado de domesticación mediante agroinoculación y biolística

El impacto social del estudio se refleja en la posibilidad de contribuir, a mediano y largo plazo, al desarrollo de variedades de chile más resilientes frente a enfermedades virales, lo cual puede traducirse en mayor estabilidad de ingresos para productores, reducción de pérdidas económicas y fortalecimiento de la seguridad productiva regional. Asimismo, la incorporación de resistencia genética en materiales cultivados puede favorecer la disminución del uso de insecticidas dirigidos al control del vector, generando beneficios adicionales en términos de salud ocupacional para agricultores y reducción de riesgos ambientales asociados al uso intensivo de agroquímicos. Esta investigación representa una contribución social significativa al promover la sostenibilidad del cultivo de chile, fortalecer la base científica para el mejoramiento genético y apoyar indirectamente la seguridad alimentaria, el bienestar de productores y la conservación de la biodiversidad agrícola.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado):

INDICAR SEGÚN CORRESPONDA: SI, NO, NA (No Aplica)

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:	
SI	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
NO	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
El egresado cumple con lo siguiente:	
SI	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Posgrados
SI	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc.)
SI	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial
NA	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario (En caso de que corresponda)
SI	Coincide con el título y objetivo registrado
SI	Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI	Tiene el CVU de la SECIHTI actualizado
SI	Tiene el o los artículos aceptados o publicados y cumple con los requisitos institucionales (en caso de que proceda)
*En caso de Tesis por artículos científicos publicados (completar solo si la tesis fue por artículos)	
	Aceptación o Publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto según el nivel del programa
	El (la) estudiante es el primer autor(a)
	El (la) autor(a) de correspondencia es el Director (a) del Núcleo Académico
	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
**En caso de Tesis por Patente	
	Cuenta con la evidencia de solicitud de patente en el Departamento de Investigación (anexarla al presente formato)

Con base en estos criterios, se autoriza continuar con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

SI X
No

Elaboró:

*NOMBRE Y FIRMA DEL(LA) CONSEJERO(A) SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NA de la LGAC correspondiente distinto al director o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

NOMBRE Y FIRMA DEL COORDINADOR DE POSGRADO:

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 24 fracción V del Reglamento General de Posgrado, que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: Proponer criterios y mecanismos de selección, permanencia, egreso y titulación de estudiantes para asegurar la eficiencia terminal y la titulación y el Art. 28 fracción II, atender, asesorar y dar el seguimiento del estudiantado desde su ingreso hasta su titulación.



Article

Resistance Assessment to PHYVV and PepGMV in Wild and Domesticated Accessions of *Capsicum annuum* L. by Bioballistic Inoculation

Karla Vanessa De Lira-Ramos ¹, Ernesto González-Gaona ², José Francisco Morales-Domínguez ³, Diana Lilia Trejo-Saavedra ⁴, Joaquín Sosa-Ramírez ⁵, Rafael F. Rivera-Bustamante ⁴ and José de Jesús Luna-Ruiz ^{5,*}

- ¹ Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20100, Aguascalientes, Mexico; kvlr1820@gmail.com
 - ² Campo Experimental Pabellón, Centro de Investigación Regional Norte Centro del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Kilómetro 32.5 Carretera Aguascalientes-Zacatecas, Pabellón de Arteaga 20660, Aguascalientes, Mexico; gonzalez.ernesto@inifap.gob.mx
 - ³ Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20100, Aguascalientes, Mexico; francisco.morales@edu.uaa.mx
 - ⁴ Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Irapuato, km. 9.6 Libramiento Norte, Irapuato 36500, Guanajuato, Mexico; dtrejo@ira.cinvestav.mx (D.L.T.-S.); rrivera@ira.cinvestav.mx (R.F.R.-B.)
 - ⁵ Departamento de Ciencias Agronómicas, Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20100, Aguascalientes, Mexico; joaquin.sosa@edu.uaa.mx
- * Correspondence: joselunar Ruiz11@yahoo.com.mx

Abstract

Chili pepper (*Capsicum annuum* L.) is an economically important crop in Mexico, with a production that is limited by viral diseases caused by Begomovirus infections such as PHYVV and PepGMV, both transmitted by *Bemisia tabaci*. These viruses affect both domesticated cultivars and wild populations. The use of resistant genotypes is the most effective strategy to reduce Begomovirus incidence. Since no commercial cultivars with resistance are currently available, in this study, 15 *Capsicum annuum* accessions with different levels of domestication were inoculated separately with infectious PepGMV and PHYVV dimers by bioballistics, in order to identify sources of genetic resistance or tolerance to these viruses. Symptom progression (severity), incidence, the area under the disease progress curve (AUDPC), and molecular detection of viral DNA by PCR were recorded in asymptomatic plants. PCR results with oligonucleotides targeting PepGMV and PHYVV showed that 96% of asymptomatic plants were positive, confirming that viral replication occurred without the development of visible symptoms. Significant differences were observed among accessions, with wild and semidomesticated accessions showing very low values of severity, incidence, and AUDPC. Notably, the wild accession Acc-106 exhibited resistance to PepGMV and tolerance to PHYVV, with minimum values of severity (0 and 0.13) and incidence (0% and 13%) at 35 days postinoculation.

Keywords: geminivirus; begomovirus; bioballistics; viral resistance; symptoms; PCR



Academic Editor: Prabhu Granasekaran

Received: 26 July 2025

Revised: 14 August 2025

Accepted: 19 August 2025

Published: 31 August 2025

Citation: De Lira-Ramos, K.V.; González-Gaona, E.; Morales-Domínguez, J.F.; Trejo-Saavedra, D.L.; Sosa-Ramírez, J.; Rivera-Bustamante, R.F.; Luna-Ruiz, J.J. Resistance Assessment to PHYVV and PepGMV in Wild and Domesticated Accessions of *Capsicum annuum* L. by Bioballistic Inoculation. *Plants* **2025**, *14*, 2708. <https://doi.org/10.3390/plants14172708>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The cultivation of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) is fundamental to both the economy and food systems in Mexico. However, its production is constrained by viral



plants

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF PUBLICATION

The certificate of publication for the article titled:
Resistance Assessment to PHYVW and PepGMV in Wild and Domesticated Accessions of *Capsicum annuum* L.
by Bioballistic Inoculation

Authored by:

Karla Vanessa De Lira-Ramos; Ernesto González-Gaona; José Francisco Morales-Domínguez; Diana Lilia Trejo-Saavedra; Joaquín Sosa-Ramírez; Rafael F. Rivera-Bustamante; José de Jesús Luna-Ruíz

Published in:

Plants **2025**, Volume 14, Issue 17, 2708



Basel, September 2025

Prof. Dr. Dilantha Fernando
Editor-in-Chief

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada para realizar mis estudios de doctorado.

Al Centro de Ciencias Agropecuarias de la UAA, por facilitarme las instalaciones para llevar a cabo la mayor parte de los experimentos y toma de datos.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, al Dr. Francisco Morales y al M.C. Daniel Alejandro Díaz por permitirme realizar parte de mi trabajo experimental como análisis molecular.

Se Agradece al Centro de Ciencias Básicas y a todo el equipo del Doctorado en Ciencias Biológicas por su apoyo en el proceso del doctorado.

Se agradece al CINVESTAV unidad Irapuato, muy en especial al Dr. Francisco Rafael Rivera Bustamante y a la Dra. Diana Trejo Saavedra, por las facilidades para desarrollar los experimentos de biobalística y agroinoculación.

Mis más sinceros agradecimientos a mi Director de tesis, el Dr. José de Jesús Luna Ruiz, por su invaluable guía, acompañamiento y dedicación a lo largo de mi formación doctoral. Asimismo, expreso mi profundo reconocimiento a mis asesores, el Dr. Joaquín Sosa Ramírez y el Dr. Ernesto González Gaona, por sus aportaciones académicas, observaciones críticas y constante apoyo, que contribuyeron de manera significativa al desarrollo y consolidación de este trabajo de investigación

DEDICATORIA

A mi familia,

por ser el pilar que sostiene mis sueños y la razón de cada esfuerzo.

A mis hijos,

por recordarme que los grandes logros cobran sentido cuando se comparten con amor. Todo lo que soy y lo que hago es por ustedes.

A mi esposo,

por ser mi compañero incondicional en cada etapa de este camino doctoral. Gracias por tu paciencia, comprensión y amor constante, por impulsarme a seguir adelante en los momentos de cansancio y celebrar conmigo cada logro alcanzado.

A mis padres,

por enseñarme el valor del trabajo, la humildad y la perseverancia. Por su ejemplo, su guía y por creer en mí siempre.

A todos ustedes,

porque este logro no es solo mío, sino nuestro.

Gracias por ser mi fuerza, mi raíz y mi inspiración.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	4
RESUMEN GENERAL	6
ABSTRACT	8
CAPÍTULO 1. Planteamiento de investigación	10
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	10
JUSTIFICACIÓN	12
OBJETIVOS	13
Objetivo general:.....	13
HIPOTESIS.....	13
CAPÍTULO II. Ensamble y producción de planta de una colección de accesiones de chile con diferente grado de domesticación.	14
RESUMEN	14
INTRODUCCIÓN	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS Y DISCUSIONES	18
CONCLUSIONES.....	21
CAPÍTULO III. Compatibilidad entre diferentes accesiones de <i>Capsicum annuum</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> no transformada.....	22
RESUMEN	22
INTRODUCCIÓN	22
MATERIALES Y METODOS	24
RESULTADOS Y DISCUSIONES	28
CONCLUSIONES	37
CAPÍTULO IV. Evaluación de la respuesta de las accesiones de chile con diferente grado de domesticación inoculadas con PepGMV y PHYVV mediante agroinoculación y biobalística.	38
RESUMEN	38

INTRODUCCIÓN	39
MATERIALES Y METODOS	40
RESULTADOS Y DISCUSIONES	47
CONCLUSIONES	56

CAPÍTULO V. Evaluación de las accesiones de chile contra *Begomovirus* bajo infección natural en una localidad con alta presión de la enfermedad.57

RESUMEN	57
INTRODUCCIÓN	57
MATERIALES Y METODOS	58
RESULTADOS Y DISCUSIONES	61
CONCLUSIONES	63

CAPÍTULO VI. Identificación de accesiones de chile resistentes a PepGMV y PHYVVV a partir de los resultados.64

RESUMEN	64
INTRODUCCIÓN	64
MATERIALES Y MÉTODOS	65
RESULTADOS Y DISCUSIONES	66
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS.....	70

ANEXOS	78
--------------	----

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Accesiones de chile (<i>Capsicum annuum</i>) con diferente grado de domesticación seleccionadas del Banco de Germoplasma-UAA para la evaluación de respuesta contra <i>Begomovirus</i>	16
Tabla 3.1. Accesiones de chile (<i>Capsicum annuum</i> L.) con diferente grado de domesticación seleccionadas del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para la evaluación de respuesta a la infección con <i>A. tumefaciens</i> GV3101	24
Tabla 3.2. Severidad media acumulada y porcentaje de incidencia en accesiones de <i>C. annuum</i> inoculadas con <i>A. tumefaciens</i> GV3101 a los 35 días después de la inoculación	33
Tabla 3.3. Severidad media e incidencia (%) de agallas inducidas por <i>A. tumefaciens</i> GV3101 a 35 ddi en accesiones de <i>C. annuum</i> agrupadas por grado de domesticación.	35
Tabla 3.4. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) estimada para la severidad media en accesiones de <i>C. annuum</i> inoculadas con <i>A. tumefaciens</i> GV3101, evaluadas a 35 días después de la inoculación	35
Tabla 3.5. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) en accesiones de <i>C. annuum</i> agrupadas por grado de domesticación.	36
Tabla 4.1. Accesiones de chile seleccionadas para la evaluación de la respuesta a la inoculación con PepGMV y PHYVV mediada por agroinoculación	40
Tabla 4.2. Escala de severidad de los síntomas modificada para <i>Virus huasteco vena amarilla del chile</i> (PHYVV) y el <i>Virus del mosaico dorado del chile</i> (PepGMV).	43
Tabla 4.3. Accesiones de chile (<i>Capsicum annuum</i>) seleccionadas para la evaluación de la respuesta a la inoculación con PepGMV y PHYVV en accesiones de chile mediada biobalística.	44
Tabla 4.4. Severidad media e incidencia (%) de los síntomas a los 35 dpi en 15 accesiones de <i>Capsicum annuum</i> inoculadas con el <i>Virus del mosaico dorado del chile</i> (PepGMV) y <i>Virus huasteco vena amarilla del chile</i> (PHYVV).	50
Tabla 4.5. Análisis de varianza factorial para severidad de los síntomas causados por PepGMV y PHYVV considerando el grado de domesticación y el tiempo (dpi)	51
Tabla 4.6. Influencia del nivel de domesticación en la respuesta a PepGMV y PHYVV en accesiones de chile a los 35 dpi.	51
Tabla 5.1. Accesiones de chile (<i>Capsicum annuum</i>) seleccionadas para la evaluación de infección natural de <i>Begomovirus</i> en una localidad con alta presión de la enfermedad.	59
Tabla 6.1. Clasificación de la respuesta de accesiones de chile con base en la severidad media y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad para los <i>Virus del mosaico dorado del chile</i> (PepGMV) y <i>Virus huasteco vena amarilla del chile</i> (PHYVV) inoculados mediante Biobalística.	66
Tabla 6.2. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) estimada para la severidad media e incidencia y clasificación de las 15 accesiones de chile.	67

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Porcentaje de germinación de semillas de las accesiones de <i>Capsicum annuum</i> con diferente grado de domesticación en siembra directa en sustrato <i>Peat Moss</i>	19
Figura 3.1. Método de infiltración a los 30 días después de la inoculación. A) Infiltración en el tallo. B) Infiltración en las axilas de las terceras hojas. C) Testigo, sin bacteria. Fotografía tomada a 60X.....	29
Figura 3.2. Método de infección por lesión a los 30 días después de la inoculación. A) infección por lesión en el tallo. B) Testigo, sin bacteria. Fotografía tomada a 60X.	29
Figura 3.3. Método de infección por lesión a los 30 días después de la inoculación. A) Infección por lesión en la nervadura principal del haz. B) Infección por lesión en la axila de la tercera hoja. C) Testigo, lesión sin bacteria en la nervadura principal del haz. D) Testigo, lesión sin bacteria en la axila de la tercera hoja. Fotografía tomada a 60X.....	30
Figura 3.4. Escala visual de severidad de agallamiento desarrollada para evaluar la respuesta de <i>Capsicum annuum</i> con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101: (a) severidad 0: plantas asintomáticas; (b) severidad 1: síntomas iniciales; (c) Severidad 2: síntomas moderados; (d) Severidad 3: síntomas graves.	31
Figura 4.1. Mapa de las construcciones virales de Begomovirus, A y B) componente A y B de PHYVV. C y D) Construcciones virales del componente A y B) de PepGMV.	42
Figura 4.2. Escala pictórica de severidad de síntomas en plantas de chile inoculadas con PepGMV. (A) Severidad 0: Plantas sin síntomas, (B) Severidad 1: Síntomas iniciales, (C) Severidad 2: Síntomas avanzados, (D) Severidad 3: Síntomas severos, (E) Severidad 4: Síntomas muy severos. (Fotografía: elaboración propia).	49
Figura 4.3. Escala pictórica de severidad de síntomas en plantas de chile infectadas con PHYVV. (A) Severidad 0: Plantas sin síntomas, (B) Severidad 1: Síntomas iniciales, (C) Severidad 2: Síntomas avanzados, (D) Severidad 3: Síntomas severos, (E) Severidad 4: Síntomas muy severos. (Fotografía: elaboración propia)	49
Figura 4.4. Dinámica del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para la severidad media causada por PepGMV en cuatro accesiones de <i>Capsicum annuum</i> con distinto nivel de susceptibilidad. (A) Acc-106 (silvestre) Resistente. (B) Acc-65 (domesticada) Tolerante. (C) Acc-60 (domesticada) Tolerante. (D) Acc-113 (domesticada) Moderadamente Susceptible.	53
Figura 4.5. Dinámica del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para la severidad media causada por PHYVV en cuatro accesiones de <i>Capsicum annuum</i> con distinto nivel de susceptibilidad. (A) Acc-106 (silvestre) Tolerante. (B) Acc-105 (silvestre) Tolerante. (C) Acc-104 (silvestre) Tolerante. (D) Acc-06 (domesticada) Susceptible.	54
Figura 4.6. Identificación por PCR de ADN viral de PepGMV en 15 plantas asintomáticas de chile Acc-106. (A) Amplificación del fragmento de la proteína Rep (121 pb) y (B) Amplificación del fragmento de la proteína CP (104 pb). Muestras tomadas a los 14 días después de la inoculación. Carril 1: Marcador de 100 pb, Carril 2: control negativo (hojas bombardeadas sin ADN viral). Carril 3: Control positivo (hojas sintomáticas). Los carriles con números 1 al 15 corresponden a las plantas asintomáticas de Acc-106... ..	55
Figura 5.1. Localización geográfica y establecimiento del ensayo de campo para la evaluación de	

accesiones de *Capsicum annum* bajo condiciones de infección natural por *Begomovirus*..... 60



RESUMEN GENERAL

La presente tesis tuvo como objetivo general identificar accesiones de *Capsicum annuum* con resistencia a *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), mediante el uso de dos estrategias de inoculación: agroinoculación y biobalística, y un experimento en campo. Este estudio se fundamenta en la amplia diversidad genética del chile, que incluye formas silvestres hasta cultivares domesticados, y en la evidencia de que el proceso de domesticación ha contribuido a la pérdida de mecanismos naturales de defensa frente a patógenos. En México, PepGMV y PHYVV representan una de las principales limitantes fitosanitarias en la producción de chile, al provocar reducciones importantes en el rendimiento y la calidad del fruto. La tesis se organizó en seis capítulos de acuerdo con los objetivos planteados en la investigación. El Capítulo I corresponde al planteamiento del problema y en éste se presenta la introducción general, la justificación, los objetivos y la hipótesis. El Capítulo II describe la colección de accesiones proveniente del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, así como la producción y manejo de plantas para los experimentos de compatibilidad con *Agrobacterium tumefaciens*, agroinoculación, biobalística y campo. En el Capítulo III se describe la evaluación de la compatibilidad de accesiones de *C. annuum*, con distinto grado de domesticación, frente a *A. tumefaciens*, mediante dos métodos de inoculación: infiltración y lesión. Este capítulo permitió determinar que la compatibilidad bacteriana no se relacionó directamente con el grado de domesticación, sugiriendo que la recalcitrancia observada en *Capsicum* podría estar asociada a procesos fisiológicos complejos. En el Capítulo IV se aborda la evaluación de la respuesta de las accesiones frente a PepGMV y PHYVV mediante agroinoculación y biobalística. Inicialmente, el experimento de agroinoculación se realizó en tres ocasiones; sin embargo, no se logró establecer la infección viral en las accesiones evaluadas. Ante esta limitante, se implementó la inoculación mediante biobalística como estrategia alternativa para garantizar la introducción del ADN viral. A través de este método, se analizaron la severidad y la incidencia de síntomas durante 35 días postinoculación, registrándose diferencias significativas entre accesiones y tiempos de evaluación. Los resultados evidenciaron una menor severidad e incidencia en accesiones silvestres, mientras que las domesticadas mostraron mayor susceptibilidad. Destacó la accesión Acc-106 (Pico Paloma) por su resistencia a PepGMV y tolerancia a PHYVV. El Capítulo V describe el

establecimiento de un experimento en condiciones naturales en una zona con alta presión de *Begomovirus* en el municipio de Rincón de Romos, Aguascalientes. Aunque no se presentó la infección natural esperada, este capítulo documenta la variabilidad en la incidencia del vector y la interpretación de estudios bajo condiciones ambientales variables. Finalmente, en el Capítulo VI se llevó a cabo la identificación de accesiones con distintos niveles de respuesta frente a la infección viral, considerando la severidad de síntomas, la incidencia, el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) y la confirmación molecular de la inoculación mediante biobalística. Con base en estos criterios, las accesiones se agruparon en cinco categorías de reacción: Resistente (R), Tolerante (T), Moderadamente Susceptible (MS), Susceptible (S) y Altamente Susceptible (AS). Dado que los experimentos de agroinoculación y el ensayo en campo no lograron establecer la infección viral esperada, la determinación de accesiones con comportamiento sobresaliente se fundamentó exclusivamente en la información generada bajo condiciones de inoculación por biobalística. Los resultados del estudio permitieron concluir que existe variabilidad genética asociada al grado de domesticación que influye en la respuesta a *Begomovirus*, y que ciertas accesiones silvestres constituyen fuentes potenciales de resistencia genética. El estudio también permitió documentar la variabilidad interanual en la incidencia del vector, y resalta la necesidad de considerar la dinámica poblacional de *B. tabaci* en el diseño de ensayos de campo. Como productos académicos derivados de esta investigación, se generaron dos artículos científicos: uno publicado en 2025 en la revista *Plants* y otro aceptado en la revista *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* (bajo evaluación).

ABSTRACT

The present thesis aimed to identify *Capsicum annuum* accessions with resistance to *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) and *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) using two inoculation strategies: agroinoculation and biolistic delivery. This study is based on the broad genetic diversity of chili pepper, which ranges from wild forms to highly domesticated cultivars, as well as on evidence that the domestication process has contributed to the loss of natural defense mechanisms against pathogens. In Mexico, PepGMV and PHYVV represent major phytosanitary constraints in chili production, causing significant reductions in yield and fruit quality. The thesis is organized into six chapters structured according to the objectives proposed in this research. Chapter I corresponds to the problem statement and presents the general introduction, justification, objectives, and hypothesis guiding the study. Chapter II describes the assembly of the plant collection obtained from the Germplasm Bank of the Universidad Autónoma de Aguascalientes, as well as the production and management of plants required for agroinoculation, biolistic, and field experiments. Chapter III describes the evaluation of the compatibility of several *C. annuum* accessions, differing in domestication level, with *Agrobacterium tumefaciens* using two inoculation methods: infiltration and wounding. This chapter showed that bacterial compatibility was not directly associated with the degree of domestication, suggesting that the recalcitrance observed in *Capsicum* may be linked to complex physiological processes. Chapter IV addresses the evaluation of accession responses to PepGMV and PHYVV through agroinoculation and biolistic inoculation. Agroinoculation experiments were initially conducted on three independent occasions; however, viral infection was not established in any accession. Due to this experimental limitation, biolistic inoculation was implemented as an alternative strategy to ensure viral DNA delivery. Using this method, symptom severity and incidence were assessed over 35 days post-inoculation, revealing significant differences among accessions and evaluation times. Results showed lower severity and incidence in wild accessions, whereas domesticated materials exhibited higher susceptibility. Notably, accession Acc-106 (Pico Paloma) showed resistance to PepGMV and tolerance to PHYVV. Chapter V describes the establishment of a field experiment under natural conditions in an area with historically high Begomovirus pressure in the municipality of Rincón de Romos, Aguascalientes.

Although natural infection was not observed, this chapter documents variability in vector incidence and provides insights for interpreting studies conducted under fluctuating environmental conditions. Finally, Chapter VI presents the identification of accessions with different levels of response to viral infection, considering symptom severity, incidence, the area under the disease progress curve (AUDPC), and molecular confirmation of infection obtained through biolistic inoculation. Based on these criteria, accessions were classified into five reaction categories: Resistant (R), Tolerant (T), Moderately Susceptible (MS), Susceptible (S), and Highly Susceptible (HS). Because agroinoculation and field experiments did not result in successful viral infection, the identification of outstanding accessions was based exclusively on data generated under controlled biolistic inoculation conditions. Overall, the results indicate the existence of genetic variability associated with domestication level that influences Begomovirus response and highlight certain wild accessions as potential sources of genetic resistance. The study also documented interannual variability in vector incidence and emphasizes the importance of considering *Bemisia tabaci* population dynamics when designing field trials, reinforcing the value of complementing such studies with controlled inoculation methods such as biolistic deliver. As academic outputs derived from this research, two scientific articles were produced: one published in 2025 in the journal *Plants* and another accepted in the journal *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* (under evaluation).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO 1. Planteamiento de investigación

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) posee una gran relevancia económica, social y cultural en México, país que ocupa el segundo lugar mundial en su producción, con una superficie de 158,237 ha y un valor estimado de \$36,585,698,000 (SIAP, 2023). Además de representar una fuente importante de ingresos para miles de productores, el chile constituye un elemento esencial en la dieta mexicana y un símbolo de identidad gastronómica nacional. México es reconocido como el centro de domesticación y la región con mayor diversidad genética de *Capsicum annuum*. El género *Capsicum* incluye aproximadamente 43 especies, de las cuales cinco han sido domesticadas (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. baccatum*). El resto (aprox. 38 especies silvestres y/o semisilvestres) se encuentran distribuidas desde el sur de EUA, todo México y hasta el norte de Argentina (Hernández-Verdugo et al., 1999; Perry y Flannery, 2007; Aguilar-Meléndez et al., 2009; Kraft et al., 2014; Barboza et al. 2022; Carrizo-García et al., 2022).

Además de su importancia económica y cultural, el chile presenta un notable valor nutracéutico, asociado con la presencia de capsaicinoides y capsinoides, compuestos responsables de su pungencia y de diversas propiedades profilácticas y terapéuticas (Rose et al., 2005; Corzo-Martínez et al., 2007; Luo et al., 2011). Sin embargo, su producción se ve limitada por diversos factores bióticos, entre los cuales destacan las enfermedades virales, bacterianas y fúngicas, que afectan tanto el rendimiento como la calidad de los frutos.

Entre los problemas fitosanitarios más graves se encuentran las enfermedades causadas por virus, responsables de pérdidas que pueden alcanzar hasta el 20% de la producción anual de chile en México (Anaya-López et al., 2003). De particular importancia epidemiológica son las infecciones mixtas por virus de la familia Geminiviridae, debido a que favorecen la recombinación genética y la aparición de nuevas variantes con mayor virulencia (Ala-Poikela et al., 2005; Velásquez-Valle et al., 2012). Dentro de este grupo, los Begomovirus *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) se consideran los más relevantes en México, ya que ocasionan reducciones sustanciales en el rendimiento y calidad de los frutos en diversos estados (Garzón-Tiznado, 1993; Torres-Pacheco et al., 1993; Méndez-Lozano et al., 2003; Rodelo-Urrego et al., 2015).

Las infecciones por estos virus provocan síntomas característicos como mosaicos amarillos o dorados, deformaciones foliares, clorosis intervenal, reducción del tamaño de la planta y menor número de frutos (Brown, 2003; Velásquez-Valle et al., 2013). La transmisión ocurre mediante la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), cuyo control químico mediante insecticidas ha resultado poco efectivo y ha favorecido el desarrollo de resistencia en las poblaciones del vector (Brown et al., 2015). En este contexto, la resistencia genética del hospedero se considera la estrategia más eficiente, económica y ambientalmente sostenible para el manejo de Begomovirus. Sin embargo, la mayoría de las variedades criollas y comerciales cultivadas en México son susceptibles.

Por ello, la identificación de fuentes de resistencia genética se ha convertido en una prioridad dentro de los programas de mejoramiento de chile. Tradicionalmente, la inoculación con *B. tabaci* se ha empleado para este propósito, aunque requiere infraestructura especializada, es laboriosa y consume mucho tiempo. Como alternativas, se han desarrollado metodologías más controladas, como la agroinoculación y la biobalística, que permiten evaluar un mayor número de accesiones en menor tiempo y con menor variabilidad experimental (Hernández-Verdugo et al., 2001a; García-Neria y Rivera-Bustamante, 2011; Jiménez, 2019).

Aprovechar la amplia diversidad genética de los chiles mexicanos, especialmente las accesiones silvestres y semisilvestres, resulta fundamental para identificar fuentes naturales de resistencia a Begomovirus. Estos materiales representan un recurso genético valioso para el desarrollo de estrategias biotecnológicas y sostenibles que fortalezcan la sanidad y productividad del cultivo de chile en México.

JUSTIFICACIÓN

Los *Begomovirus* constituyen una de las principales amenazas para la producción de hortalizas a nivel mundial, con pérdidas estimadas de hasta 20% en el cultivo de chile (Leke et al., 2015; Hernández-Espinal et al., 2018). En México, las enfermedades causadas por *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), transmitidas por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), limitan severamente la productividad y calidad del cultivo, afectando tanto la rentabilidad económica como la estabilidad de los sistemas agrícolas.

El control químico del vector ha mostrado baja eficacia, además de promover resistencia en las poblaciones de *B. tabaci* y generar impactos ambientales y riesgos para la salud humana. Frente a esta problemática, el uso de genotipos con resistencia genética representa la estrategia más eficaz, económica y sustentable para el manejo de Begomovirus.

Diversos estudios han reportado resistencia o tolerancia en accesiones silvestres y semisilvestres de *C. annuum* (Hernández-Verdugo et al., 2001b; Anaya-López et al., 2003; Retes-Manjarrez et al., 2016); sin embargo, la información disponible sigue siendo limitada y dispersa, lo que dificulta su aprovechamiento en programas de mejoramiento genético.

Las metodologías de Agroinoculación y Biobalística constituyen alternativas innovadoras que superan las limitaciones del método tradicional basado en el vector, al ofrecer mayor eficiencia, rapidez y reproducibilidad en la evaluación de resistencia. Su integración con la amplia diversidad genética de chiles mexicanos representa una oportunidad estratégica para identificar accesiones resistentes o tolerantes a PepGMV y PHYVV, contribuir a la reducción del uso de insecticidas, promoviendo sistemas agrícolas más sostenibles y generar conocimiento aplicable a programas de mejoramiento genético.

En este contexto, la presente investigación busca aportar información sobre la respuesta de accesiones de chile con diferente grado de domesticación frente a *Begomovirus* aplicando métodos biotecnológicos (Agroinoculación y Biobalística) con el propósito de facilitar la identificación de accesiones resistentes y aprovechar esas fuentes de resistencia genética para fortalecer el manejo fitosanitario y el mejoramiento del cultivo de chile en México.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la respuesta de accesiones de chile con diferente grado de domesticación a la infección de PepGMV y PHYVV para identificar fuentes de resistencia genética mediante agroinoculación y biobalística.

Objetivos particulares:

- Obtener un juego de accesiones de chile con diferente grado de domesticación y producir planta de cada accesión.
- Obtener una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* no transformada y evaluar su compatibilidad con el juego de accesiones de *Capsicum* spp
- Evaluar la respuesta de accesiones de chile con diferente grado de domesticación inoculadas con PepGMV y PHYVV utilizando los métodos de agroinoculación y biobalística.
- Evaluar las accesiones de chile contra *Begomovirus* bajo infección natural en una localidad con alta presión de la enfermedad.
- Identificar las accesiones de chile que muestran resistencia a PepGMV y PHYVV a partir de los resultados de los objetivos anteriores.

HIPÓTESIS

Las accesiones de chile con menor grado de domesticación (silvestres o semisilvestre) presentan variación en los niveles de resistencia o tolerancia a la infección de PepGMV y PHYVV a diferencia de las accesiones de chile domesticado (variedades o híbridos).

CAPÍTULO II. Ensamble y producción de planta de una colección de accesiones de chile con diferente grado de domesticación.

RESUMEN

En este capítulo se describe el material vegetal empleado en la investigación, conformado por accesiones de chile (*Capsicum annuum* L.) con diferente grado de domesticación, desde formas silvestres hasta cultivares mejorados. Las accesiones fueron seleccionadas del Banco de Germoplasma del Laboratorio de Recursos Fitogenéticos del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, y representan una muestra amplia de la diversidad genética existente en México. Cada accesión fue clasificada de acuerdo con su grado de domesticación en cuatro grupos: silvestres, semisilvestres, semidomesticadas y domesticadas. La producción de planta y semilla se realizó bajo condiciones controladas. Las semillas fueron desinfectadas y germinadas siguiendo un protocolo de pre-germinación con NaOH y ácido giberélico. Las semillas se colocaron en charolas con sustrato *peat moss* estéril, y después de germinadas se trasplantaron a macetas individuales con una mezcla de *peat moss*, arena y tierra comercial para maceta (3:1:1). Las plantas se mantuvieron a una temperatura promedio de 25 ± 2 °C, con humedad relativa de 60–70% y fotoperiodo de 12 horas de luz. El manejo agronómico incluyó riego, fertilización y control preventivo de plagas. Una parte de la colección de plántulas con 4 a 6 hojas verdaderas, fueron utilizadas en los experimentos de compatibilidad con *Agrobacterium tumefaciens* y de inoculación con PepGMV y PHYVV mediante Agroinoculación y Biobalística.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las especies hortícolas más importantes a nivel mundial, tanto por la superficie de cultivo como por el volumen de producción (Aguirre-Mancillas et al., 2017). En México, su diversidad genética es especialmente amplia, ya que el país constituye el principal centro de domesticación y diversificación de *C. annuum*. El proceso de domesticación ha dado lugar a una gran variedad de tipos que incluyen materiales silvestres, semidomesticados y criollos cultivados o domesticados, los cuales representan un valioso recurso genético para el mejoramiento y conservación del cultivo

(Hernández-Verdugo et al., 1999).

La producción exitosa de *C. annuum* depende en gran medida de la calidad fisiológica y genética de la semilla, la cual determina la germinación, el vigor y el establecimiento uniforme de las plántulas (Leubner-Metzger, 2003). En las formas silvestres, la germinación suele estar restringida por factores físicos o fisiológicos, como cubiertas seminales impermeables o la presencia de dormancia (Ramírez-Meraz et al., 2003; Araiza-Lizarde et al., 2011). Por ello, es necesario aplicar tratamientos pregerminativos, como la escarificación mecánica o química, y el acondicionamiento térmico o hídrico, que favorezcan una germinación y emergencia homogénea y aseguren la obtención de material vegetal viable.

En este contexto, la producción de planta a partir de accesiones con distinto grado de domesticación constituye un paso esencial para los ensayos posteriores de inoculación y evaluación de resistencia a *Begomovirus*. En este capítulo se describen el origen, procedencia geográfica y clasificación de las accesiones empleadas, así como los procedimientos utilizados para la germinación, establecimiento y manejo de las plántulas, con el fin de garantizar la uniformidad y representatividad del material biológico empleado en los experimentos subsecuentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de las accesiones. Las accesiones utilizadas provienen del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (BG-UAA), de colectas *in situ* y de materiales comerciales. En total se seleccionaron 42 accesiones, principalmente de *Capsicum annuum* que abarcan distintos grados de domesticación: Criollos cultivados (domesticados): variedades tradicionales como pasilla, guajillo, ancho, cascabel, puya y chile de árbol, obtenidos de productores y conservados en el banco de germoplasma de la UAA. Semidomesticados y semisilvestres: materiales de traspatio y de colectas locales, que conservan características intermedias entre poblaciones silvestres y domesticadas. Silvestres: accesiones de *C. annuum* var. *glabriusculum* (chiltepín/piquín), recolectadas en diferentes estados (Sonora, Nayarit, Oaxaca, Chiapas, Veracruz, Querétaro, entre otros). Variedades mejoradas y comerciales: materiales de habanero (*C. chinense*), chile bola y pimiento Cayenne adquiridos en el mercado (Tabla 2.1).

Esta selección cubre un gradiente de domesticación desde silvestres hasta variedades mejoradas, lo que permite analizar la variación en la respuesta a *Begomovirus* en función del grado de domesticación.

Tabla 2.1. Accesiones de chile (*Capsicum annuum*) con diferente grado de domesticación seleccionadas del Banco de Germoplasma-UAA para la evaluación de respuesta contra *Begomovirus*.

No.	Accesión	Tipo o raza	Banco/Fuente	Grado de domesticación	Categoría de manejo
1	Acc-1	Pasilla	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
2	Acc-2	Pasilla	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
3	Acc-5	Guajillo	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
4	Acc-6	Guajillo	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
5	Acc-12	Puya	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
6	Acc-13	Pasilla	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
7	Acc-15	Puya	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
8	Acc-18	Ancho	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
9	Acc-21	Puya	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
10	Acc-50	Ancho	BG-UAA	Domesticado	Criollo cultivado
11	Acc-60	Huacle Negro	BG-UAA Tesis Bioactivos	Domesticado	Criollo cultivado
12	Acc-61	Huacle Rojo	BG-UAA Tesis Bioactivos	Domesticado	Criollo cultivado
13	Acc-62	Huacle Amarillo	BG-UAA Tesis Bioactivos	Domesticado	Criollo cultivado
14	Acc-63	Serrano CM-334	BG-UAA Tesis Bioactivos	Semidomesticado	Fuente de resistencia
15	Acc-65	Cascabel	BG-UAA Tesis Bioactivos	Domesticado	Criollo cultivado
16	Acc-66	Cora	BG-UAA Tesis Bioactivos	Domesticado	Criollo cultivado
17	Acc-67	Chile de Agua	BG-UAA Tesis Bioactivos	Domesticado	Criollo cultivado
18	Acc-70	Silvestre Qro	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
19	Acc-71	Silvestre Nay	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semisilvestre	Traspatio
20	Acc-72	Silvestre Chis	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semisilvestre	Traspatio
21	Acc-73	Silvestre Oax	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semisilvestre	Traspatio
22	Acc-92	Chiltepines	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
23	Acc-96	Chiltepines	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
24	Acc-97	Chiltepines	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
25	Acc-98	Chiltepines	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
26	Acc-100	Chiltepines	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semisilvestre	Traspatio
27	Acc-101	Chiltepines	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
28	Acc-102	Amashito	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
29	Acc-103	Chiltepines	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
30	Acc-104	Amashito	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
31	Acc-105	Amashito	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
32	Acc-106	Pico Paloma	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Silvestre	Recolectado
33	Acc-107	Piquín	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semisilvestre	Traspatio

34	Acc-108	Piquín	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semisilvestre	Traspatio
35	Acc-109	Parado	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semidomesticado	Traspatio
36	Acc-110	Parado	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semidomesticado	Traspatio
37	Acc-111	Parado	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semidomesticado	Traspatio
38	Acc-112	Bolita	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Semidomesticado	Traspatio
39	Acc-113	Chile Bola	BG-UAA-Silvestres y exóticos	Domesticado	Variedad Mejorada
40	HM-C	Habanero-Manzano*	Mercado local	Domesticado	Experimental
41	PC-C	Pimiento Cayenne*	Mercado local	Domesticado	Experimental
42	PM	Pimiento Morron	Mercado local	Domesticado	Experimental

BG=Banco de germoplasma

*Variedad susceptible a Begomovirus y a la Agroinoculación

Se incrementó la población de plantas de chile con diferente grado de domesticación de las accesiones con el fin de obtener frutos para la renovación de semilla y garantizar semilla viable para los bioensayos de compatibilidad con *Agrobacterium*, de agroinoculación, biobalística y evaluación bajo infección natural de *Begomovirus*.

Tratamiento de pre-germinación de semillas. Para la germinación de semillas se siguió el procedimiento propuesto por García et al. (2010) con algunas modificaciones. Se colocaron semillas de chile en tubos Falcón de 30 mL y se agregó NaOH al 2%, se dejó reposar por 4 minutos. Las semillas se enjuagaron cuatro veces con agua destilada (cada enjuague de un minuto) y posteriormente se trataron con ácido giberélico Bio Gib® (10% AG) durante 24 h en incubación a 25 °C.

Después de 24 h, las semillas se colocaron directamente en sustrato “Peat Moss” en charolas de unicel de 200 cavidades de 2.0 x 2.0 cm cada cavidad (siembra directa= SD). Para evitar que las semillas fueran afectadas por hongos se agregó 3 mL de fungicida (Intercaptan® 2 g/L), las charolas se taparon con plástico negro y se colocaron en una incubadora a 25 °C. Una vez que germinaron las semillas, se retiró el plástico negro y las charolas se colocaron bajo condiciones controladas de luz y temperatura descritas previamente.

Trasplante. Una colección de plántulas de 2-4 hojas verdaderas se trasplantaron a macetas de 20 L en sustrato de arena, lombricomposta y *Peat Moss* (40-40-20) que se mantuvieron en un cuarto con fotoperiodo de 16:8 (luz: oscuridad), y temperatura máxima de 27 °C.

Fertilización. A partir del trasplante, las plántulas se fertilizaron con Nitrato de

Magnesio (1.0 g L), Nitrato de Calcio (1.0 g L) y un complejo de aminoácidos (0.5 g L) cada siete días hasta llegar a etapa de producción.

Producción y viabilidad de semilla. Cuando las plantas de cada accesión presentaban al menos una flor con anteras expuestas, se cubrieron con una tela de organza para tener semilla autofecundada. Posteriormente se cosecharon los frutos maduros (generalmente de color rojo).

La extracción de la semilla se realizó en forma manual y en seco. Se lavó y se secó el fruto y se removió la placenta con las semillas. La placenta se dejó secar. Una vez seca se removieron las semillas. Las semillas se desinfectaron en una solución con cloro al 1.2% durante 5 minutos, se enjuagaron con agua y se dejaron secar sobre toallas de papel a temperatura ambiente hasta tener tres lecturas de peso constante, luego se colocaron en sobres de papel y se almacenaron (Luna-Ruíz, 2010; Ayala-Villegas et al., 2014).

Del 5% del total de semilla renovada de cada accesión, se realizó una prueba de germinación mediante el método descrito anteriormente (imbibición en NaOH al 2% seguido de 24 h en Ácido giberélico Bio Gib® (10% AG).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Germinación y establecimiento de plántulas. Se evaluó la germinación de semillas de las accesiones seleccionadas del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (BG-UAA).

Las accesiones domesticadas, particularmente las variedades criollas cultivadas y las mejoradas, presentaron porcentajes de germinación elevados ($\geq 80\%$), con plántulas vigorosas y un establecimiento uniforme en condiciones de invernadero. En contraste, las accesiones silvestres y semisilvestres mostraron un comportamiento más variable (30–70% de germinación), atribuible principalmente a fenómenos de latencia y a la dureza de la cubierta seminal. Para mejorar la emergencia, se aplicaron tratamientos de escarificación y acondicionamiento osmótico, los cuales incrementaron significativamente los porcentajes de germinación hasta niveles adecuados para el trasplante.

En general, se obtuvo material vegetal viable para todas las accesiones, aunque se observaron diferencias notables en la velocidad y porcentaje de germinación, lo que refleja la influencia del grado de domesticación sobre estas características (Figura 2.1).

Estos resultados coinciden con lo reportado por Hernández-Verdugo et al. (2001), quienes señalan que la variabilidad ecológica y geográfica asociada a poblaciones silvestres, puede afectar los patrones de germinación en *Capsicum* spp.

De acuerdo con Berke (2000), una semilla de alta calidad presenta una tasa de germinación superior al 70%. En el presente estudio, el 46% de las sembradas de manera directa superaron este umbral del 70% de germinación. De las accesiones clasificadas como de “alta calidad de semilla”, el 89% correspondieron a materiales domesticados, lo que sugiere una clara relación entre domesticación y capacidad germinativa.

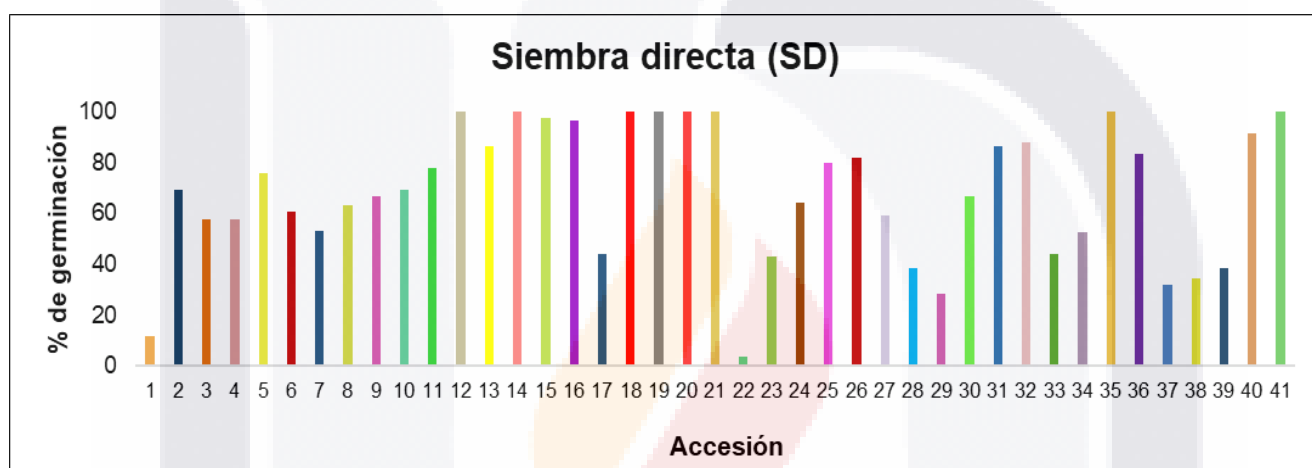


Figura 2.1. Porcentaje de germinación de semillas de las accesiones de *Capsicum annuum* con diferente grado de domesticación en siembra directa en sustrato *Peat Moss*.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hernández-Verdugo et al. (2001), quienes observaron que las poblaciones silvestres de *C. annuum* mantienen una mayor variabilidad germinativa asociada a condiciones ambientales de procedencia, mientras que las domesticadas presentan uniformidad como consecuencia del proceso de selección. De manera similar, Pickersgill (2007) y Meyer y Purugganan (2013) destacan que la domesticación tiende a eliminar rasgos ancestrales adaptativos (asociados al síndrome de la domesticación), como la dormancia, a favor de características que optimizan la productividad agrícola.

Producción de semillas. Las plantas obtenidas a partir de las accesiones establecidas en invernadero alcanzaron la madurez fisiológica y produjeron frutos de los cuales se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

extrajeron semillas renovadas y viables. El manejo controlado del riego, la nutrición y la sanidad vegetal permitió mantener condiciones óptimas y evitar la incidencia de patógenos que comprometieran la calidad del material.

Las accesiones domesticadas (por ejemplo, Pasilla, Guajillo, Ancho, Cascabel y Chile de Árbol) produjeron un número elevado de frutos por planta, con semillas de rápida germinación y tamaño uniforme. En cambio, las silvestres (*C. annuum* var. *glabriusculum*: tipos piquín, chiltepín y amashito) presentaron frutos pequeños y menor número de semillas por fruto.

A pesar de ello, se obtuvieron suficientes frutos para la continuidad experimental y renovación del material vegetal.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Pickersgill (2007) y Hernández-Verdugo et al. (2001a), quienes señalan que la domesticación del chile ha favorecido caracteres productivos como el tamaño del fruto, el número de semillas y la uniformidad fenotípica, mientras que las formas silvestres conservan mayor variabilidad genética, pero menor rendimiento. Los análisis genómicos de Qin et al. (2014) y Meyer y Purugganan (2013) confirman que la domesticación ha implicado la selección de genes asociados al desarrollo del fruto y a la eficiencia reproductiva. Lo anterior coincide con la mayor capacidad productiva y uniformidad de las accesiones evaluadas en el presente estudio, lo que garantizó su viabilidad, asegurando una cantidad de semilla suficiente para los ensayos posteriores de inoculación con *A. tumefaciens*, *Begomovirus* y ensayos en campo.

Variación entre accesiones. Durante el proceso de establecimiento y producción se observaron diferencias morfológicas y fisiológicas entre accesiones, asociadas principalmente al grado de domesticación. Las accesiones domesticadas presentaron plantas de mayor tamaño, frutos voluminosos, alta producción de semillas por fruto, germinación rápida y uniforme. Las accesiones semisilvestres o semidomesticadas presentaron características intermedias, con frutos medianos y variabilidad en el vigor germinativo. Las accesiones silvestres mostraron plantas pequeñas, frutos de reducido tamaño y bajo número de semillas por fruto, con mayor dificultad para la germinación.

Estas diferencias concuerdan con los patrones de domesticación descritos por Pickersgill (2007) y Hernández-Verdugo et al. (2015), quienes reportan que el proceso de selección artificial ha favorecido caracteres agronómicos como el tamaño del fruto y la uniformidad de germinación, a expensas de la variabilidad fisiológica y genética.

En conjunto, los resultados de este capítulo demuestran, por un lado, el gradiente de domesticación representado en el juego de accesiones, y por el otro lado, que el grado de domesticación influye directamente en la germinación, el desarrollo inicial y la capacidad reproductiva de las accesiones de *C. annuum*. Este conocimiento es fundamental para evaluar las respuestas de las accesiones frente a la infección por *Begomovirus* en los capítulos posteriores.

CONCLUSIONES

Se logró conformar un conjunto de accesiones para los ensayos posteriores de compatibilidad con *A. tumefaciens*, agroinoculación, biobalística y ensayos en campo. La germinación y el establecimiento de plántulas estuvieron influenciados por el grado de domesticación. Las accesiones domesticadas mostraron mayores porcentajes y uniformidad de germinación, mientras que las silvestres y semisilvestres presentaron variabilidad asociada a la dormancia y a la dureza de la cubierta seminal. Los tratamientos de escarificación y pre-germinación resultaron eficaces para mejorar la germinación y emergencia de semillas de accesiones silvestres. La producción de semillas bajo condiciones controladas en invernadero permitió la producción y obtención de plantas sanas y la producción de semillas viables. Las diferencias observadas entre grados de domesticación reflejan el impacto de la selección bajo manejo agrícola sobre caracteres como la germinación y la reproducción. Esto sugiere que los mecanismos adaptativos en las formas silvestres están vinculados con estrategias de supervivencia más que de productividad.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CAPÍTULO III. Compatibilidad entre diferentes accesiones de *Capsicum annuum* y *Agrobacterium tumefaciens* no transformada.

RESUMEN

La compatibilidad entre *Agrobacterium tumefaciens* y diferentes accesiones de *Capsicum annuum* constituye un paso clave para el establecimiento de metodologías eficientes de agroinoculación de *Begomovirus*. En este capítulo se evaluó la respuesta de accesiones con distinto grado de domesticación frente *A. tumefaciens* GV3101 no transformada con el objetivo de identificar materiales potencialmente susceptibles o resistentes al proceso de infección bacteriana. Se estudiaron dos métodos de inoculación; infiltración y lesión, mediante un ensayo preliminar, determinándose que el método de lesión presentó mayor sensibilidad y reproducibilidad en la inducción de tumores y deformaciones tisulares. Se evaluaron 29 accesiones con diferente grado de domesticación provenientes del banco de germoplasma de la UAA. La evaluación se realizó bajo condiciones controladas en invernadero, registrándose la incidencia, severidad y progresión de síntomas a lo largo de 35 días. Los resultados mostraron una incidencia de infección del 100% en las accesiones, diferencias muy marcadas en severidad del agallamiento y necrosis. Las accesiones domesticadas mostraron mayor compatibilidad con la bacteria, evidenciada por la formación de agallas o hipertrofias, mientras que las silvestres y semisilvestres presentaron reacciones limitadas o solo necrosis localizadas, lo que sugiere mecanismos diferenciales de defensa. Estos resultados confirman que el grado de domesticación influye en la interacción *Capsicum–Agrobacterium*, y que ciertas accesiones silvestres conservan rasgos de resistencia asociados a mecanismos de defensa inducidos. El presente estudio establece una base experimental para el uso de *A. tumefaciens* como vector de inoculación en estudios posteriores de resistencia a PepGMV y PHYVVV en chiles mexicanos.

INTRODUCCIÓN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es una de las hortalizas de mayor relevancia económica, social y cultural en México y a nivel mundial (Aguilar-Rincón et al., 2010; López-López et al., 2016; FAOSTAT, 2023).

México, considerado centro de domesticación del género *Capsicum*, posee una amplia diversidad genética que abarca desde formas silvestres y semisilvestres hasta criollas y domesticadas, lo que convierte a esta especie en un modelo idóneo para el estudio de la domesticación y la adaptación (Carrizo-García et al., 2016).

En el ámbito de la biotecnología vegetal, *C. annuum* se considera un cultivo recalcitrante a la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, en contraste con otras solanáceas como el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) o el tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), en las cuales la eficiencia es notablemente mayor (Ochoa-Alejo y Ramírez-Malagón, 2001; Sharma et al., 2011). Esta característica ha limitado el desarrollo de variedades transgénicas y la aplicación de metodologías de agroinoculación, herramientas esenciales para el estudio funcional de genes y la caracterización de interacciones planta-virus (Hanley-Bowdoin et al., 2013).

El mecanismo de infección de *A. tumefaciens* implica la transferencia de un fragmento de ADN-T (T-DNA) desde el plásmido Ti hacia el genoma de la célula vegetal, generando proliferación celular y la formación de agallas (Gelvin, 2017). Este proceso, ampliamente utilizado como sistema de transferencia génica, depende de la interacción entre los factores de virulencia bacterianos y la respuesta fisiológica del hospedero (Holsters et al., 1980; Koncz & Schell, 1986). La cepa GV3101, derivada del plásmido desarmado pMP90, conserva la maquinaria necesaria para la transferencia del T-DNA y se utiliza con frecuencia en protocolos de transformación y agroinoculación por su estabilidad y amplia gama de hospederos (Koncz & Schell, 1986; Gelvin, 2017).

A pesar de múltiples esfuerzos, la eficiencia de transformación en *Capsicum* sigue siendo baja y dependiente del genotipo (Dabauza & Peña, 2003; Kumar et al., 2012; Mahto et al., 2018; Rajam et al., 2021). Las diferencias observadas entre accesiones incluyen variaciones en la formación de agallas, en la capacidad de regeneración y en la eficiencia de transferencia del ADN-T, lo que sugiere que la compatibilidad con *A. tumefaciens* está modulada por factores genéticos y fisiológicos del hospedero.

Por otra parte, la domesticación ha sido asociada con una reducción en la variabilidad genética y en la capacidad de defensa frente a patógenos (Doebley et al., 2006; Meyer & Purugganan, 2013). En *C. annuum*, las accesiones silvestres tienden a conservar mecanismos de defensa inducida o estructural, mientras que las domesticadas carecen de ellos y presentan

mayor susceptibilidad (Pickersgill, 2007).

Sin embargo, los estudios que relacionan explícitamente el grado de domesticación con la compatibilidad frente a *A. tumefaciens* son escasos.

En este contexto, la evaluación de la compatibilidad bacteriana en accesiones con distinto grado de domesticación permite no solo comprender la interacción planta-bacteria, sino también identificar materiales con potencial para optimizar protocolos de transformación genética o de agroinoculación de virus.

El objetivo de este capítulo fue evaluar la respuesta de accesiones de *C. annuum* con diferente grado de domesticación frente a *A. tumefaciens* GV3101, mediante registros de la incidencia y severidad de síntomas, y el cálculo del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para identificar patrones de compatibilidad que contribuyan al diseño de estrategias eficientes para la inoculación mediada por *Agrobacterium* en chiles mexicanos.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal. Se utilizaron 29 accesiones de *C. annuum* L. con diferente grado de domesticación (silvestres, semisilvestres y domesticadas), procedentes del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (BG-UAA) (Tabla 3.1). El material vegetal fue seleccionado con base en la representatividad de tipos y su viabilidad fisiológica comprobada en el capítulo anterior. Las semillas se germinaron en charolas con sustrato estéril “Peat Moss” y, posteriormente, las plántulas se trasplantaron a macetas de polietileno de 11 × 11 × 20 cm, con mezcla de turba, perlita y vermiculita (2:1:1). Las condiciones de invernadero fueron de 28 ± 2 °C de temperatura y fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad).

Tabla 3.1. Accesiones de chile (*Capsicum annuum* L.) con diferente grado de domesticación seleccionadas del Banco de Germoplasma de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para la evaluación de respuesta a la infección con *A. tumefaciens* GV3101.

No.	Accesión	Tipo o raza	Grado de domesticación	categoría de manejo
1	Acc-2	Pasilla	Domesticado	Criollo cultivado
2	Acc-5	Guajillo	Domesticado	Criollo cultivado
3	Acc-6	Guajillo	Domesticado	Criollo cultivado

4	Acc-12	Puya	Domesticado	Criollo cultivado
5	Acc-13	Pasilla	Domesticado	Criollo cultivado
6	Acc-15	Puya	Domesticado	Criollo cultivado
7	Acc-18	Ancho	Domesticado	Criollo cultivado
8	Acc-21	Puya	Domesticado	Criollo cultivado
9	Acc-60	Huacle	Domesticado	Criollo cultivado
10	Acc-61	Huacle	Domesticado	Criollo cultivado
11	Acc-62	Huacle	Domesticado	Criollo cultivado
12	Acc-63	Serrano	Semidomesticado	Fuente de resistencia
13	Acc-65	Cascabel	Domesticado	Criollo cultivado
14	Acc-66	Cora	Domesticado	Criollo cultivado
15	Acc-96	Chiltepín	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
16	Acc-97	Chiltepín	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
17	Acc-100	Piquín	Semisilvestre	Traspatio
18	Acc-101	Chiltepín	Silvestre	Silvestre
19	Acc-102	Chiltepín	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
20	Acc-103	Chiltepín	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
21	Acc-104	Amashito	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
22	Acc-105	Amashito	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
23	Acc-106	Pico Paloma	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
24	Acc-107	Piquín	Semisilvestre	Traspatio
25	Acc-108	Piquín	Semisilvestre	Traspatio
26	Acc-109	Parado	Semidomesticado	Traspatio
27	Acc-110	Parado	Semidomesticado	Traspatio
28	Acc-111	Parado	Semidomesticado	Traspatio
29	Acc-113	Bola	Domesticado	Variedad Mejorada

Material bacteriano. Se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, portadora del plásmido desarmado pMP90, obtenida de la colección bacteriana del LANGEBIO-CINVESTAV Unidad Irapuato. La cepa se cultivó en medio sólido LB (Luria-Bertani) suplementado con rifampicina (50 mg L⁻¹) y gentamicina (25 mg L⁻¹), y se incubó a 28 °C durante 48 h. Para los ensayos de inoculación, se preparó una suspensión bacteriana en solución salina al 0.9%, ajustando la densidad óptica (DO) a 0.8 a 540 nm con espectrofotómetro (UV-Vis).

Bioensayo preliminar: comparación de métodos de inoculación. El objetivo del bioensayo preliminar fue determinar el método más adecuado para evaluar la compatibilidad de *A. tumefaciens* GV3101 con *C. annuum*.

Se emplearon tres accesiones representativas con distinto grado de domesticación:

una domesticada, una semisilvestre y una silvestre, además de una accesión adicional de referencia (RVV10) proveniente del Campo Experimental Pabellón (INIFAP, Aguascalientes).

Las plantas, de 126 días después de la siembra (dds), fueron inoculadas mediante dos métodos descritos por Jiménez (2019):

- Método 1. Infiltración: se inyectaron 10 μ L de la suspensión bacteriana (DO = 0.8) con una jeringa de polipropileno de 0.5 mL con aguja hipodérmica de aluminio (calibre 8 mm) en la vasculatura central del tallo (entre cotiledones y primeras hojas verdaderas), así como en las axilas de las terceras y octavas hojas.
- Método 2. Lesión: la aguja hipodérmica (8.0 mm) se impregnó directamente con el crecimiento bacteriano y se realizó una lesión en el tallo, asegurando el contacto con la vasculatura central. También se inocularon puntos en las yemas axilares 3 y 8, y la nervadura central tanto del haz como del envés de hojas desarrolladas.

Como testigo negativo se incluyeron plantas lesionadas con aguja estéril, sin exposición a bacterias. Se utilizaron cuatro plantas por accesión y por tratamiento.

Las plantas se evaluaron cada siete días hasta los 28 días después de la inoculación (ddi), registrándose la presencia de tumores, abultamientos o deformaciones tisulares. El criterio de selección del método óptimo consideró la inducción de la respuesta y la diferenciación visual de síntomas.

Bioensayo principal: evaluación de compatibilidad entre accesiones. Con base en los resultados del ensayo preliminar, se seleccionó el método de lesión para la evaluación principal de compatibilidad.

Se emplearon plántulas de 50 días de edad correspondientes a 29 accesiones de *Capsicum annuum* (Tabla 3.1). Para cada accesión se inocularon de 3 a 4 plántulas, y se incluyeron de 3 a 4 plántulas adicionales como controles negativos, las cuales fueron puncionadas en el mismo sitio, pero utilizando únicamente agua destilada estéril. Se registró la severidad de los síntomas de necrosis y agallamiento cada 7 días hasta los 35 días después de la inoculación (ddi) aplicando una escala de severidad visual (0-3):

0 = sin síntomas.

1 = necrosis localizada.

2 = hipertrofia.
3 = agallas diferenciadas.

Las evaluaciones se realizaron individualmente en cada planta inoculada, registrando el valor de severidad correspondiente en cada fecha de evaluación, con el fin de describir la progresión de los síntomas inducidos por *A. tumefaciens*.

La incidencia se calculó en cada fecha de evaluación y se expresó como el porcentaje de plantas con síntomas (severidad > 0) por accesión, con respecto al total de plantas inoculadas.

Con los valores de severidad registrados a lo largo del tiempo se calculó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) mediante el método trapezoidal descrito por Campbell y Madden (1990), utilizando la siguiente fórmula:

$$ABCPE = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{(y_i + y_{i+1})}{2} (t_{i+1} - t_i)$$

donde y_i y y_{i+1} representan la severidad de los síntomas en los tiempos consecutivos t_i y t_{i+1} , respectivamente, y n es el número de evaluaciones.

Reaislamiento de *A. tumefaciens* GV3101. Para confirmar la presencia de la bacteria en el tejido tumoral, se seleccionaron agallas con severidad 3 y se realizaron cortes de aproximadamente 0.5 cm² en condiciones estériles. Los fragmentos se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min y se enjuagaron tres veces con agua estéril. Posteriormente, los explantes se colocaron en medio LB suplementado con rifampicina (50 mg L⁻¹) y se incubaron a 28 °C durante 48 h. Como controles negativos, se utilizaron tejidos de tallos de plantas no inoculadas del mismo experimento. El reaislamiento de la bacteria a partir de tumores es un método ampliamente utilizado para confirmar la identidad de *A. tumefaciens* GV3101 en experimentos de compatibilidad y transformación (Gelvin, 2017; Escobar y Dandekar, 2003).

Análisis estadístico. Para cada accesión se calculó la severidad media en cada fecha de evaluación y la severidad a los 35 ddi. Las diferencias en la severidad final entre accesiones se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y las comparaciones múltiples se realizaron con la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La progresión temporal de síntomas de la severidad se evaluó mediante un ANOVA factorial de dos vías,

considerando como factores la accesión y el tiempo de evaluación (ddi), con el fin de determinar el efecto de tiempo y su interacción con el genotipo sobre el desarrollo de los síntomas.

La incidencia se calculó como el porcentaje de plantas con síntomas (severidad > 0) respecto al total de plantas inoculadas por accesión. Los valores de incidencia se analizaron de manera descriptiva y se emplearon para caracterizar la respuesta general de cada accesión y de los grupos de domesticación.

Los valores de ABCPE se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Kruskal–Wallis, seguida de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples.

Para evaluar el efecto del grado de domesticación, las accesiones se agruparon en cuatro categorías (domesticadas, semidomesticadas, semisilvestres y silvestres). Las diferencias de la severidad final (35 ddi) entre grupos se analizaron mediante un ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

Los valores de ABCPE entre los grupos de domesticación se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de Dunn para comparaciones múltiples. En todos los casos, se verificaron los supuestos de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianzas (Bartlett). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico R (versión 4.3.3).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Bioensayo preliminar: Se compararon dos métodos de inoculación transitoria con *A. tumefaciens* GV3101, infiltración y lesión, para determinar su eficiencia y aplicabilidad en *C. annuum*. Ambos sistemas permitieron observar diferencias en la respuesta del tejido vegetal a la infección bacteriana.

El método de infiltración no generó respuesta visible en las plantas inoculadas, lo que evidenció incompatibilidad entre el tejido del chile y la cepa bacteriana bajo este procedimiento (Figura 3.1). Ninguna de las plantas infiltradas mostró formación de tumores ni alteraciones tisulares, incluso después de 30 días postinoculación, lo que sugiere una baja eficiencia de penetración bacteriana en los haces vasculares del tallo y axilas foliares.

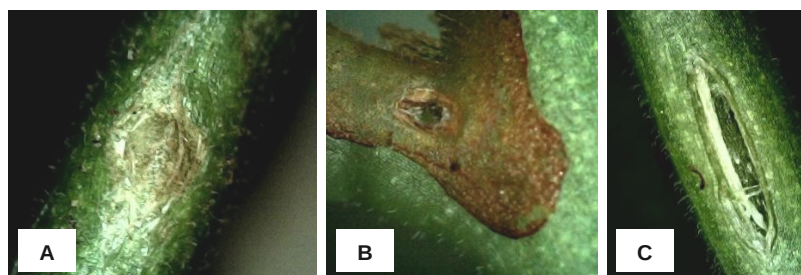


Figura 3.1. Método de infiltración a los 30 días después de la inoculación. A) Infiltración en el tallo. B) Infiltración en las axilas de las terceras hojas. C) Testigo, sin bacteria. Fotografía tomada a 60X.

Por el contrario, el método de infección por lesión resultó más sensible y efectivo, ya que permitió la formación de abultamientos y agallas visibles en los puntos de inoculación (Figura 3.2).

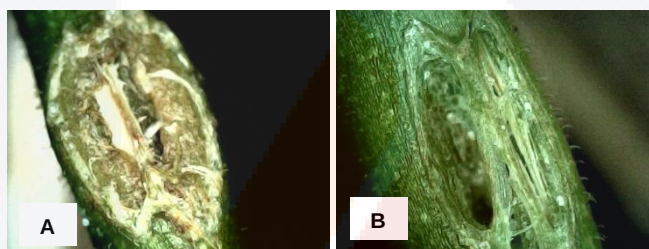


Figura 3.2. Método de infección por lesión a los 30 días después de la inoculación. A) infección por lesión en el tallo. B) Testigo, sin bacteria. Fotografía tomada a 60X.

En la accesión Acc-104 de 126 días de edad, se observaron deformaciones tisulares a partir de los 14 días después de la inoculación (ddi), especialmente en el tallo entre los cotiledones y las primeras hojas verdaderas. En cambio, las inoculaciones en nervaduras de hoja y axilas no mostraron síntomas de infección (Figura 3.3).

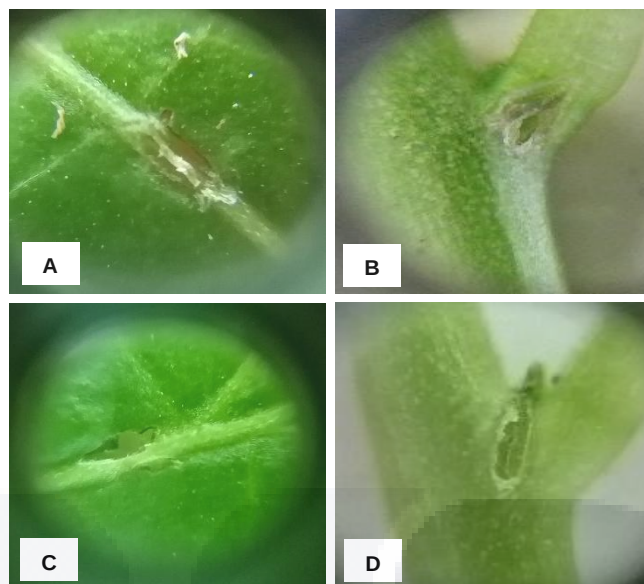


Figura 3.3. Método de infección por lesión a los 30 días después de la inoculación. A) Infección por lesión en la nervadura principal del haz. B) Infección por lesión en la axila de la tercera hoja. C) Testigo, lesión sin bacteria en la nervadura principal del haz. D) Testigo, lesión sin bacteria en la axila de la tercera hoja. Fotografía tomada a 60X.

Estos resultados confirman que el método de lesión es más eficiente que la infiltración para inducir la infección en tejidos diferenciados de chile, posiblemente porque la lesión permite el ingreso directo de las células bacterianas a los haces vasculares.

Resultados similares han sido reportados por Du et al. (2014), quienes observaron que la eficacia del método depende del tejido vegetal y del grado de lignificación, y por Jiménez (2019), quien validó la inoculación por lesión como alternativa para especies recalcitrantes.

La variabilidad observada puede atribuirse tanto a diferencias fisiológicas entre tejidos como al estado de diferenciación celular, ya que las plantas adultas tienden a activar respuestas de defensa basadas en lignificación, formación de barreras de suberina y acumulación de fenoles (Gelvin, 2017). Esto explicaría la falta de respuesta en las zonas foliares, donde la densidad celular y el flujo de savia son menores.

Compatibilidad entre accesiones de *C. annuum* y *A. tumefaciens* GV3101

Progresión de los síntomas de agallamiento inducidos por *A. tumefaciens* GV3101. Las plantas control, inoculadas únicamente con agua estéril, permanecieron asintomáticas durante todo el periodo de evaluación, registrando severidad 0 en todas las

fechas de muestreo. Esto confirma que los síntomas observados en los tratamientos inoculados se deben exclusivamente a la infección por *A. tumefaciens* GV3101.

La respuesta de las accesiones de *C. annuum* a la inoculación con *A. tumefaciens* GV3101 se caracterizó mediante una escala visual de severidad de agallamiento desarrollada en este estudio, basada en observaciones directas del tallo en el sitio de inoculación (Figura 3.4). Dicha escala permitió describir de manera consistente la progresión temporal de los síntomas y distinguir los diferentes niveles de compatibilidad planta-bacteria.

En la Severidad 0 (sin daño), el tejido permaneció íntegro, sin signos visibles de hinchamiento o necrosis, correspondiente a plantas que no desarrollaron agallas tras la inoculación (Figura 3.4a). La severidad 1 (necrosis localizada), se caracterizó por la presencia de necrosis localizada y un ligero engrosamiento o cambio de coloración del tejido en el sitio de inoculación, indicando una respuesta inicial del hospedero frente a la bacteria (Figura 3.4b).

En la severidad 2 (hipertrofia), se formaron agallas pequeñas y bien delimitadas, con proliferación celular evidente alrededor de la herida. Estas estructuras presentan mayor consistencia y expansión radial moderada del tejido afectado (Figura 3.4c).

La severidad 3 (agallas diferenciadas), correspondió al desarrollo de agallas prominentes claramente diferenciadas, irregulares y de mayor tamaño, con tejido tumoral visible que rodea el tallo, representando la máxima expresión de compatibilidad entre la planta y la bacteria (Figura 3.4d).

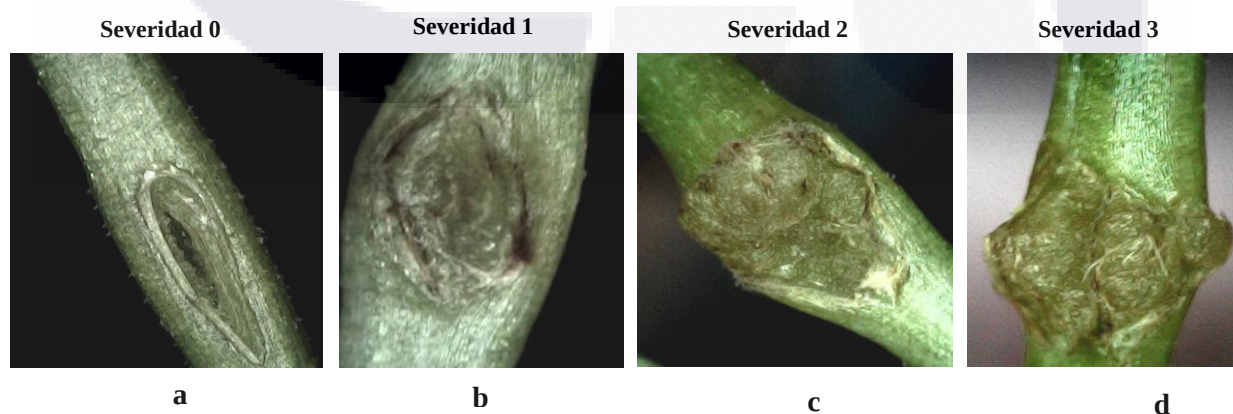


Figura 3.4. Escala visual de severidad de agallamiento desarrollada para evaluar la respuesta de *Capsicum annuum* con *Agrobacterium tumefaciens* GV3101: (a) severidad 0: plantas asintomáticas; (b) severidad 1: síntomas iniciales; (c) Severidad 2: síntomas moderados; (d)

Severidad 3: síntomas graves.

Este patrón indica una mayor compatibilidad bacteriana en materiales domesticados, posiblemente relacionada con la pérdida de mecanismos ancestrales de defensa durante el proceso de selección (Pickersgill, 2007; Meyer & Purugganan, 2013).

Severidad e incidencia de síntomas. En la Tabla 3.2 se muestran los valores de severidad media acumulada y el porcentaje de incidencia registrados a los 35 ddi en las 29 accesiones evaluadas. Al clasificar las accesiones de acuerdo con rangos de severidad, el 55% presentó valores entre 2.0 y 2.9, correspondientes a síntomas de moderados a severos, mientras que un 35% mostró valores intermedios entre 1.0 y 1.9. Solo el 10% de las accesiones permaneció con severidad ≤ 1.0 , reflejando una respuesta mínima a la bacteria. Las accesiones Acc-13 (Pasilla, domesticada) y Acc-109 (Parado, semidomesticada) presentaron los valores más altos de severidad (3.0 y 2.75, respectivamente), lo que evidencia una alta susceptibilidad a *A. tumefaciens* GV3101. En contraste, accesiones como Acc-113 (Bola, domesticada) y Acc-110 (Parado, semidomesticada) mostraron severidad baja (≤ 0.75). Estos resultados refuerzan la tendencia general de alta compatibilidad entre *A. tumefaciens* GV3101 y *C. annuum* observada en este estudio.

En cuanto a la incidencia, el 66% de las accesiones mostró infección del 100%, y el resto se distribuyó entre los rangos de 50-99%.

El análisis de varianza realizado sobre la severidad final a 35 ddi mostró diferencias globales entre accesiones ($F = 2.60$; $p \leq 0.01$); sin embargo, la prueba de Tukey no detectó diferencias significativas entre accesiones, agrupándolas en una misma categoría de significancia. Por su parte, el análisis de la incidencia a 35 ddi (%) no mostró diferencias significativas entre accesiones ($p > 0.05$). Esto indica que la compatibilidad con *A. tumefaciens* GV3101 es generalizada en el germoplasma evaluado de *C. annuum*, independientemente de la accesión.

Tabla 3.2. Severidad media acumulada y porcentaje de incidencia en accesiones de *C. annuum* inoculadas con *A. tumefaciens* GV3101 a los 35 días después de la inoculación.

Accesión	Tipo	Grupo	TPS/TPI	SM $\pm$ EE ⁱ	% incidencia
Acc-2	Pasilla	Domesticado	3/3	3.00 $\pm$ 0.00 a ⁱⁱ	100
Acc-5	Guajillo	Domesticado	4/4	2.25 $\pm$ 0.25 a	100
Acc-6	Guajillo	Domesticado	3/4	1.75 $\pm$ 0.63 a	75
Acc-12	Puya	Domesticado	4/4	2.50 $\pm$ 0.29 a	100
Acc-13	Pasilla	Domesticado	4/4	3.00 $\pm$ 0.00 a	100
Acc-15	Puya	Domesticado	4/4	2.25 $\pm$ 0.25 a	100
Acc-18	Ancho	Domesticado	3/3	2.33 $\pm$ 0.33 a	100
Acc-21	Puya	Domesticado	3/4	0.75 $\pm$ 0.25 a	75
Acc-60	Huacle	Domesticado	4/4	2.25 $\pm$ 0.48 a	100
Acc-61	Huacle	Domesticado	3/4	1.25 $\pm$ 0.48 a	75
Acc-62	Huacle	Domesticado	3/3	2.67 $\pm$ 0.33 a	100
Acc-63	Serrano	Semidomesticado	4/4	2.00 $\pm$ 0.58 a	100
Acc-65	Cascabel	Domesticado	4/4	1.50 $\pm$ 0.29 a	100
Acc-66	Cora	Domesticado	3/4	1.00 $\pm$ 0.40 a	75
Acc-96	Chiltepín	Silvestre	3/4	1.50 $\pm$ 0.50 a	75
Acc-97	Chiltepín	Silvestre	3/3	2.33 $\pm$ 0.67 a	100
Acc-100	Piquín	Semisilvestre	4/4	2.00 $\pm$ 0.58 a	100
Acc-101	Chiltepín	Silvestre	4/4	2.00 $\pm$ 0.40 a	100
Acc-102	Chiltepín	Silvestre	3/4	1.25 $\pm$ 0.63 a	100
Acc-103	Chiltepín	Silvestre	4/4	2.00 $\pm$ 0.00 a	100
Acc-104	Amashito	Silvestre	4/4	2.25 $\pm$ 0.48 a	100
Acc-105	Amashito	Silvestre	4/4	2.5 $\pm$ 0.29 a	100
Acc-106	Pico Paloma	Silvestre	3/3	2.00 $\pm$ 0.58 a	100
Acc-107	Piquín	Semisilvestre	2/3	1.33 $\pm$ 0.33 a	67
Acc-108	Piquín	Semisilvestre	2/3	1.33 $\pm$ 0.67 a	67
Acc-109	Parado	Semidomesticado	4/4	2.75 $\pm$ 0.25 a	100
Acc-110	Parado	Semidomesticado	2/4	0.75 $\pm$ 0.48 a	50
Acc-111	Parado	Semidomesticado	3/4	0.75 $\pm$ 0.25 a	75
Acc-113	Bola	Domesticado	2/3	0.67 $\pm$ 0.33 a	67

TPS = Total de plantas sintomáticas. TPI = Total de plantas inoculadas. SM = Severidad media calculada con una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). ⁱSeveridad media $\pm$ Error Estándar. ⁱⁱMedias con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según prueba de Tukey, $P \leq 0.05$

Análisis de la interacción bacteria-planta. La variación observada entre accesiones puede explicarse por diferencias genéticas que determinan la eficiencia de la transferencia del ADN-T y la respuesta de defensa del hospedero. Algunas plantas pueden activar mecanismos de defensa localizados que limitan la colonización bacteriana, mientras que otras permiten la proliferación inicial y la posterior formación de tumores (Liu et al., 1990; Portillo

et al., 2020).

En el presente estudio, la aparición de agallas bien diferenciadas se consideró evidencia de compatibilidad entre la planta y la bacteria, lo que sugiere una transferencia parcial o completa del ADN-T bacteriano al genoma vegetal. Este fenómeno ha sido documentado en especies de *Capsicum* por Lee et al. (2004) quienes atribuyeron la baja eficiencia de transformación a factores genotipo-dependientes y a la presencia de compuestos fenólicos que inhiben la expresión de los genes *vir* del plásmido Ti.

El comportamiento entre accesiones concuerda con lo reportado por Liu et al. (1990), quienes observaron que las variedades silvestres de *C. annuum* var. *glabriusculum* presentan menor formación de agallas, pero mayor capacidad de regeneración, sugiriendo la existencia de mecanismos de resistencia activa.

Influencia del grado de domesticación en la severidad e incidencia final. La comparación de la severidad final de las agallas inducidas por *A. tumefaciens* GV3101 entre los grupos de domesticación no mostró diferencias significativas ($F=0.54$; $P=0.65$). Las accesiones domesticadas y silvestres mostraron valores de severidad promedio similares a los 35 ddi, sin diferencias estadísticas entre grupos (1.91 ± 0.13 y 1.97 ± 0.16). Sin embargo, en los patrones de incidencia, se observaron contrastes considerables, las accesiones domesticadas presentaron incidencias altas y homogéneas, cercanas al 100% ($92.3 \pm 5.1\%$), mientras que las accesiones silvestres exhibieron una incidencia significativamente menor ($26.7 \pm 8.2\%$), lo que indica que solo una fracción de las plantas silvestres desarrolló tumores visibles (Tabla 3.3).

En conjunto, estos resultados sugieren que, si bien el grado de domesticación no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre la severidad promedio de los síntomas, sí influyó en la uniformidad de la respuesta: las accesiones domesticadas fueron consistentemente susceptibles, mientras que las silvestres mostraron una respuesta más heterogénea, con menor proporción de plantas afectadas.

Tabla 3.3. Severidad media e incidencia (%) de agallas inducidas por *A. tumefaciens* GV3101 a 35 ddi en accesiones de *C. annuum* agrupadas por grado de domesticación.

Grado de domesticación	n	SM ⁱ	Min-Max	Incidencia final (%)	Intervalo observado
Domesticado	14	1.91 ± 0.13 ^{aii}	0 – 3 ⁱⁱⁱ	92 ± 5.1	85-100
Semidomesticado	4	1.56 ± 0.29 ^a	0 – 3	55 ± 6.8	40-65
Semisilvestre	3	1.60 ± 0.31 ^a	0 – 3	69 ± 12.4	20-95
Silvestre	8	1.97 ± 0.16 ^a	0 – 3	27 ± 8.2	10-35

n= número de accesiones que conforman el grupo de domesticación. ⁱSeveridad media ± error estándar. ⁱⁱMedias con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). ⁱⁱⁱLos valores mínimos y máximos corresponden a la severidad observada en las plantas de cada grupo de domesticación, de acuerdo con la escala visual (0–3).

Incidencia final = promedio porcentual de plantas con síntomas al último muestreo (35 ddi). Intervalo observado = rango mínimo y máximo (%) de incidencia dentro de las accesiones de cada grupo.

Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE). El análisis del ABCPE no mostró diferencias significativas entre accesiones ($\chi^2=1.57$; GL=3; $P=0.666$). Aunque se observaron variaciones entre los genotipos, con valores bajos como Acc-110 (2.62 ± 1.68) hasta valores altos como Acc-13 (63 ± 7.42), las pruebas post hoc para ABCPE no detectaron diferencias significativas, por lo que todas las accesiones se consideraron estadísticamente homogéneas en su respuesta a *A. tumefaciens* GV3101 (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) estimada para la severidad media en accesiones de *C. annuum* inoculadas con *A. tumefaciens* GV3101, evaluadas a 35 días después de la inoculación.

Accesión	Grupo	ABCPE SM ⁱ	n (reps)
Acc-2	Domesticado	37.62 ± 12.32 ^{aii}	3
Acc-5	Domesticado	45.50 ± 10.00 ^a	4
Acc-6	Domesticado	36.75 ± 14.40 ^a	4
Acc-12	Domesticado	42.88 ± 5.60 ^a	4
Acc-13	Domesticado	63.00 ± 7.42 ^a	4
Acc-15	Domesticado	42.88 ± 2.99 ^a	4
Acc-18	Domesticado	43.17 ± 7.65 ^a	3
Acc-21	Domesticado	11.38 ± 5.78 ^a	4
Acc-60	Domesticado	23.62 ± 7.61 ^a	4
Acc-61	Domesticado	14.88 ± 7.61 ^a	4
Acc-62	Domesticado	42.00 ± 8.81 ^a	3
Acc-65	Domesticado	21.88 ± 4.82 ^a	4
Acc-66	Domesticado	8.75 ± 3.03 ^a	4
Acc-113	Domesticado	16.33 ± 8.17 ^a	3

Acc-63	Semidomesticado	40.25 ± 12.58 ^a	4
Acc-109	Semidomesticado	37.62 ± 2.99 ^a	4
Acc-110	Semidomesticado	2.62 ± 1.68 ^a	4
Acc-111	Semidomesticado	15.75 ± 6.47 ^a	4
Acc-100	Semisilvestre	42.00 ± 8.08 ^a	4
Acc-107	Semisilvestre	22.17 ± 12.35 ^a	3
Acc-108	Semisilvestre	25.67 ± 13.45 ^a	3
Acc-96	Silvestre	24.50 ± 8.81 ^a	4
Acc-97	Silvestre	44.33 ± 8.17 ^a	3
Acc-101	Silvestre	40.25 ± 5.25 ^a	4
Acc-102	Silvestre	17.50 ± 11.16 ^a	3
Acc-103	Silvestre	40.25 ± 1.75 ^a	4
Acc-104	Silvestre	47.25 ± 7.36 ^a	4
Acc-105	Silvestre	46.38 ± 7.48 ^a	4
Acc-106	Silvestre	40.83 ± 5.83 ^a	3

ⁱSeveridad media ± error estándar. ⁱⁱMedias con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según prueba de Dunn ($P \leq 0.05$). n= número de repeticiones (plantas inoculadas) que se usaron para calcular la media y el error estándar de cada accesión.

Al agrupar las accesiones por grado de domesticación, no se detectaron diferencias significativas en la severidad final a 35 ddi ($\chi^2=1.57$, GL=3, $P=0.66$). Las accesiones domesticadas presentaron en promedio los valores más altos de ABCPE (33.7 ± 2.8), mientras que las semidomesticadas y semisilvestres registraron valores ligeramente menores (29.4 ± 4.6 y 28.7 ± 5.2 , respectivamente). Las accesiones silvestres mostraron un valor intermedio (30.1 ± 3.7). A pesar de estas tendencias, la alta variabilidad interna impidió detectar diferencias estadísticas (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) en accesiones de *C. annuum* agrupadas por grado de domesticación.

Grado de domesticación	ABCPE SM ⁱ	n	Min–Max
Domesticado	33.70 ± 2.80 ^a	14	15 – 60
Semidomesticado	29.40 ± 4.60 ^a	4	18 – 45
Semisilvestre	28.70 ± 5.20 ^a	3	20 – 40
Silvestre	30.10 ± 3.70 ^a	8	12 – 50

ⁱÁrea bajo la curva del progreso de la enfermedad estimada a partir de la severidad promedio ± error estándar de cada grupo de domesticación. n=número de accesiones incluidas en cada categoría de domesticación.

Min–Max=valores mínimo y máximo de ABCPE obtenidos dentro de cada grupo. Letras distintas indican diferencias significativas entre grupos (prueba de Kruskal–Wallis, $P < 0.05$).

Este resultado es de gran importancia, ya que en protocolos de agroinoculación de Geminivirus y otros patógenos, la eficiencia depende en gran medida de la capacidad de la cepa bacteriana para inducir tumores en los tejidos vegetales (Hanley-Bowdoin et al., 2013). La compatibilidad homogénea observada en el ABCPE sugiere que la agroinoculación con *A. tumefaciens* GV3101 puede aplicarse a un rango amplio de accesiones de *Capsicum* para estudios de resistencia viral, sin que el grado de domesticación represente una fuente adicional de variación en la progresión del daño.

Reaislamiento de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101. El reaislamiento a partir de cortes de agallas cultivados en medio YEB/LB suplementado con rifampicina permitió recuperar colonias bacterianas con características morfológicas de *A. tumefaciens* GV3101. Todas las muestras analizadas de accesiones que desarrollaron tumores fueron positivas al reaislamiento, confirmando la persistencia de la bacteria en el tejido vegetal. Estos resultados cumplen con los postulados de Koch, demostrando la relación causal entre la inoculación con *A. tumefaciens* GV3101 y la formación de agallas en accesiones de *C. annuum*. Es importante distinguir que, mientras la transformación genética requiere procesos posteriores de regeneración y selección *in vitro*, la agroinoculación depende principalmente de la capacidad de *A. tumefaciens* para transferir ADN a tejidos vegetales. En este estudio, los resultados demuestran que esta etapa inicial no constituye una limitante en *C. annuum*, lo que respalda el uso de la agroinoculación como herramienta experimental independiente de la eficiencia de regeneración.

CONCLUSIONES

Las accesiones de *C. annuum* evaluadas mostraron una respuesta compatible frente a la infección por *A. tumefaciens* GV3101 no transformada, evidenciada por la formación de agallas y la ausencia de diferencias significativas en la severidad final de agallamiento y en el ABCPE, independientemente del grado de domesticación. Estos resultados indican que la compatibilidad bacteriana no está determinada de manera significativa por el nivel de domesticación de las accesiones. Asimismo, la confirmación del agente causal mediante el reaislamiento de *A. tumefaciens* a partir de las agallas valida el sistema experimental y la relación causal entre la inoculación bacteriana y la formación de tumores.

CAPÍTULO IV. Evaluación de la respuesta de las accesiones de chile con diferente grado de domesticación inoculadas con PepGMV y PHYVV mediante agroinoculación y biobalística.

RESUMEN

El chile (*Capsicum annuum* L.) es un cultivo de gran importancia económica en México, cuya producción se ve limitada por enfermedades virales ocasionadas por *Begomovirus* como *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) y *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), transmitidos por *Bemisia tabaci*. Estos virus afectan tanto cultivares domesticados como poblaciones silvestres, por lo que la identificación y utilización de genotipos resistentes constituyen la estrategia más efectiva para su manejo. En capítulos previos se demostró que las accesiones evaluadas presentan compatibilidad con *Agrobacterium tumefaciens* no transformada, evidenciada por la formación de agallas tras la inoculación bacteriana. Sin embargo, dicha compatibilidad no necesariamente implica la eficiencia en la transferencia y expresión de constructos virales mediada por la bacteria. En este contexto, el presente capítulo empleó dos métodos experimentales de inoculación, agroinoculación y biobalística, con el propósito de inducir la infección por PepGMV y PHYVV en accesiones de *C. annuum* con distinto grado de domesticación. Los ensayos de agroinoculación se realizaron utilizando *A. tumefaciens* GV3101 transformada con clones dímeros de los componentes genómicos A y B de ambos virus. A pesar de repetirse el experimento en tres ocasiones bajo condiciones controladas, y confirmarse la viabilidad bacteriana y la integridad de los plásmidos, no se logró establecer la infección viral en ninguna accesión. Estos resultados sugieren que, aunque existe compatibilidad bacteriana para la inducción de agallas, pueden existir barreras fisiológicas o moleculares que limitan la transferencia, liberación o funcionalidad de los constructos virales en el tejido vegetal. Ante esta limitación con el método de Agroinoculación, se aplicó el método de biobalística, el cual mostró una eficiencia de infección del 96 % y permitió diferenciar claramente las respuestas de resistencia y susceptibilidad entre accesiones. Con el método de Biobalística las accesiones silvestres presentaron menor severidad y menor área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) en comparación con las domesticadas, lo que evidencia que la domesticación ha reducido la variabilidad genética asociada a la resistencia viral. El análisis molecular

confirmó la presencia de ADN viral en plantas asintomáticas, lo que sugiere la existencia de mecanismos de defensa que restringen la replicación o el movimiento viral. En conjunto, los resultados demuestran que la biobalística constituye un método eficaz y reproducible para lograr la coinfección de los componentes A y B de *Begomovirus* en *C. annuum*, mientras que la agroinoculación, aunque viable desde el punto de vista bacteriano, resultó ineficiente para la inducción de la infección viral. Este estudio aporta evidencia sobre la presencia de barreras en la agroinoculación en Chile y resalta la utilidad de la biobalística como herramienta experimental para la identificación de fuentes genéticas de resistencia a PepGMV y PHYVV.

INTRODUCCIÓN

La interacción entre los *Begomovirus* y sus hospederos del género *Capsicum* ha sido ampliamente estudiada debido al impacto económico y productivo que estos patógenos generan en los sistemas agrícolas del mundo. En México, el *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y el *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) son los principales *Begomovirus* que afectan al cultivo de Chile, provocando síntomas de mosaico dorado, amarillamiento y reducción del rendimiento (Anaya-López et al., 2003; Hernández-Espinal et al., 2018).

Aunque el control del vector (*Bemisia tabaci*) sigue siendo el método predominante, su efectividad es limitada y ambientalmente riesgosa. Por ello, la búsqueda de genotipos resistentes y el desarrollo de métodos experimentales eficientes para evaluar la resistencia son prioridades estratégicas en virología (Navas-Castillo et al., 2011; López-Arroyo et al., 2015).

Los métodos más utilizados para introducir *Begomovirus* en plantas incluyen la agroinoculación, basada en el uso de *Agrobacterium tumefaciens* que transfiere el ADN viral mediante el sistema Ti, y la biobalística, que introduce el ADN directamente mediante microproyectiles metálicos (Carrillo-Tripp et al., 2007; Rentería-Canett et al., 2011; Hanley-Bowdoin et al., 2013).

La agroinoculación ha sido exitosa en varias especies de Solanaceae (por ejemplo, *Nicotiana benthamiana*, *Solanum lycopersicum* y *Phaseolus vulgaris*); sin embargo, *C. annuum* es conocido por su recalcitrancia a la transformación mediada por *A. tumefaciens* (Ochoa-Alejo & Ramírez-Malagón, 2001; Arcos-Ortega et al., 2010; Kumar et al., 2012; Park

et al., 2021; Shams et al., 2024). Esta característica limita el estudio funcional de genes virales y la evaluación directa de la resistencia a la infección en este género.

En este contexto, el presente capítulo estudia la eficiencia de los métodos de agroinoculación y biobalística en accesiones de chile con diferente grado de domesticación, con el fin de determinar su aplicabilidad en estudios de resistencia a *Begomovirus*. Si bien los ensayos de agroinoculación no permitieron inducir la infección viral en las accesiones evaluadas, su análisis aporta información relevante sobre la respuesta del sistema experimental y contribuye a sustentar la implementación de la biobalística como un método eficaz para la inoculación controlada de *Begomovirus* en *C. annuum*.

MATERIALES Y METODOS

Inoculación mediante *Agrobacterium tumefaciens* transformada con clones dímeros de PepGMV y PHYVV (Agroinoculación).

Material vegetal. Se utilizaron 17 accesiones de *C. annuum* L. con diferente grado de domesticación (silvestres, semisilvestres, semidomesticadas y domesticadas) provenientes del BG-Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Accesiones de chile seleccionadas para la evaluación de la respuesta a la inoculación con PepGMV y PHYVV mediada por agroinoculación.

No.	Accesión	Tipo o raza	Grado de domesticación	Categoría de manejo
1	Acc-2	Pasilla	Domesticado	Criollo cultivado
2	Acc-6	Guajillo	Domesticado	Criollo cultivado
3	Acc-12	Puya	Domesticado	Criollo cultivado
4	Acc-13	Pasilla	Domesticado	Criollo cultivado
5	Acc-21	Puya	Domesticado	Criollo cultivado
6	Acc-66	Cora	Domesticado	Criollo cultivado
7	Acc-113	Bola	Domesticado	Variedad Mejorada
8	Acc-116	Morron	Domesticado	Variedad Mejorada
9	Acc-109	Parado	Semidomesticado	Traspatio
10	Acc-110	Parado	Semidomesticado	Traspatio
11	Acc-111	Parado	Semidomesticado	Traspatio
12	Acc-112	Bolita	Semidomesticado	Traspatio
13	Acc-70	Chiltepín	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
14	Acc-105	Amashito	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>

15	Acc-106	Pico Paloma	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
16	Acc-107	Piquín	Semisilvestre	Traspatio
17	Acc-108	Piquín	Semisilvestre	Traspatio

Producción de planta. Las semillas de cada accesión se germinaron siguiendo el procedimiento propuesto por García-Nevárez et al. (2010) con algunas modificaciones. Se realizó un tratamiento pregerminativo con NaOH al 10% por 4 minutos seguido de cuatro enjuagues de un minuto con agua destilada. Posteriormente las semillas se dejaron en una solución de 5000 ppm de ácido giberélico (Bio Gib®) durante 24 h a 25 °C. Al final, las semillas de cada accesión se sembraron en charolas de 50 cavidades previamente preparadas con *Peat moss* como sustrato.

Posterior a la siembra, se aplicó una suspensión de fungicida (3.0 mL por cavidad de Interceptan® 2.0 g/L).

Los semilleros se regaron y cubrieron con plástico negro e incubaron en oscuridad a temperatura ambiente hasta la emergencia de plántulas. Una vez emergidas las plántulas, se retiró el plástico y las charolas con plantas se mantuvieron con fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad a una temperatura entre 28±2° C. Cuando las plántulas presentaron de 4 a 6 hojas verdaderas, se procedió a la inoculación con los virus mediante el método de Agroinoculación.

Clonas virales. Los clones infecciosos diméricos de PepGMV y PHYVV fueron donados por el Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, Unidad Irapuato. Las construcciones de los genes PHYVV y PepGMV se clonaron en el vector pGreen y se transformaron en la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* para estudios de agroinoculación (Figura 4.1). (Bonilla-Ramírez et al., 1997; Rodríguez-Gandarilla et al., 2020).

Inoculación de virus por agroinoculación. Se prepararon cultivos líquidos en medio YEB de *A. tumefaciens* transformada con los dímeros virales A y B por separado de cada virus clonado en el vector pGreen y se mantuvieron a 28 °C durante 4 días con agitación. Los cultivos se centrifugaron, se lavó la pastilla con medio MES 10 mM, MgCl₂ 10 mM, se volvió a centrifugar, después se resuspendió la pastilla en medio MES y 100 μM de acetosiringona, se ajustó a OD 600 = 0.5-0.8 y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h sin agitación (Cañizares et al., 2015).

42

tumefaciens sin transformar (células competentes), además de la inoculación con solo agua. De cada accesión se inocularon 5 plantas para cada virus y 5 plantas para cada control.

Evaluación de los síntomas. La evaluación de la respuesta sintomática de las accesiones de *C. annuum* agroinoculadas con clones infecciosos de PepGMV y PHYVV, se realizó mediante observaciones de severidad e incidencia durante 35 días posteriores a la inoculación (Tabla 4.2). Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento (25 ± 2 °C, 16/8 h luz/oscuridad). El experimento de agroinoculación se llevó a cabo en tres ensayos independientes, utilizando plantas en condiciones controladas.

Tabla 4.2. Escala de severidad de los síntomas modificada para *Virus huasteco vena amarilla del chile* (PHYVV) y el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV).

Severidad	Síntomas	
	PepGMV	PHYVV
0	Sin síntomas	Sin síntomas
1	Ligera distorsión en las hojas apicales y puntos amarillos visibles en las hojas. Puntos amarillos visibles en parches aislados en hojas apicales.	Presencia de puntos en grupos aislados ligeramente amarillos. Arrugamiento leve de las hojas apicales.
2	Mosaicos aislados y amarillos formando una red en la base de las hojas apicales.	Los grupos de puntos aislados empiezan a observarse como una red en la base de las hojas apicales.
3	Hojas rizadas en la parte media. Ligera curvatura de las hojas y arrugadas ligeramente distorsionadas.	Formación de protuberancias en forma de ínsulas en las partes medias de las hojas y comienzan a encurvarse ligeramente.
4	Distorsión completa de las hojas y son de menor tamaño con respecto al control.	Las hojas curvadas comienzan a distorsionarse. Las hojas de las plantas afectadas son de menor tamaño.

Elaboración propia

Inoculación de PepGMV y PHYVV mediada por biobalística.

Material vegetal. Se utilizaron 15 accesiones de *Capsicum annuum* L. con diferente grado de domesticación (silvestres, semidomesticadas y domesticadas) provenientes del BG del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (Tabla 4.3). Las accesiones representan amplia diversidad genética y geográfica, e incluyen materiales silvestres recolectados *in situ*, criollos cultivados, una fuente de resistencia a *Phytophthora capsici* (CM334), y una variedad comercial mejorada.

Tabla 4.3. Accesiones de chile (*Capsicum annuum*) seleccionadas para la evaluación de la respuesta a la inoculación con PepGMV y PHYVV en accesiones de chile mediada biobalística.

Accesión	Región de origen	Tipo o raza	GD	Categoría de manejo
Acc-6	Zacatecas	Guajillo	D	Criollo cultivado
Acc-12	Zacatecas	Puya	D	Criollo cultivado
Acc-21	Zacatecas	Puya	D	Criollo cultivado
Acc-50	Zacatecas	Ancho	D	Criollo cultivado
Acc-60	Oaxaca	Huacle	D	Criollo cultivado
Acc-62	Oaxaca	Huacle	D	Criollo cultivado
Acc-63	Morelos	Serrano CM334	SD	Criollo no cultivado
Acc-65	Jalisco	Cascabel	D	Criollo cultivado
Acc-66	Nayarit	Cora	D	Criollo cultivado
Acc-67	Oaxaca	Chile de agua	D	Criollo cultivado
Acc-70	Querétaro	Chiltepín	S	Silvestre
Acc-104	Tabasco	Amashito	S	Silvestre
Acc-105	Tabasco	Amashito	S	Silvestre
Acc-106	Tabasco	Pico Paloma	S	Silvestre
Acc-113	Variedad mejorada	Bola	D	Variedad cultivada

GD = Grado de domesticación. D = Domesticado. SD = Semidomesticado. S = Silvestre.

Producción de planta. La siembra y producción de planta del juego de accesiones se realizó aplicando el mismo procedimiento utilizado en el método de Agroinoculación. Cuando las plántulas presentaron de 4 a 6 hojas verdaderas, se procedió a la inoculación con los virus mediante biobalística (Carrillo-Trip et al., 2007).

Clones virales y hospedero bacteriano. Los clones dímeros completos de los componentes A y B de *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) se obtuvieron del Dr. Rafael Rivera Bustamante (CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato). Los fragmentos se encontraban insertos en el vector pBluescript y mantenidos en *A. tumefaciens* contruidos y descritos por Carrillo-Tripp et al. (2007).

Preparación de partículas para bombardeo. Se usaron 60 mg de partículas de tungsteno de 0.7 μm (Bio-Rad, Hércules, CA, EE. UU.), se lavaron con 2.0 mL HNO_3 , se sonicaron durante 20 min con H_2O y hielo en tubos de vidrio Corex®. Posteriormente las partículas se colocaron en tubos para microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugaron y se decantó el HNO_3 y se adicionó 1.0 mL de alcohol absoluto, se sonicó y se mezcló por un

min. Después se centrifugó la muestra a 12,000 rpm durante 15 minutos. Se retiró el alcohol absoluto y se agregó 1.0 mL de H₂O destilada estéril. Por último, se tomaron 250 µl de partículas y se agregaron 700 µl de H₂O destilada estéril. Para recubrir las partículas con ADN viral (clones diméricos infecciosos), estas se sonicaron y se tomaron 50 µl y se transfirieron a un tubo nuevo de 1 mL (para 6 disparos). Se adicionó 5 µl (1 µg/µl) del ADN viral y 50 µl de CaCl₂ 2.5 M y 20 µl de espermidina 0,1 M. La suspensión se agitó durante 1 min, se sonicó y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y el sedimento que contenía las micropartículas se lavó una vez con 500 µl de etanol absoluto, después se sonicó y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min; se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 60 µl de etanol para bombardeo (Garzón-Tiznado, et al., 1993).

Inoculación de las plantas con PepGMV y PHYVV. Las clonas infecciosas PepGMV y PHYVV fueron inoculados por separado. Las plantas de cada accesión se organizaron en charolas independientes, cada una correspondiente a una accesión específica. El número de plantas por charola varió entre un mínimo de 15 y un máximo de 45 plantas, dependiendo de la disponibilidad y germinación de las semillas, la cual fue variable entre accesiones. Cada charola se dividió en tres secciones: una destinada a la inoculación con PepGMV, otra para PHYVV y la tercera sección con cinco plantas control, las cuales fueron bombardeadas únicamente con partículas sin recubrimiento de ADN viral. Este diseño permitió evaluar de manera independiente la respuesta de cada accesión frente a la infección de ambos *Begomovirus*.

Las partículas previamente preparadas con las clonas de PepGMV y PHYVV se aplicaron mediante biobalística. La inoculación se realizó sobre la primera y la segunda hoja más jóvenes; el disparo se realizó al centro de la hoja, cerca de la nervadura principal.

Las micropartículas de tungsteno se aceleraron mediante presión de Helio a 100 o 120 psi utilizando un dispositivo de conducción adaptado (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993).

Condiciones de incubación. Las plantas se mantuvieron en cámara de crecimiento (27 ± 2 °C, 16/8 h luz/oscuridad).

Evaluación de la severidad e incidencia de la virosis. Las plantas inoculadas fueron mantenidas en cámara de crecimiento con un fotoperiodo 16:8 (luz: oscuridad) a una

temperatura media de 27 ± 2 °C (Godínez-Hernández et al., 2001). La severidad por virosis fue evaluada de manera cualitativa utilizando las escalas propuestas por Anaya-López (2003) para PepGMV y por Torres-Pacheco (1997) para PHYVV con modificaciones (Tabla 4.2). Se tomaron lecturas semanales de severidad por planta y accesión, iniciando a los 7 días y hasta los 35 días postinoculación (dpi). Se documentó el progreso de la enfermedad con fotografías a los 7, 14, 21, 28 y 35 dpi para identificar síntomas y características fenotípicas generadas por cada virus y relacionarlas con la escala de severidad (Tabla 4.2).

Análisis de infección viral mediante PCR en plantas asintomáticas. Se tomaron muestras de tejido de hojas distales (hojas nuevas) a los 14 dpi de las plantas de cada accesión que no mostraron los síntomas característicos del virus. Para la extracción de DNA, se usaron 0.01 gramos de tejido pulverizado siguiendo el protocolo de CTAB con modificaciones (Doyle y Doyle, 1990). Para la identificación de DNA viral de PepGMV y PHYV, se utilizaron 20 ng de ADN. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (SelectCycler™ II. Select BioProducts) con los oligonucleótidos específicos para cada virus.

Para PepGMV se utilizaron los oligonucleótidos forward 5'-CAAAGCTGGTGATCCGAAAACG-3' y reverse 5'-GTTAACGAGGATAATGGATAAGG-3' (121 pb) que amplifican un fragmento del gen de la proteína Rep, para amplificar el fragmento del gen de la proteína CP del mismo virus, se utilizaron los oligonucleótidos forward 5'-CCCATCGTGTAGGCAAGCGTTTCTG-3' y reverse 5'-CATGACGCTGTTGGTGTGGTTCTTG-3' (104 pb) (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007).

Para PHYVV, los oligonucleótidos utilizados fueron forward 5'-CGTCTCGCTCAACTACAAAACC-3' y reverse 5'-ATCGGTTGTTCGTGCATTGG-3' (142 pb) que amplifica un fragmento del gen de la proteína Rep, y los que amplifican un fragmento del gen de la proteína CP; forward 5'-CCTCAGCTTGGGTAAATCGC-6' y reverse 5'-CCTTACAGGGACCTTCACAACC-3' (99 pb) (Rodríguez-Gandarilla et al., 2020).

Las condiciones de la PCR para ambos virus fueron un ciclo de 94 °C durante 5 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 58 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, y después un ciclo

de extensión final de 72 °C durante 10 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con Bromuro de etidio, visualizados bajo luz ultravioleta en un transiluminador DyNA (Dual intensity UV Transilluminator).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos semanales de severidad por planta y accesión se organizaron en una base de datos para su análisis estadístico. Se estimó la media de la severidad semanal por accesión, causada por cada virus, así como el porcentaje de incidencia (% de plantas con severidad > 0). Con los datos anteriores de severidad media y % de incidencia se calculó el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), para lo cual se aplicó la fórmula propuesta por Pedroza (1999). El ABCPE fue analizada mediante la prueba de Kruskal-Wallis para detectar diferencias significativas en el progreso y cantidad de la enfermedad acumulada por las accesiones.

La respuesta de las accesiones de Chile a la inoculación fue analizada de manera independiente para cada virus (PepGMV y PHYVV). En cada caso, se realizó un ANOVA factorial de dos vías que consideró los efectos de la accesión y el tiempo (dpi) sobre la severidad de los síntomas. Las diferencias entre accesiones a 35 dpi se analizaron mediante pruebas de Tukey ($p < 0.05$).

La influencia del nivel de domesticación de las accesiones sobre la severidad de cada virus se analizó agrupando las accesiones domesticadas, semidomesticadas y silvestres. Las diferencias en severidad fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía a los 35 dpi seguido de pruebas de Tukey ($p < 0.05$).

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el paquete estadístico R (versión 4.3.3) y GraphPad Prism (versión 10.5.0) para los gráficos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Bioensayos de agroinoculación con *A. tumefaciens* transformada con clones dímeros de PepGMV y PHYVV. Se realizaron tres ensayos independientes de agroinoculación utilizando *A. tumefaciens* GV3101 con los clones dímeros del ADN-A y ADN-B de PepGMV y PHYVV en plántulas de 17 accesiones de *C. annuum* con distinto grado de domesticación.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A pesar de cumplir las condiciones óptimas reportadas (pH, densidad bacteriana $OD_{600} = 0.8$, acetosiringona $200 \mu M$ y temperatura de $25^{\circ}C$), ninguna accesión desarrolló síntomas de infección viral. Las plantas permanecieron sanas y con desarrollo normal.

La ausencia de infección viral mediada por agroinoculación no debe interpretarse como un error experimental. Considerando que las accesiones mostraron compatibilidad con *A. tumefaciens* no transformada, al mostrar una interacción planta-bacteria, sin embargo, los resultados de agroinoculación sugieren la presencia de barreras asociadas al proceso de transferencia, liberación o funcionalidad de los constructos virales. En este contexto, el fenómeno puede interpretarse como una forma de recalcitrancia del sistema a la agroinoculación viral, lo que respalda la implementación de métodos alternativos, como la biobalística, para lograr una infección viral reproducible.

Bioensayos de inoculación mediante biobalística con clones dímeros de PepGMV y PHYVV.

Eficiencia y evaluación fenotípica de la infección. La inoculación de plántulas de *C. annuum* mediante biobalística con los clones dímeros de *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) resultó efectiva, con una tasa de infección global del 96 % confirmada por diagnóstico molecular. Las plantas testigo, bombardeadas con partículas de tungsteno sin ADN viral, no presentaron síntomas, lo que descarta que las lesiones observadas se debieran al procedimiento físico del bombardeo.

Los primeros síntomas visibles de infección se observaron entre los 7 y 14 días postinoculación (dpi), dependiendo del virus y la accesión. La progresión sintomática permitió establecer una escala pictórica de severidad (0-4) que describe la evolución de los síntomas desde la ausencia de infección hasta las manifestaciones más severas.

En el caso de PepGMV, los síntomas iniciaron con mosaico y clorosis leve en hojas jóvenes, seguidos de deformación foliar y reducción del tamaño de las hojas en etapas avanzadas. Para PHYVV, la sintomatología se caracterizó por amarillamiento de nervaduras, enrollamiento del limbo y moteado clorótico que progresó hacia un mosaico generalizado (Figuras 4.2 y 4.3). En ambos virus, la severidad máxima se alcanzó entre los 28 y 35 dpi.

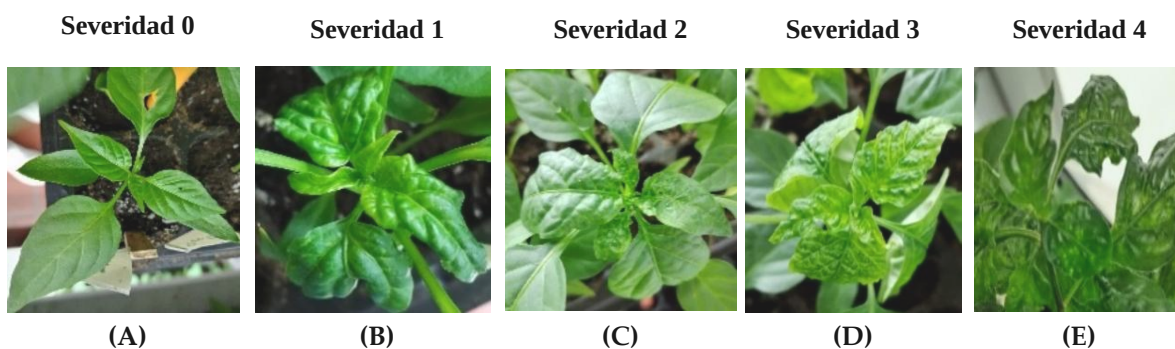


Figura 4.2. Escala pictórica de severidad de síntomas en plantas de chile inoculadas con PepGMV. (A) Severidad 0: Plantas sin síntomas, (B) Severidad 1: Síntomas iniciales, (C) Severidad 2: Síntomas avanzados, (D) Severidad 3: Síntomas severos, (E) Severidad 4: Síntomas muy severos. (Fotografía: elaboración propia).

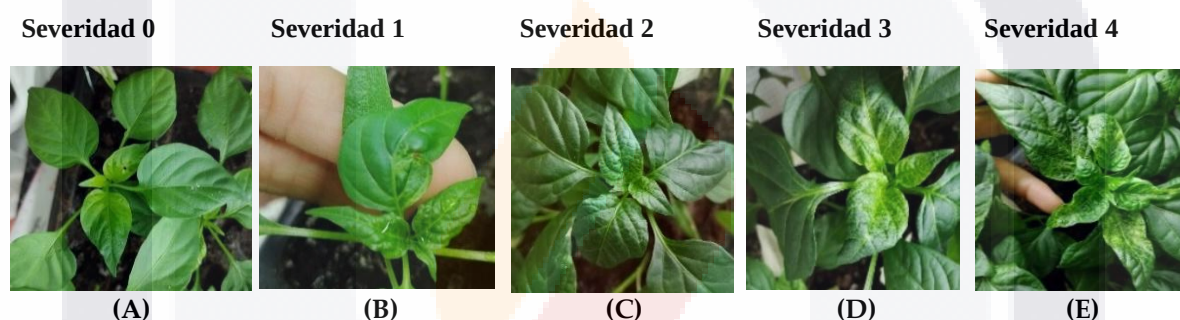


Figura 4.3. Escala pictórica de severidad de síntomas en plantas de chile infectadas con PHYVV. (A) Severidad 0: Plantas sin síntomas, (B) Severidad 1: Síntomas iniciales, (C) Severidad 2: Síntomas avanzados, (D) Severidad 3: Síntomas severos, (E) Severidad 4: Síntomas muy severos. (Fotografía: elaboración propia).

Incidencia y severidad de los síntomas. La evaluación de los síntomas a los 35 días dpi mostró una amplia variabilidad en la incidencia y severidad entre las 15 accesiones de *C. annuum* inoculadas con PepGMV y PHYVV (Tabla 4.4). En general, se observó una mayor incidencia y severidad en respuesta a PHYVV en comparación con PepGMV.

Para PepGMV, la incidencia osciló entre 0% (Acc-106) y 67% (Acc-12 y Acc-113) con un promedio general de 40% (Tabla 4.4). La severidad media general fue de 0.65. La accesión que mostró la severidad más baja fue la Acc-106 (0, Pico Paloma), en contraste con la Acc-113 (1.33, Bola). Si bien, la severidad media presentada por las 15 accesiones en respuesta al PepGMV no rebasó el nivel de 1.4 en la escala de 0 a 4 (Tabla 4.2), la diferencia detectada entre algunas accesiones es estadísticamente significativa. Para PHYVV, la

incidencia fue más alta (77% en promedio), variando entre 13% (Acc-106) y 100% (Acc-113) (Tabla 4.4). La severidad media general fue de 1.10. La severidad más baja se observó en la Acc-106 (0.130, Pico paloma)) mientras que Acc-06 (Guajillo) presentó la mayor severidad (2.30).

Tabla 4.4. Severidad media e incidencia (%) de los síntomas a los 35 dpi en 15 accesiones de *Capsicum annuum* inoculadas con el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV) y *Virus huasteco vena amarilla del chile* (PHYVV).

Accesión	Tipo o Raza	GD	PepGMV				PHYVV			
			TPS/T PI	Rango Min-Max	MS ⁱ (0-4)	% Inci.	TPS/ TPI	Rango Min-Max	MS (0-4)	% Inci.
Acc-06	Guajillo	D	7/15	0-2.0	0.87 ± 0.19 ab ⁱⁱ	47	13/14	0-3.0	2.30 ± 0.20 a	93
Acc-12	Puya	D	12/18	0-2.0	0.89 ± 0.18 ab	67	17/19	0-2.0	1.16 ± 0.17 b	89
Acc-21	Puya	D	9/17	0-1.0	0.52 ± 0.18 ab	53	14/17	0-2.0	1.06 ± 0.18 bc	82
Acc-50	Ancho	D	6/12	0-2.0	0.92 ± 0.22 ab	50	10/11	0-2.0	1.09 ± 0.23 bc	91
Acc-60	Huacle	D	3/15	0-1.0	0.20 ± 0.20 ab	20	13/15	0-3.0	1.33 ± 0.20 ab	87
Acc-62	Huacle	D	6/16	0-2.0	0.62 ± 0.19 ab	38	12/16	0-4.0	1.31 ± 0.19 b	75
Acc-63	Serrano CM334	SD	3/10	0-2.0	0.50 ± 0.24 ab	30	8/10	0-2.0	0.90 ± 0.24 bc	80
Acc-65	Cascabel	D	3/17	0-2.0	0.24 ± 0.19 ab	18	17/18	0-2.0	1.06 ± 0.18 bc	94
Acc-66	Cora	D	10/16	0-2.0	0.81 ± 0.20 ab	63	15/16	0-2.0	1.38 ± 0.19 ab	94
Acc-67	Chile de agua	D	3/8	0-2.0	0.75 ± 0.27 ab	38	4/8	0-2.0	0.88 ± 0.27 bc	50
Acc-70	Chiltepín	S	3/12	0-2.0	0.33 ± 0.22 ab	25	9/13	0-2.0	1.15 ± 0.21 b	69
Acc-104	Amashito	S	2/7	0-4.0	0.71 ± 0.30 ab	29	2/7	0-3.0	0.85 ± 0.29 bc	29
Acc-105	Amashito	S	4/9	0-3.0	1.11 ± 1.26 a	44	2/9	0-2.0	0.44 ± 0.25 bc	22
Acc-106	Pico Paloma	S	0/15	0	0 b ± 0.20 b	0	2/15	0-1.0	0.13 ± 0.20 c	13
Acc-113	Bola	D	4/6	0-2.0	1.33 ± 0.31 a	67	5/5	0-2.0	1.60 ± 0.34 ab	100
Promedio general			75/193		0.65 ± 0.10	40	143/193		1.10 ± 0.13	77

GD = Grado de domesticación. D = Domesticado, SD= Semidomesticado y S = Silvestre.

TPS = Total de plantas sintomáticas. TPI = Total de plantas inoculadas. MS = Media de la severidad calculada con una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Inci. = Incidencia.

ⁱSeveridad media ± error estándar.

ⁱⁱMedias con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

Influencia del nivel de domesticación de las accesiones en la respuesta a la inoculación viral. Los resultados del ANOVA factorial por grupos de domesticación se presentan en el Tabla 4.5. En ambos virus, el grado de domesticación tuvo un efecto significativo sobre la severidad observada (PepGMV: $F = 13.055$, $p < 0.001$; PHYVV: $F = 63.663$, $p < 0.001$), lo que indica que el nivel de domesticación influyó de manera importante en la expresión de los síntomas. Específicamente, las accesiones silvestres y semidomesticadas mostraron una menor severidad en comparación con las accesiones domesticadas, lo cual sugiere una mayor tolerancia o resistencia natural en los grupos menos domesticados. El tiempo también fue significativo en ambos virus (PepGMV: $F = 12.535$, p

< 0.001; PHYVV: $F = 34.779$, $p < 0.001$), confirmando que la severidad de los síntomas aumentó con el avance de los dpi. Por el contrario, no se detectó una interacción significativa entre el grado de domesticación y el tiempo (PepGMV: $F = 0.226$, $p = 0.986$; PHYVV: $F = 1.051$, $p = 0.396$), lo que indica que la progresión temporal de los síntomas fue consistente dentro de cada grupo de domesticación (Tabla 4.5). Es decir, aunque los niveles de severidad variaron según el grado de domesticación, el patrón de incremento o estabilidad a lo largo del tiempo fue similar entre grupos.

Tabla 4.5. Análisis de varianza factorial para severidad de los síntomas causados por PepGMV y PHYVV considerando el grado de domesticación y el tiempo (dpi).

Fuente de variación	PepGMV			PHYVV		
	GL	F	P	GL	F	P
Grado de Domesticación	2	13.055	0.000 **	2	63.663	0.000 **
Tiempo (dpi)	4	12.535	0.000 **	4	34.779	0.000 **
Grado de domesticación x Tiempo (dpi)	8	0.226	0.986 ns	8	1.051	0.396 ns
Error	950			950		
Total	964			964		

** Altamente significativo

ns = no significativo

GL = Grados de libertad

F = Estadístico F

P = Valor de P

En la Tabla 4.6 se presenta la severidad media, el rango de severidad (valores mínimo y máximo entre accesiones dentro de cada grupo) y el porcentaje de incidencia para los grupos de domesticación (silvestres, semidomesticados y domesticados) de las accesiones de *C. annuum*. Las accesiones domesticadas presentan, en promedio, una mayor severidad e incidencia frente a ambos virus, especialmente a PHYVV. En contraste, las accesiones silvestres registraron los valores más bajos en ambos.

Tabla 4.6. Influencia del nivel de domesticación en la respuesta a PepGMV y PHYVV en accesiones de chile a los 35 dpi.

Nivel de domesticación	n	PepGMV			PHYVV		
		SM ⁱ	Min- Max ⁱⁱⁱ	% Inci.	SM	Min- Max	% Inci.
Domesticado	10	0.66 ± 0.07 a ⁱⁱ	0.20-1.33	45	1.30 ± 0.07 b	0.88-2.30	86
Semidomesticado	1	0.50 ± 0.27 a	0.50	30	0.90 ± 0.26 ab	0.90	80
Silvestre	4	0.44 ± 0.13 a	0-1.11	21	0.61 ± 0.12 a	1.15-0.13	34

n= total de accesiones que conforman el grupo de domesticación.

ⁱSeveridad media ± error estándar.

ⁱⁱMedias con la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes según prueba de Tukey ($P \leq 0.05$)

ⁱⁱⁱValor mínimo y máximo de severidad media entre accesiones que integran cada grupo de domesticación.

Estos resultados coinciden con observaciones previas que destacan la relevancia de las poblaciones silvestres de *Capsicum* como fuentes de resistencia a patógenos, debido a su amplia variabilidad genética y adaptación ambiental (Pickersgill, 1991; Hernández-Verdugo et al., 2001; Meyer & Purugganan, 2013). Las accesiones no sometidas a selección artificial conservan caracteres ancestrales asociados a la defensa, lo que explica la menor severidad e incidencia observadas en las formas silvestres y semidomesticadas.

Esta tendencia se ha reportado también en *C. chinense* y *C. annuum*, donde la resistencia a *Begomovirus* se atribuye a la baja acumulación de ADN viral o a la ausencia de síntomas visibles (Godínez-Hernández-Verdugo et al., 2001; Retes-Manjarrez et al., 2016).

Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad. Los resultados del ABCPE, calculados a partir de la severidad media e incidencia para cada una de las 15 accesiones inoculadas con PepGMV y PHYVV durante los 35 dpi, así como la clasificación final de las accesiones según su nivel de respuesta a cada virus (Resistente, Tolerante o Susceptible) se presentan en el Tabla 6.2 del Capítulo VI. El análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para ABCPE mostró diferencias significativas entre las accesiones para ambos virus; PepGMV ($\chi^2 = 54.12$, $gl = 14$, $P < 0.001$) y PHYVV ($\chi^2 = 43.17$, $gl = 14$, $P < 0.001$).

Para PHYVV, se observó una mayor progresión y acumulación de la enfermedad en la mayoría de las accesiones. Aunque Acc-106 (silvestre) mantuvo un valor bajo (ABCPE= 0.93), las accesiones silvestres Acc-105 y Acc-104 (ambas silvestres, Amashito) también presentaron valores bajos (ABCPE= 2.33 y 5.50, respectivamente), clasificándose como tolerantes y moderadamente susceptible (Figuras 4.4 A-C). En contraste, la accesión domesticada Acc-06 (Guajillo) presentó los valores más altos (ABCPE= 16.00), clasificándose como susceptible (Figura 4.4 D).

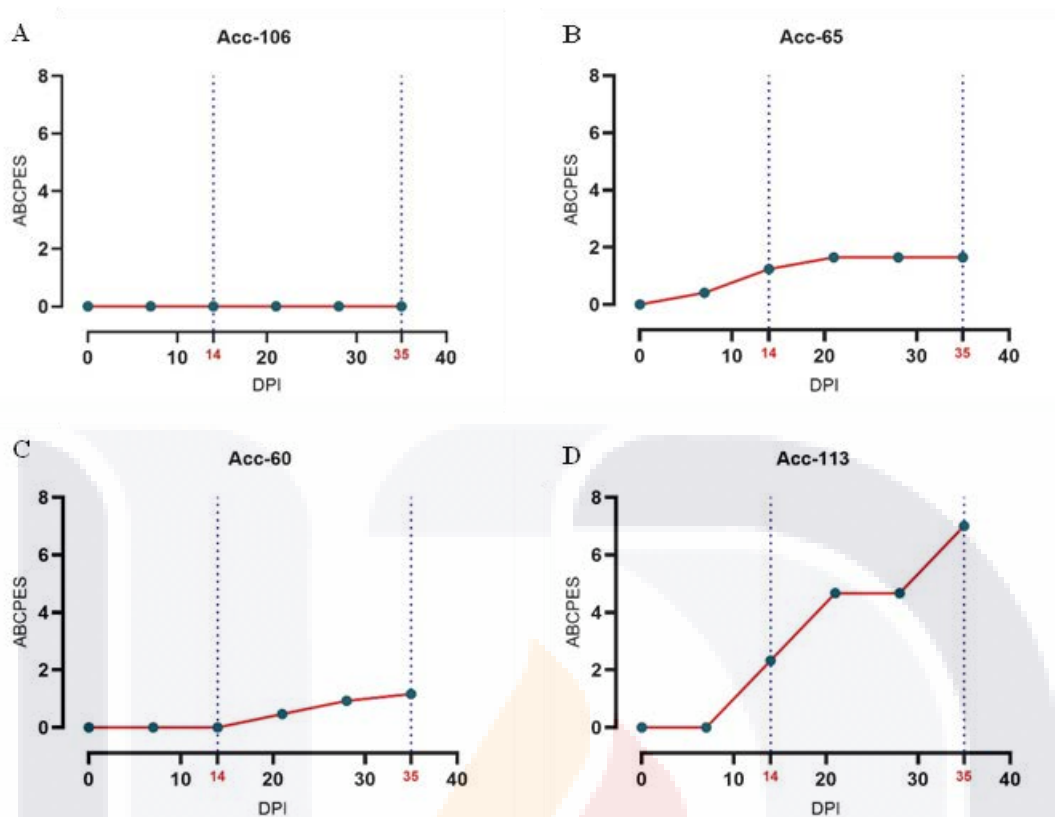


Figura 4.4. Dinámica del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para la severidad media causada por PepGMV en cuatro accesiones de *Capsicum annuum* con distinto nivel de susceptibilidad. (A) Acc-106 (silvestre) Resistente. (B) Acc-65 (domesticada) Tolerante. (C) Acc-60 (domesticada) Tolerante. (D) Acc-113 (domesticada) Moderadamente Susceptible.

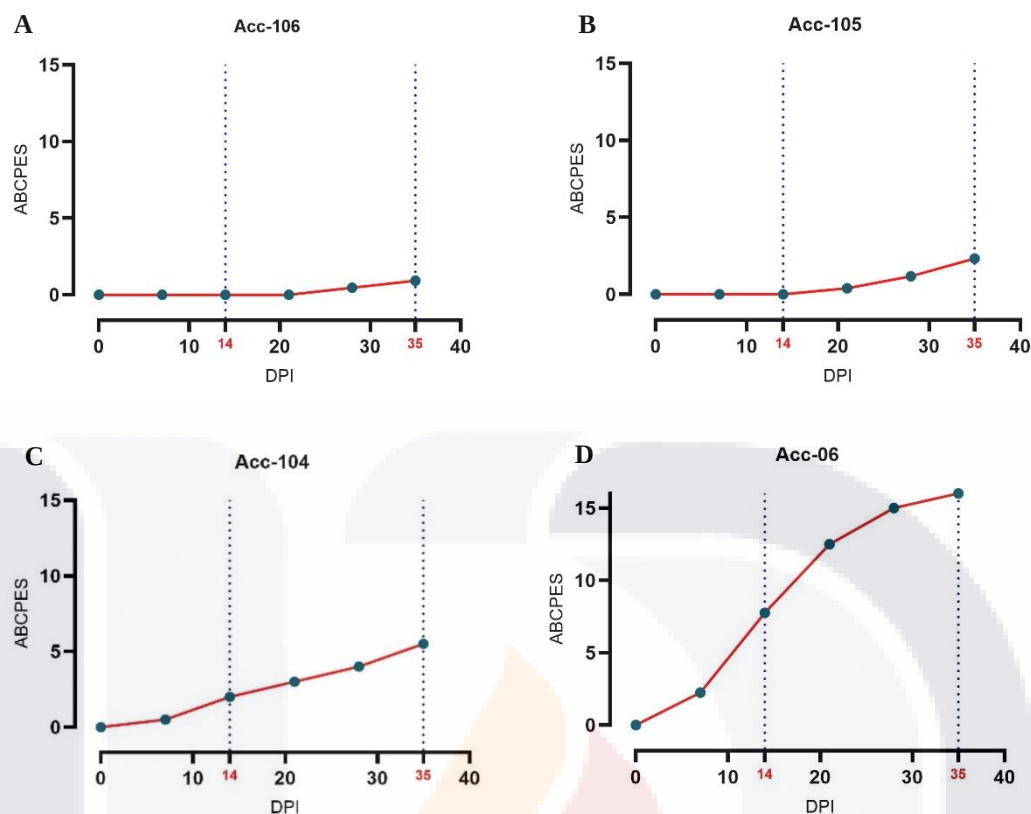


Figura 4.5. Dinámica del área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) para la severidad media causada por PHYVV en cuatro accesiones de *Capsicum annuum* con distinto nivel de susceptibilidad. (A) Acc-106 (silvestre) Tolerante. (B) Acc-105 (silvestre) Tolerante. (C) Acc-104 (silvestre) Tolerante. (D) Acc-06 (domesticada) Susceptible.

Identificación de PepGMV y PHYVV en plantas asintomáticas mediante PCR.

Se analizaron 154 plantas de las 167 plantas asintomáticas, obteniendo un 96% de resultados positivos. En particular, para el virus PepGMV, el 98% de las muestras resultaron positivas para la presencia del virus, mientras que para PHYVV el 91% fueron positivas (Figura 4.6).

La detección molecular por PCR en plantas asintomáticas confirmó la presencia de ADN viral en el 96 % de las muestras, lo que evidencia infecciones latentes. En la accesión Acc-106, la amplificación inconsistente de los genes Rep y CP sugiere la activación de mecanismos antivirales que limitan la replicación y el ensamblaje viral, lo cual concuerda con los mecanismos descritos por Hull (1991), Rojas et al. (2005) y García-Neria et al. (2011), quienes señalan que la resistencia puede deberse a la restricción del movimiento o de la replicación viral dentro de la planta.

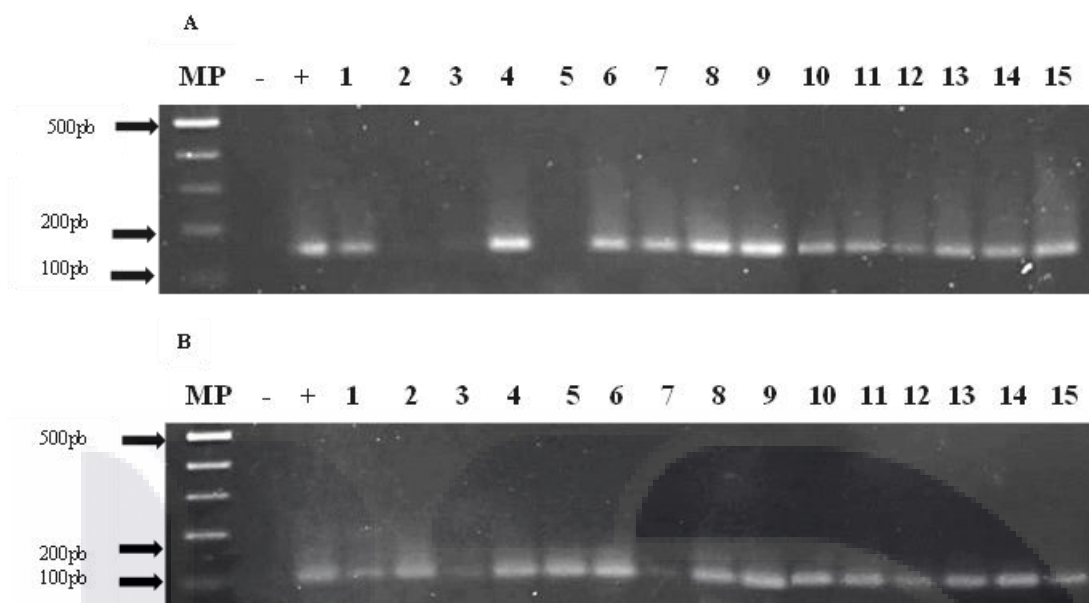


Figura 4.6. Identificación por PCR de ADN viral de PepGMV en 15 plantas asintomáticas de Chile Acc-106. (A) Amplificación del fragmento de la proteína Rep (121 pb) y (B) Amplificación del fragmento de la proteína CP (104 pb). Muestras tomadas a los 14 días después de la inoculación. Carril 1: Marcador de 100 pb, Carril 2: control negativo (hojas bombardeadas sin ADN viral). Carril 3: Control positivo (hojas sintomáticas). Los carriles con números 1 al 15 corresponden a las plantas asintomáticas de Acc-106.

Comparación entre métodos: Agroinoculación vs. Biobalística. Finalmente, la comparación metodológica entre la agroinoculación y la biobalística mostró que mientras la primera no produjo infección detectable, la segunda alcanzó un alto nivel de eficiencia (96 %).

Este hallazgo coincide con Carrillo-Tripp et al. (2006) y Rentería-Canett et al. (2011), quienes reportaron que la biobalística supera las limitaciones impuestas por la recalcitrancia de *Capsicum* a la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Así, la biobalística se consolida como un método más efectivo, reproducible y menos dependiente del genotipo vegetal para la inoculación experimental de *Begomovirus*.

En conjunto, los resultados obtenidos confirman que la respuesta de *Capsicum* frente a los *Begomovirus* PepGMV y PHYVV está fuertemente influenciada por el grado de domesticación, y que las accesiones silvestres representan un recurso valioso para programas de mejoramiento genético orientados a la resistencia contra virus fitopatógenos.

La identificación de accesiones como Acc-106, que combina ausencia de síntomas con detección positiva del virus, sugiere la existencia de mecanismos de defensa que limitan la replicación y dispersión viral, aportando evidencia funcional del potencial de las formas silvestres como fuentes de resistencia natural.

CONCLUSIONES

La ausencia de infección no representa un fallo experimental, sino una evidencia de la recalcitrancia de *C. annuum* a la infección mediada por *A. tumefaciens*, reforzando la necesidad de recurrir a métodos alternativos como la biobalística.

La inoculación mediante biobalística permitió una transmisión eficiente de *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) en accesiones de *Capsicum annuum*, evidenciando diferencias significativas en la respuesta según el grado de domesticación. Las accesiones silvestres mostraron mayor resistencia o tolerancia, mientras que las domesticadas fueron más susceptibles, confirmando que la domesticación ha reducido la capacidad defensiva del cultivo frente a los Begomovirus. La accesión silvestre Acc-106 (Pico Paloma) destacó por su resistencia y/o tolerancia a ambos virus, representando un recurso genético de alto valor para programas de mejoramiento. Los análisis moleculares confirmaron la presencia de ADN viral en plantas asintomáticas, sugiriendo mecanismos de defensa que limitan la replicación o el movimiento sistémico del virus. En conjunto, la biobalística se consolidó como una herramienta eficaz, reproducible y sustentable para la evaluación e identificación de resistencia viral en Chile.

CAPÍTULO V. Evaluación de las accesiones de chile contra *Begomovirus* bajo infección natural en una localidad con alta presión de la enfermedad.

RESUMEN

En este capítulo se describe el establecimiento y monitoreo de un ensayo de campo destinado a evaluar la respuesta de accesiones de *Capsicum annuum* L. frente a la infección natural por *Begomovirus* en una localidad con antecedentes de alta presión de virosis. Se utilizaron veintidós accesiones con diferente número de semilla sembradas, y germinadas bajo tratamiento pregerminativo y en sustrato *peat moss*. A los 50 días después de la emergencia, las plántulas fueron trasplantadas el 11 de abril de 2025 en la localidad de San Jacinto, municipio de Cosío, Aguascalientes. La zona había sido muestreada el año anterior, confirmándose la presencia de *Bemisia tabaci* en chiles comerciales y de síntomas virales, por lo que se consideró un sitio idóneo para infección natural. Sin embargo, durante el ciclo 2025 no se detectó la presencia de mosquita blanca, a pesar del monitoreo semanal mediante trampas pegajosas amarillas y muestreos con red entomológica. Las trampas se reemplazaron cada 14 días y el ensayo se mantuvo bajo observación hasta el 14 de agosto del 2025 (125 días postrasplante), fecha en que el productor eliminó el cultivo por causas ajenas al experimento. Aunque no se logró la infección natural esperada, el estudio permitió documentar la variabilidad interanual en la incidencia del vector y resalta la necesidad de considerar la dinámica poblacional de *B. tabaci* en el diseño de ensayos de campo, así como la conveniencia de complementar este tipo de estudios con métodos de inoculación controlada, como la biobalística.

INTRODUCCIÓN

Los virus del género *Begomovirus* (familia Geminiviridae) representan uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan la producción de chile (*Capsicum annuum* L.) en México y otras regiones tropicales y subtropicales del mundo. Estos virus son transmitidos de manera persistente por la mosquita blanca (*Bemisia tabaci* G.), un insecto polífago ampliamente distribuido que actúa como vector eficiente de múltiples virosis en cultivos hortícolas.

En México, los *Begomovirus* más relevantes asociados al chile son el *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y el *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), ambos responsables de severos daños fisiológicos, reducción en la fotosíntesis, pérdida de vigor y disminución del rendimiento y calidad del fruto (Rentería-Canett et al., 2011; Brown et al., 2015).

El control de estas enfermedades se ha basado principalmente en el manejo químico del vector, lo cual presenta una efectividad limitada y genera riesgos ambientales y de resistencia cruzada (Morales & Anderson, 2001). En este contexto, la identificación y evaluación de genotipos con resistencia natural o tolerancia a *Begomovirus* se ha convertido en una estrategia prioritaria para el manejo sostenible de la enfermedad (Hernández-Verdugo et al., 2001; Retes-Manjarrez et al., 2016).

Las pruebas de infección natural en campo son herramientas complementarias a los métodos de inoculación controlada, ya que permiten evaluar el comportamiento de diferentes genotipos bajo condiciones agroecológicas reales. No obstante, la variabilidad ambiental y las fluctuaciones en la población de *B. tabaci* pueden influir significativamente en la presión de infección y, por tanto, en la expresión de los síntomas virales (García-Neria & Rivera-Bustamante, 2011).

Con base en lo anterior, en este capítulo se planteó evaluar la respuesta de accesiones de *Capsicum annuum* con distintos grados de domesticación frente a la infección natural por *Begomovirus* en una localidad con antecedentes de alta incidencia viral. La zona experimental, ubicada en San Jacinto, municipio de Cosío, Aguascalientes fue seleccionada debido a los registros previos de alta presión de virosis y presencia de *B. tabaci* durante el ciclo agrícola anterior. Sin embargo, durante el desarrollo del experimento no se detectó presencia del vector, lo que impidió la infección natural esperada.

MATERIALES Y METODOS

Material vegetal y germinación de semillas. Se utilizaron 22 accesiones de *Capsicum annuum* L. con distinto grado de domesticación del BG-UAA (Tabla 5.1). Cada accesión se estableció con un número variable de semillas, dependiendo de su disponibilidad. Las semillas se sometieron a un tratamiento pregerminativo siguiendo el mismo protocolo descrito en el Capítulo III.

Posteriormente, las semillas se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades, utilizando como sustrato *Peat moss* estéril. Las charolas se mantuvieron en condiciones de invernadero, con temperatura promedio de 28 ± 2 °C, humedad relativa de 60–70 % y riego cada 48 h.

Tabla 5.1. Accesiones de chile (*Capsicum annuum*) seleccionadas para la evaluación de infección natural de Begomovirus en una localidad con alta presión de la enfermedad.

No.	Accesión	Tipo o raza	Grado de domesticación	Categoría de manejo
3	Acc-6	Pasilla	Domesticado	Criollo cultivado
2	Acc-5	Guajillo	Domesticado	Criollo cultivado
		Guajillo	Domesticado	Criollo cultivado
4	Acc-12	Puya	Domesticado	Criollo cultivado
5	Acc-18	Ancho	Domesticado	Criollo cultivado
6	Acc-21	Puya	Domesticado	Criollo cultivado
7	Acc-50	Ancho	Domesticado	Criollo cultivado
8	Acc-61	Huacle	Domesticado	Criollo cultivado
9	Acc-62	Huacle	Domesticado	Criollo cultivado
10	Acc-63	Serrano	Semidomesticado	Fuente de resistencia
11	Acc-65	Cascabel	Domesticado	Criollo cultivado
12	Acc-66	Cora	Domesticado	Criollo cultivado
13	Acc-67	Chile de agua	Domesticado	Criollo cultivado
14	Acc-70	Chiltepín	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
15	Acc-96	Chiltepín	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
16	Acc-100	Piquín	Semisilvestre	Traspatio
17	Acc-101	Chiltepín	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
18	Acc-104	Amashito	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
19	Acc-105	Amashito	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
20	Acc-106	Pico Paloma	Silvestre	Colecta <i>in situ</i>
21	Acc-108	Piquín	Semisilvestre	Traspatio
22	Acc-113	Bola	Domesticado	Variedad Mejorada

Trasplante y establecimiento del experimento en campo. Las accesiones se trasplantaron el 11 de abril de 2025 a los 50 días después de la siembra en un terreno agrícola ubicado en la localidad de San Jacinto, municipio de Cosío, Aguascalientes (22°22' N, 102°18' O, altitud 1,950 m s.n.m.). La selección del sitio se basó en muestreos realizados durante el ciclo agrícola previo (2024), en los cuales se había confirmado la presencia de *Bemisia tabaci* y síntomas de virosis en cultivos comerciales de chile y otras solanáceas de la zona, lo que indicaba una alta presión natural de *Begomovirus*.

Diseño experimental. El experimento se estableció en cuatro surcos principales, y en cada uno de ellos se procuró que estuvieran representadas las 22 accesiones, distribuidas al azar. Cuando una accesión contaba con ocho plantas, se colocaron dos en cada surco distribuidas de forma aleatoria; en los casos en que había cinco plantas, se ubicaron una accesión en cada surco y dos en otro y si solo se contaban con tres plantas el último surco se dejaba sin esa accesión. Esta disposición permitió maximizar la representación de cada genotipo dentro del área experimental, manteniendo un esquema de aleatorización parcial según la disponibilidad de material vegetal. El espaciamiento fue de 0.3 m entre plantas y 1.2 m entre surcos (Figura 5.1). El manejo agronómico incluyó riegos y labores culturales establecidos por el productor, sin uso de agroquímicos para no afectar la incidencia de mosquita blanca.



Figura 5.1. Localización geográfica y establecimiento del ensayo de campo para la evaluación de accesiones de *Capsicum annuum* bajo condiciones de infección natural por *Begomovirus*.

Monitoreo del vector y de síntomas virales. Desde el momento del trasplante y hasta la conclusión del ensayo, se implementó un programa de monitoreo sistemático del vector *Bemisia tabaci*. Se colocaron trampas pegajosas amarillas (15 × 20 cm) distribuidas

uniformemente en el campo, con una trampa cada 10 m lineales, a una altura de 40 cm sobre el dosel cultivo. Las trampas se revisaron semanalmente y se reemplazaron cada 14 días. Adicionalmente, se realizaron muestreos con red entomológica (“redazos”) para la detección del vector. Durante el ciclo experimental, se efectuaron revisiones visuales semanales para la detección de síntomas foliares compatibles con *Begomovirus*, tales como mosaico dorado, clorosis intervenal, deformación foliar o reducción del tamaño de hojas jóvenes.

El monitoreo se extendió hasta el 14 de agosto de 2025 (125 días postrasplante), fecha en la cual el productor decidió eliminar el cultivo debido a un brote severo de *Phytophthora capsici*, lo que imposibilitó la continuación de las evaluaciones.

Análisis. Aunque no se observó la infección viral esperada, se documentaron todas las observaciones de campo relativas a la emergencia, desarrollo fenológico, presencia o ausencia del vector, y condiciones sanitarias del cultivo. Los datos del monitoreo entomológico y fitosanitario se sistematizaron para su integración en el análisis general de la tesis, con el fin de discutir la variabilidad interanual en la incidencia de *Bemisia tabaci* y las limitaciones del establecimiento de ensayos de infección natural en campo.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Condiciones generales del ensayo. El experimento de campo se estableció el 11 de abril de 2025 en la localidad de San Jacinto, municipio de Cosío, Aguascalientes, considerada en años previos como una zona con alta incidencia de mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) y frecuente presencia de virosis en cultivos de chile y otras solanáceas. Las 22 accesiones de *Capsicum annuum* L. se desarrollaron satisfactoriamente durante las primeras etapas de crecimiento, mostrando emergencia uniforme y sin síntomas de estrés abiótico. Las condiciones ambientales registradas durante el ciclo experimental oscilaron entre 25 y 30 °C de temperatura promedio, con precipitaciones intermitentes entre junio y julio. No se presentaron eventos extremos que comprometieran el establecimiento de las plantas hasta la interrupción del ensayo por pudriciones de raíz.

A lo largo del ciclo de evaluación entre abril y agosto de 2025, no se detectó la presencia de adultos de *B. tabaci*, ni en las trampas ni en los muestreos con red entomológica. Este resultado fue consistente durante todo el periodo de monitoreo, incluso en las semanas de mayor temperatura y crecimiento vegetativo del cultivo, cuando usualmente se

incrementan las poblaciones del vector (Brown et al., 2015).

La ausencia de mosquita blanca contrasta con las observaciones realizadas en el ciclo agrícola 2024, donde se había documentado una elevada población del vector y la presencia de síntomas virales. Esta variación interanual puede atribuirse a factores climáticos, rotación de cultivos, o manejo agrícola local, los cuales pueden modificar drásticamente la dinámica poblacional de *B. tabaci* (Hilje et al., 2001; Morales & Anderson, 2001).

Evaluación de síntomas virales. Durante el periodo de observación no se registraron síntomas compatibles con infección por *Begomovirus* en ninguna de las accesiones evaluadas. Las plantas mantuvieron un desarrollo fenológico normal, sin manifestaciones de mosaico dorado, clorosis intervenal, deformación o reducción foliar. La ausencia del vector impidió la transmisión natural de los virus y, en consecuencia, no se generaron datos de incidencia o severidad que pudieran ser analizados estadísticamente.

Sin embargo, este resultado es relevante desde un punto de vista epidemiológico, ya que evidencia la marcada variabilidad espacio-temporal en la presión del vector y de la enfermedad, incluso en zonas con antecedentes de alta incidencia. Diversos autores han señalado que la presencia de *B. tabaci* y la transmisión efectiva de *Begomovirus* dependen estrechamente de factores como la temperatura, la humedad relativa, la disponibilidad de hospederos alternos y la presión de control químico en la zona (Morales & Anderson, 2001; Polston et al., 2014).

Análisis interpretativo. La ausencia del vector y, por tanto, de infección natural por *Begomovirus*, no invalida el ensayo, sino que proporciona información sobre la dinámica epidemiológica local. La falta de transmisión viral puede explicarse por:

1. Reducción poblacional del vector en el ciclo 2025, posiblemente asociada a factores climáticos adversos (temperaturas bajas al inicio de la primavera) o a la rotación de cultivos no hospederos.
2. Uso intensivo de insecticidas en las parcelas vecinas, lo que pudo haber reducido la población de *B. tabaci*.
3. La ausencia de plantas infectadas en cultivos vecinos lo cual es esencial para que ocurra la transmisión primaria del virus.

En relación con estudios previos, la fluctuación anual de las poblaciones de *B. tabaci* y la variabilidad ambiental son determinantes en la epidemiología de los *Begomovirus* (Hilje et al., 2001; Polston et al., 2014). Por lo cual, los resultados obtenidos en este estudio respaldan la importancia de complementar las evaluaciones de campo con métodos de inoculación controlada, como la biobalística, que permiten asegurar la exposición uniforme de las accesiones al patógeno bajo condiciones reproducibles (Rentería-Canett et al., 2011; Portillo et al., 2020).

CONCLUSIONES

El experimento de infección natural con 22 accesiones de *C. annuum* establecido en San Jacinto, Cosío, Aguascalientes, no presentó infección por *Begomovirus* debido a la ausencia del vector *B. tabaci* durante todo el ciclo experimental. A pesar de no observarse transmisión viral, los resultados permitieron identificar la variabilidad interanual de la presión del vector y del inóculo viral en campo, lo que resalta la necesidad de monitoreos previos antes de establecer ensayos bajo condiciones naturales.

Este capítulo demuestra la importancia de integrar evaluaciones de campo con métodos de inoculación controlada (como la biobalística) para garantizar la exposición uniforme de las accesiones a los *Begomovirus* y avanzar en la identificación de fuentes genéticas de resistencia en Chile.

CAPÍTULO VI. Identificación de accesiones de chile resistentes a PepGMV y PHYVV a partir de los resultados.

RESUMEN

En este capítulo se integraron los resultados obtenidos a partir del bioensayo de biobalística realizado para la identificación de resistencia a *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) en accesiones de *Capsicum annuum* con diferente grado de domesticación. Aunque los ensayos de Agroinoculación y la evaluación en condiciones de campo no generaron datos concluyentes debido a limitaciones metodológicas y factores externos, respectivamente, la inoculación mediante biobalística permitió una evaluación confiable, reproducible y controlada de la respuesta viral. Con base en la severidad de síntomas, la incidencia, el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y la confirmación molecular, las accesiones se clasificaron en cinco categorías: Resistente (R), Tolerante (T), Moderadamente Susceptible (MS), Susceptible (S) y Altamente Susceptible (AS). Para PepGMV se identificó una accesión en categoría R, 11 accesiones T y 3 accesiones MS. Para PHYVV se identificaron 7 accesiones en categoría T, 7 accesiones MS y 1 accesión S. En particular, la accesión silvestre Acc-106 destacó por su resistencia a PepGMV y tolerancia a PHYVV, posicionándose como una fuente potencial de resistencia genética a Begomovirus para programas de mejoramiento y de gran interés en estudios complementarios relacionados con el tema.

INTRODUCCIÓN

En el cultivo de chile (*Capsicum annuum* L.) los *Begomovirus Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) y *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) representan una de las principales limitantes fitosanitarias, debido a su amplia distribución, severidad de síntomas y alta capacidad de diseminación a través de *Bemisia tabaci*. La identificación de fuentes genéticas de resistencia a Begomovirus constituye una etapa fundamental para el manejo sostenible de enfermedades virales en el cultivo de chile.

La variabilidad genética presente en las poblaciones silvestres de *Capsicum* ofrece un reservorio de genes de defensa que puede aprovecharse en programas de mejoramiento (Pickersgill, 1991; Hernández-Verdugo et al., 2001; Retes-Manjarrez et al., 2016).

El proceso de domesticación, aunque dirigido a mejorar características agronómicas, ha

reducido la diversidad genética en los cultivares modernos, afectando indirectamente los mecanismos de defensa frente a patógenos (Meyer & Purugganan, 2013).

En consecuencia, es fundamental evaluar la respuesta de materiales con diferente grado de domesticación frente a virus como PepGMV y PHYVV, que representan los principales *Begomovirus* que afectan al cultivo del chile en México.

En los capítulos previos se evaluó la respuesta de accesiones de chile con diferente grado de domesticación mediante distintos bioensayos, incluyendo compatibilidad bacteriana, inoculación viral por *Agrobacterium* y biobalística y evaluación en condiciones de campo.

Dado que la inoculación por biobalística aseguró una exposición uniforme al inóculo viral y permitió una evaluación reproducible de la severidad, incidencia y dinámica del progreso de la enfermedad, este método constituyó la base principal para la clasificación de las accesiones por su respuesta a PepGMV y PHYVV. A partir del análisis de la severidad media, el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) y la confirmación molecular por PCR, se establecieron cinco categorías de respuesta que permitieron identificar accesiones resistentes, tolerantes o susceptibles a PepGMV y PHYVV.

En este contexto, el presente capítulo integra y sintetiza los resultados obtenidos, con el propósito de identificar accesiones de chile que representen potenciales fuentes de resistencia genética para su aprovechamiento en programas de mejoramiento y en estrategias de manejo fitosanitario sustentable.

MATERIALES Y MÉTODOS

Clasificación de la respuesta a PepGMV y PHYVV. La identificación de accesiones con resistencia a PepGMV y PHYVV se realizó mediante la integración de los resultados obtenidos en el ensayo de inoculación viral por biobalística descrito en el Capítulo IV. Se analizaron los valores de Severidad promedio de síntomas (escala 0–4), incidencia (% de plantas infectadas), Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) y la confirmación molecular mediante PCR. Con base en estos valores y siguiendo la clasificación propuesta por Reyes-Tena *et al.* (2021) con modificaciones, las accesiones se clasificaron en cinco categorías: Resistentes (R), Tolerantes (T), Moderadamente Susceptibles (MS), Susceptibles (S) y Altamente Susceptibles (AS) (Tabla 6.1). Esta clasificación también integró el progreso de los síntomas de la enfermedad (pendiente de la

curva) y la severidad media a los 35 dpi para cada accesión.

Tabla 6.1. Clasificación de la respuesta de accesiones de chile con base en la severidad media y el área bajo la curva del progreso de la enfermedad para los *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV) y *Virus huasteco vena amarilla del chile* (PHYVV) inoculados mediante Biobalística.

Nivel de Severidad	Comportamiento del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad	Clasificación
0	Sin pendiente, sin presencia de la enfermedad.	Resistente (R)
0.1-1.0	Con incremento ligero y alcanzando la asíntota en niveles bajo y después permaneciendo constante.	Tolerante (T)
1.1-2.0	La pendiente se incrementa con el tiempo.	Moderadamente Susceptible (MS)
2.1-3.0	Pendiente pronunciada con incrementos con el tiempo.	Susceptible (S)
>3.1	Pendiente pronunciada y abrupta desde el inicio de la enfermedad.	Altamente Susceptible (AS)

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Clasificación de las accesiones frente a PepGMV y PHYVV. Con base en la integración de la severidad promedio de síntomas (0-4), la incidencia de plantas infectadas (%), el comportamiento del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) y la confirmación molecular mediante PCR, se estableció la clasificación final de las 15 accesiones evaluadas contra PepGMV y PHYVV mediante inoculación por biobalística (Tabla 6.1).

Las accesiones mostraron una respuesta diferencial frente a ambos virus, evidenciando variabilidad en su respuesta. Para PepGMV, la mayoría (11 de 15 accesiones) se ubicó en las categorías Tolerante (T), mientras que para PHYVV 7 resultaron Tolerantes (T) y 7 Moderadamente Susceptible (MS).

En términos generales, PHYVV causó mayor severidad promedio y mayor porcentaje de incidencia en comparación con PepGMV, lo que confirma la mayor agresividad de PHYVV bajo condiciones de inoculación por biobalística. Esta diferencia entre PepGMV y PHYVV fue consistente en la mayoría de las accesiones evaluadas. La variabilidad fenotípica observada entre accesiones refleja la diversidad genética y los

distintos grados de domesticación. El uso conjunto de la escala pictórica de severidad (0–4) y el ABCPE permitió integrar cuantitativa y visualmente la progresión de los síntomas, constituyendo una herramienta robusta para la identificación de genotipos resistentes o tolerantes. Este enfoque de fenotipado cuantitativo, ampliamente validado en fitopatología (Shaner & Finney, 1977; Simko & Piepho, 2012), evidenció patrones claros de menor progreso de la enfermedad en accesiones silvestres, confirmando su potencial de resistencia en programas de mejoramiento genético.

Tabla 6.2. Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) estimada para la severidad media e incidencia y clasificación de las 15 accesiones de Chile.

Accesión	GD	PepGMV			PHYVV		
		ABCPE SP	ABCPE % Inci.	Clasificación	ABCPE SP	ABCPE % Inci.	Clasificación
Acc-06	D	5.83 b ^a	327	T	16.00 a	650	S
Acc-12	D	6.03 b	447	T	8.11 b	626	MS
Acc-21	D	3.29 c	329	T	7.00 c	556	T
Acc-50	D	5.83 b	350	T	7.32 c	636	T
Acc-60	D	1.17 e	117	T	8.87 b	607	MS
Acc-62	D	3.94 c	241	T	8.53 b	525	MS
Acc-63	SM	2.45 d	175	T	6.30 d	560	T
Acc-65	D	1.65 e	124	T	7.19 c	642	T
Acc-66	D	5.69 b	438	T	9.19 b	656	MS
Acc-67	D	4.81 c	263	T	6.13 d	350	T
Acc-70	S	2.33 d	175	T	8.08 b	485	MS
Acc-104	S	4.00 d	200	MS	5.50 e	200	MS
Acc-105	S	6.61 b	311	MS	2.33 f	156	T
Acc-106	S	0.00 f	0	R	0.93 g	93	T
Acc-113	D	7.00 a	467	MS	7.7 c	700	MS

^aValores con la misma letra en la misma columna no difieren significativamente según la prueba de Dunn ($P \leq 0,05$).

GD: Grado de domesticación; D = Domesticado, SD= Semidomesticado y S = Silvestre.

ABCPE SP: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad estimada a partir de la severidad promedio.
ABCPE % Inci.: Área bajo la curva del progreso de la enfermedad estimada a partir del porcentaje de incidencia.

Clasificación: categoría asignada con base en el valor de Severidad media y comportamiento del ABCPE: R = Resistente, T = Tolerante, MS = Moderadamente susceptible, S = Susceptible, AS = Altamente susceptible.

Identificación de fuentes de resistencia. Entre las accesiones evaluadas, destacó la Acc-106 (Pico Paloma, silvestre), la cual presentó severidad 0 e incidencia 0% frente a PepGMV, clasificándose como Resistente (R). Frente a PHYVV, está misma accesión mostró valores mínimos de severidad (0.1) y baja incidencia, ubicándose en la categoría

Tolerante (T).

Estos resultados posicionan a la Acc-106 como una fuente potencial de resistencia genética para programas de mejoramiento enfocados en resistencia o tolerancia a *Begomovirus* en Chile.

La accesión Acc-106, representa un material prioritario para estudios genómicos orientados a la caracterización de genes o regiones asociadas a la resistencia contra *Begomovirus* (como el gen *CchGLP* descrito en *C. chinense* por Barrera-Pacheco et al., 2008).

Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la existencia de variabilidad genética en la respuesta de accesiones de *C. annuum* frente a la infección por PepGMV y PHYVV, lo que coincide con reportes previos que documentan la presencia de resistencia o tolerancia en germoplasma silvestre y semisilvestre de Chile (Hernández-Verdugo et al., 2001b; Anaya-López et al., 2003; Retes-Manjarrez et al., 2016).

La tendencia observada en este trabajo indica que las accesiones silvestres presentaron menores valores de severidad y ABCPE en comparación con las accesiones domesticadas, lo cual respalda la hipótesis de que el proceso de domesticación ha reducido la variabilidad genética asociada a mecanismos de defensa frente a patógenos. Diversos autores han señalado que la selección artificial durante la domesticación puede generar cuellos de botella genéticos y pérdida de alelos relacionados con resistencia (Doebley et al., 2006; Meyer & Purugganan, 2013). En el caso específico de *Capsicum annuum*, se ha documentado que poblaciones silvestres conservan mayor diversidad genética que los cultivares comerciales (Hernández-Verdugo et al., 2001a).

El comportamiento de la Acc-106 es consistente con estudios donde han identificado fuentes de resistencia parcial o cuantitativa en germoplasma silvestre de Chile frente a *Begomovirus* (Anaya-López et al., 2003; Retes-Manjarrez et al., 2016). La resistencia observada podría estar asociada a mecanismos de restricción en la replicación viral, movimiento sistémico o activación más eficiente de respuestas de defensa basal.

Por otra parte, PHYVV indujo mayores valores de severidad promedio e incidencia en comparación con PepGMV, lo que sugiere diferencias en agresividad o en la interacción virus-hospedero. Esta variabilidad en patogenicidad ha sido previamente reportada para *Begomovirus* que infectan cultivos de Chile en México, donde se ha observado que diferentes aislados o variantes del patógeno pueden generar respuestas contrastantes, dependiendo del

genotipo del hospedero (Torres-Pacheco et al., 1996; Morales & Anderson, 2001).

La utilización de la Biobalística como método de inoculación permitió garantizar una exposición uniforme al ADN viral clonado, eliminando la variabilidad asociada a la transmisión por el vector *B. tabaci*. Este enfoque experimental ha sido empleado para evaluar resistencia bajo condiciones controladas y reproducibles (Rentería-Canett et al., 2011; Portillo et al., 2020), lo que fortalece la confiabilidad de la clasificación establecida en este estudio. La confirmación molecular mediante PCR respaldó los datos fenotípicos, permitiendo discriminar entre plantas verdaderamente resistentes (asintomáticas inoculadas) y aquellas asintomáticas, pero no inoculadas.

Los resultados demuestran que el germoplasma silvestre mexicano de *C. annuum* constituye un reservorio de resistencia genética contra *Begomovirus*. La identificación de accesiones como la Acc-106 representa una aportación valiosa para su incorporación en programas de mejoramiento genético, contribuyendo al desarrollo de cultivares con mayor resistencia y menor dependencia del control químico del vector, estrategia considerada la más sustentable para el manejo de *Begomovirus* (Morales & Anderson, 2001; Leke et al., 2015).

CONCLUSIONES

La inoculación mediante biobalística permitió identificar variabilidad significativa en la respuesta de las accesiones de *C. annuum* frente a PepGMV y PHYVV. El grado de domesticación influyó en el comportamiento frente a la infección viral, observándose mayor tolerancia en accesiones silvestres.

Destaca la accesión Acc-106 (Pico Paloma) como fuente potencial de resistencia genética a *Begomovirus*. Estos resultados confirman que el germoplasma silvestre representa un recurso valioso para el mejoramiento genético y el manejo sustentable de *Begomovirus* en Chile.

REFERENCIAS

- Aguilar-Meléndez, A., P. L. Morrell, M. L. Roose y S. C. Kim. (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chile (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany*, 96,1190-1202.
- Aguilar-Rincón, V., H., Corona, T. T., López, L. P., Latournerie, M., Ramírez M. M., Villalón, M. H. y Aguilar, C. J. (2010). Los Chiles de México y su distribución. SINAREFI, Colegio de Postgraduados, INIFAP, IT-Conkal, UANL, UAN. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 114 p.
- Aguirre-Mancilla, C. L., De La Fuente, G. I., Ramírez-Pimentel, J. G., Covarrubias-Prieto, J. G., Chablé-Moreno, F., & Raya-Pérez, J. C. (2017). El chile (*C. annuum* L.), cultivo y producción de semilla. *Cienc. Tecnol. Agropec. Méx*, 5, 19-27.
- Ala-Poikela, M., Svensson, E., Rojas, A., Horko, T., Paulin, L., Valkonen, J. P. T. and Kvarnheden, A. (2005). Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology*, 54, 448-459.
- Anaya-López, J. L., I. Torres-Pacheco, M. González-Chavira, J. A. Garzón-Tiznado, J. L. Pons-Hernández, R. G. Guevara-González, et al. (2003). Resistance to Geminivirus Mixed Infections in Mexican Wild Peppers. *HortScience*, 38(2), 251-255.
- Araiza-Lizarde, N., E. Araiza Lizarde y J. G. Martínez. (2011). Evaluación de la germinación y crecimiento de plántula de chilpetún (*Capsicum annum* L. variedad glabriusculum) en invernadero. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 286.
- Arcos-Ortega, G. F., Burciaga-Osorno, A., & Zúñiga-Aguilar, J. J. (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-transient genetic transformation of Habanero pepper (*Capsicum chinense*) leaf explants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13(4).
- Ayala-Villegas, M. J., Ayala-Garay, Ó. J., Aguilar-Rincón, V. H., & Corona-Torres, T. (2014). Evolución de la calidad de semilla de *Capsicum annuum* L. durante su desarrollo en el fruto. *Revista fitotecnica mexicana*, 37(1), 79-87.
- Barboza, G. E., García, C. C., de Bem Bianchetti, L., Romero, M. V., & Scaldaferrro, M. (2022). Monograph of wild and cultivated chili peppers (*Capsicum* L., Solanaceae). *PhytoKeys*, 200, 1.

- Barrera-Pacheco, A., Joaquín-Ramos, A. D. J., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Pérez-Pérez, M. C. I., Guevara-Olvera, L., & Guevara-González, R. G. (2008). Análisis de la expresión transcripcional inducida bajo condiciones de estrés biótico y abiótico en *Capsicum chinense* BG-3821. *Agrociencia*, 42(1), 95-106.
- Berker, T. G. 2000. Multiplying seed of pepper lines. International cooperators' guide. Asian vegetable research & development center. AVRDC. 40 p.
- Brown, J. K. (2003). Pepper Huasteco Yellow Vein Virus. Pp. 32. In: Compendium of pepper diseases. (Ed. by K. Pernezny, P. D. Roberts, J. F. Murphy, and N. P. Goldberg). The American Phytopathological Society Press. St Paul, MN, USA. 63 p.
- Brown, J. K., Zerbini, M. F., Navas, C. J., Moriones, E., Ramos, S. R., Silva, J. C. F., Fiallo, O. E., Briddon, R. W., Hernández, Z., Idris, A. M., Malathi, V. G., Martin, D. P., Rivera, B. R., Ueda, S. and Varsani, A. (2015). Revision of begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Archives of virology*, 160, 1593-1619.
- Campbell C. L., Madden L. V. (1990). Introduction to Plant Disease Epidemiology. John Wiley, Sons, New York, USA. 51p. ISBN: 978-0-471-81156-2.
- Cañizares, M. C., Lozano-Durán, R., & Bejarano, E. R. (2015). *Agroinoculation of geminiviruses: Methods and applications*. In W. O. Dawson & T. A. Beachy (Eds.), *Plant Virology Protocols* (3rd ed., pp. 111–124). Humana Press.
- Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E., and Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology*, 97, 51-59.
- Carrizo-García C, Barfuss, MHJ, Sehr EM, Barboza GE, Samuel R, Moscone EA, Ehrendorfer F. (2016). Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, Solanaceae). *Annals of Botany* 118(1): 35-51.
- Carrizo-García, C., Barboza, G. E., Palombo, N., & Weiss-Schneeweiss, H. (2022). Diversification of chiles (*Capsicum*, Solanaceae) through time and space: New insights from genome-wide RAD-seq data. *Frontiers in genetics*, 13, 1030536.
- Corzo-Martínez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in food science & technology*, 18(12), 609-625.
- Dabauza M, Peña L (2003) Response of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to *Agrobacterium tumefaciens* as a means of selecting proper vectors for genetic transformation. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(1), 39–

- 45.
- Delis, C., Krokida, A., Georgopoulou, U., & Kalantidis, K. (2005). Agroinfiltration as a transient gene expression system for *Capsicum annuum* fruits. *Plant Cell Reports*, 24(10), 655–661.
- Doebley JF, Gaut BS, Smith BD. (2006). The molecular genetics of crop domestication. *Cell*, 127(7), 1309–1321.
- Doyle, J. J., & Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12:31
- Du, J., Rietman, H. & Vleeshouwers, V. G. (2014). Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*. *J Vis Exp.*, e50971.
- Escobar MA, Dandekar AM. (2003) *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science*, 8(8), 380–386.
- FAOSTAT. (2023). Crops and livestock products: *Capsicum annuum*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faostat/> Fecha de consulta: 23 de septiembre de 2025
- García, F. A., Montes, H. S., Rangel, L. J. A., García M. E., y Mendoza Elos, M. (2010). Respuesta fisiológica de la semilla chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Dunal) al ácido giberélico e hidrotermia. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1(2), 203-216.
- García-Neria, M. A., & Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Characterization of Geminivirus resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(2), 172-182.
- Garzón-Tiznado, J. A. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new Geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology*. 83(5), 514–521.
- Garzón-Tiznado, J. A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Iba ez, J. T., & Herrera-Estrella, L. (1993). Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology-New York And Baltimore Then St Paul*, 83, 514-514.
- Gelvin S, B. (2017). Integration of *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA into the plant genome. *Annual Review of Genetics* 51: 195–217.
- Godínez-Hernández, Y., Anaya-López, J. L., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R. F., & Guevara-González, R. G. (2001). Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatan, Mexico. *HortScience*, 36(1), 139-142.

- Hanley-Bowdoin L, Bejarano ER, Robertson D, Mansoor S. (2013). Geminiviruses: masters at redirecting and reprogramming plant processes. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 777–788.
- Hernández-Espinal, L. A., Enríquez-Verdugo, I., Melgoza-Villagómez, C., Retes-Manjarrez, J. E., Velarde-Félix, S., Linares-Flores, P. J. y Garzón-Tiznado, J. A. (2018). Análisis filogenético y distribución de begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41, 149-57.
- Hernández-Verdugo, S., Dávila, A. P., & Oyama, K. (1999). *Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género Capsicum*. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 64, 65–84.
- Hernández-Verdugo, S., Guevara-González, R. G., Rivera-Bustamante, R. F., & Oyama, K. (2001b). 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.
- Hernández-Verdugo, S., Luna-Reyes, R., & Oyama, K. (2001a). Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* from Mexico. *Plant Systematics and Evolution*, 226, 129–142.
- Hernández-Verdugo, S., Oyama, K. and Vázquez-Yanes, C. (2001a). Differentiation in seed germination among populations of *Capsicum annuum* along a latitudinal gradient in Mexico. *Plant Ecol.*, 155, 245-257.
- Hilje, L., Costa, H. S., & Stansly, P. A. (2001). Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. *Crop Protection*, 20(9), 801–812. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(01\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00112-0)
- Holsters M, Silva B, Van Vliet F, Genetello C, De Block M, Dhaese P, Depicker A, Inzé D, Engler G, Villarroel R, Van Montagu M, Schell J. (1980). The functional organization of the nopaline *A. tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plásmido*, 3(2): 212-230. http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do
- Hull, R. (1991). The movement of viruses in plants. *Annual Review of Phytopathology*, 29, 447–467.
- Jiménez, R. C. (2019). Utilizing wild *Capsicum* spp. germplasm for breeding resistance to Beet curly top virus (genus *Curtvirus*, family: Geminiviridae) in cultivated pepper

- (*Capsicum annuum* L.). PhD Thesis dissertation. Davis, University of California.
- Koncz C, Schell J. (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular and General Genetics*, 204, 383–396.
- Kraft, K. H., Brown, C. H., Nabhan, G. P., Luedeling, E., Luna-Ruiz, J. J, Coppens d'Eeckenbrugge, G., Hijmans, R. J. & Gepts, P. (2014). Múltiple lines of evidence for the origin of domesticated chili pepper, *Capsicum annuum*, in México. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 6165-6170.
- Kumar, R. V., Sharma, V. K., Chattopadhyay, B., & Chakraborty, S. (2012). An improved plant regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of red pepper (*Capsicum annuum* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 18(4), 357-364.
- Lee Y. H., M. Jung, S. H. Shin, J. H. Lee, S. H. Choi, N. H. Her, J. H. Lee, K. H. Ryu, K. Y. Paek and C. H. Harn (2009) Transgenic peppers that are highly tolerant to a new CMV pathotype. *Plant Cell Reports* 28, 223-232.
- Leke, W. N., Mignouna, D. B., Brown, J. K., and Kvarnheden, A. (2015). Begomovirus disease complex: emerging threat to vegetable production systems of West and Central Africa. *Agriculture & Food Security*, 4(1), 1.
- Leubner-Metzger, G. 2003. Functions and regulations of β -1,3-glucanases during seed germination, dormancy and after-ripening. *Seed Sci. Res.*, 13, 17-34.
- Liu F, Zhao J, Sun H, Xiong C, Sun X, Wang X, Wang Z, Jarret R, Wang J, Tang B, Xu H, Hu B, Suo H, Yang B, Ou L, Li X, Zhou S, Yang S, Lui Z, Yuan F, Pei Z, Ma Y, Dai X, Wu S, Fwi Z, Zou X. (2023). Genomes of cultivated and wild *Capsicum* species provide insights into pepper domestication and population differentiation. *Nature Communications*, 14(1), 5487.
- López-Arroyo, J. I., Castañeda, S. C., & Rodríguez-Maciel, J. C. (2015). Manejo de *Bemisia tabaci* (Gennadius) en México: avances y perspectivas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 601-613.
- López-López P, Rodríguez-Hernández R, Bravo-Mosqueda E. (2016). Impacto económico del chile huacle (*Capsicum annuum*) en el Estado de Oaxaca. *Revista Mexicana de Agronegocios*, 38, 317-328.
- Luna-Ruíz, J. (2010). Producción, conservación y evaluación de semilla de chile: Manual

- para productores. Universidad Autónoma de Aguascalientes, 95 p.
- Luo, X. J., Peng, J., Li, Y. J. (2011). Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European journal of pharmacology*, 650, 1-7.
- Mahto BK, Sharma P, Rajam MV, Reddy PM, Dhar-Ray S. (2018). An efficient method for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Indian Journal of Plant Physiology*, 23, 573–581.
- 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.
- Meyer R. S., Purugganan M. D. (2013). Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification. *Nature Reviews Genetics*, 14(12), 840–852.
- Morales, F. J., & Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, 146(3), 415–441. <https://doi.org/10.1007/s007050170153>
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 219-248.
- Ochoa-Alejo N, Ramírez-Malagón R. (2001). *In vitro* chili pepper biotechnology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37(6), 701–729.
- Park, S. I., Kim, H. B., Jeon, H. J., & Kim, H. (2021). *Agrobacterium*-mediated *Capsicum annum* gene editing in two cultivars, hot pepper CM334 and bell pepper dempsey. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3921.
- Pedroza, S. A. (1999). Análisis del área bajo la curva del progreso de la enfermedad. Minicurso Fitopatología cuantitativa: un enfoque estadístico en el análisis epidémico. In *X Congreso de la Asociación Latinoamericana de Fitopatología y XXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*. Septiembre.
- Perry, F. y K. Flannery. (2007). Precolumbian use of chili peppers in the Valley of Oaxaca, México. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 104, 11905-11909
- Pickersgill B. (2007). Domestication of plants in the Americas: insights from Mendelian and molecular genetics. *Annals of Botany*, 100(5), 925–940.
- Pickersgill, B. (1991). Cytogenetics and evolution of *Capsicum L.*. In T. Tsuchiya & P. K. Gupta (Eds.), *Chromosome engineering in plants: Genetics, breeding, evolution, Part*

- B (pp. 139–160).
- Polston, J. E., De Barro, P., & Boykin, L. M. (2014). Transmission specificities of *Bemisia tabaci* and implications for the global movement of begomoviruses. *Virus Research*, 186, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.009>
- Portillo, L., García-Nerúa, M. A., Rivera-Bustamante, R. F., & Ochoa-Alejo, N. (2020). Recalcitrance of *Capsicum annuum* to *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: Biological and technical limitations. *Plants*, 9(9), 1141. <https://doi.org/10.3390/plants9091141>
- Qin, C., Yu, C., Shen, Y., Fang, X., Chen, L., Min, J., ... & Zhang, Z. (2014). Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization. *Proceedings of the National Academy of Science*, 111(14), 5135–5140.
- Rajam MV, Nandy S, Pandey R. (2021) Biotechnology of Red Pepper. In: Kavi Kishor PB, Rajam MV, Pullaiah T (eds) Genetically Modified Crops. Springer, Singapore
- Ramírez-Meraz, M., Pozo-Campodonico, O., & Rodríguez del Bosque, L. A. (2003). Technology to induce germination of chili piquín. Paper presented at the First Regional Symposium on Chile Piquín: Advances in Research on Production Technology and Sustainable Use of the Wild Resource, Campo Experimental Río Bravo, Tamaulipas, Mexico.
- 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. y Garzón-Tiznado, J. A. (2016). Detección de resistencia al virus huasteco vena amarilla del chile y su heredabilidad en genotipos silvestres de *Capsicum annuum* L. *Interciencia*, 41, 541-47.
- Reyes-Tena, A., Rodríguez-Alvarado, G., de Jesús Luna-Ruíz, J., Arreola-Romero, V., Arriaga-Solorio, K. L., Gómez-Dorantes, N., & Fernández-Pavía, S. P. (2021). Tolerance to virulence phenotypes of *Phytophthora capsici* in pasilla pepper cultivars. *HortScience*, 56(10), 1239-1243.
- Rodelo-Urrego, M., Garcia-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 Evol.*, 1(1), vev004.
- Rodríguez-Gandarilla, M. G., Rodríguez-Negrete, E. A. & Rivera-Bustamante, R. F. (2020). Superinfection by PHYVV alters the recovery process in PepGMV-infected pepper plants. *Viruses*, 12(3), 286.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., and Gilbertson, R. L. 2005. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 361-394.
- Rose, P., Whiteman, M., Moore, P. K., Zhu, Y. Z. (2005). Bioactive S-alk(en)yl cysteine sulfoxide metabolites in the genus *Allium*: the chemistry of potential therapeutic agents. *Natural product reports*, 22, 351-368
- Shams, S., et al. (2024). Developing an optimized protocol for regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation in chili pepper. *Genes*, 15(8), 1018.
- Shaner, G., & Finney, R. E. (1977). The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*, 67(8), 1051–1056.
- Sharma M, Kothari-Chajer A, Jagga-Chugh S, Kothari SL. (2011). Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of Eleusine coracana (L.) Gaertn. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(1), 93-104.
- SIAP, Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera. (2023). Avances de siembras y cosechas. Resumen por estado. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México.
- Simko, I., & Piepho, H. P. (2012). The area under the disease progress stairs: Calculation, advantage, and application. *Phytopathology*, 102(4), 381–389.
- Torres-Pacheco, I. (1997). Geminivirus involucrados en el rizado amarillo del chile: Interacciones entre PHV y TPV. Tesis doctoral; Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N, Unidad Irapuato. Irapuato, Guanajuato. México.
- Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J. A., Herrera-Estrella, L., Rivera-Bustamante, R. F. (1993). Complete nucleotide sequence of Pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *J Gen Virol*, 74(10), 2225–2231.
- Velásquez-Valle, R., Mena-Covarrubias, J., Reveles-Torres, L. R., Argüello-Astorga, G. R., Salas-Luévano, M. A., and Mauricio-Castillo, J. A. (2012). First report of Beet mild curly top virus in dry bean in Zacatecas, Mexico. *Plant Disease*, 96, 771.



Article

Resistance Assessment to PHYVV and PepGMV in Wild and Domesticated Accessions of *Capsicum annuum* L. by Bioballistic Inoculation

Karla Vanessa De Lira-Ramos ¹, Ernesto González-Gaona ², José Francisco Morales-Domínguez ³, Diana Lilia Trejo-Saavedra ⁴, Joaquín Sosa-Ramírez ⁵, Rafael F. Rivera-Bustamante ⁴ and José de Jesús Luna-Ruiz ^{5,*}

- ¹ Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20100, Aguascalientes, Mexico; kvlr1820@gmail.com
- ² Campo Experimental Pabellón, Centro de Investigación Regional Norte Centro del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Kilómetro 32.5 Carretera Aguascalientes-Zacatecas, Pabellón de Arteaga 20660, Aguascalientes, Mexico; gonzalez.ernesto@inifap.gob.mx
- ³ Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20100, Aguascalientes, Mexico; francisco.morales@edu.uaa.mx
- ⁴ Departamento de Ingeniería Genética, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), Unidad Irapuato, km. 9.6 Libramiento Norte, Irapuato 36500, Guanajuato, Mexico; dtrejo@ira.cinvestav.mx (D.L.T.-S.); rrivera@ira.cinvestav.mx (R.F.R.-B.)
- ⁵ Departamento de Ciencias Agronómicas, Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Av. Universidad 940, Aguascalientes 20100, Aguascalientes, Mexico; joaquin.sosa@edu.uaa.mx
- * Correspondence: joselunaruiz11@yahoo.com.mx

Abstract

Chili pepper (*Capsicum annuum* L.) is an economically important crop in Mexico, with a production that is limited by viral diseases caused by Begomovirus infections such as PHYVV and PepGMV, both transmitted by *Bemisia tabaci*. These viruses affect both domesticated cultivars and wild populations. The use of resistant genotypes is the most effective strategy to reduce Begomovirus incidence. Since no commercial cultivars with resistance are currently available, in this study, 15 *Capsicum annuum* accessions with different levels of domestication were inoculated separately with infectious PepGMV and PHYVV dimers by bioballistics, in order to identify sources of genetic resistance or tolerance to these viruses. Symptom progression (severity), incidence, the area under the disease progress curve (AUDPC), and molecular detection of viral DNA by PCR were recorded in asymptomatic plants. PCR results with oligonucleotides targeting PepGMV and PHYVV showed that 96% of asymptomatic plants were positive, confirming that viral replication occurred without the development of visible symptoms. Significant differences were observed among accessions, with wild and semidomesticated accessions showing very low values of severity, incidence, and AUDPC. Notably, the wild accession Acc-106 exhibited resistance to PepGMV and tolerance to PHYVV, with minimum values of severity (0 and 0.13) and incidence (0% and 13%) at 35 days postinoculation.

Keywords: geminivirus; begomovirus; bioballistics; viral resistance; symptoms; PCR



Academic Editor: Prabhu Ganasekaran

Received: 26 July 2025

Revised: 14 August 2025

Accepted: 19 August 2025

Published: 31 August 2025

Citation: De Lira-Ramos, K.V.; González-Gaona, E.; Morales-Domínguez, J.F.; Trejo-Saavedra, D.L.; Sosa-Ramírez, J.; Rivera-Bustamante, R.F.; Luna-Ruiz, J.J. Resistance Assessment to PHYVV and PepGMV in Wild and Domesticated Accessions of *Capsicum annuum* L. by Bioballistic Inoculation. *Plants* **2025**, *14*, 2708. <https://doi.org/10.3390/plants14172708>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The cultivation of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) is fundamental to both the economy and food systems in Mexico. However, its production is constrained by viral

infections such as the *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) and the *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), both belonging to the genus *Begomovirus* of the family *Geminiviridae* [1]. Plants infected with PHYVV typically exhibit symptoms including vein yellowing, yellow mosaic, leaf distortion, leaf curling, stunted growth, and yield reduction [2]. In the case of PepGMV, the symptoms include golden mosaic, leaf deformation, and reduction in plant size [3]. Its primary vector for both viruses is the whitefly (*Bemisia tabaci* Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae), which has a high transmission capacity and has developed resistance to insecticides, complicating efficient control [4,5].

In Mexico, PHYVV and PepGMV are widely distributed across *C. annuum* production areas. Both viruses have been detected in domesticated cultivars and wild populations. Their presence has been reported in northern states such as Tamaulipas and Sinaloa, as well as in central and southern regions, including Puebla and the State of Mexico [6–9]. Specifically, PepGMV has been identified in regions like Baja California, Sonora, the Comarca Lagunera, San Luis Potosí, Michoacán, Campeche, Yucatán, Puebla, and the State of Mexico [7–12].

The use of resistant genotypes is the most effective strategy to reduce *Begomovirus* incidence and minimize agrochemical use [13]. Wild relatives of cultivated species are recognized as valuable sources of resistance genes for pests and diseases [14]. Regarding wild plants, Hernández-Verdugo et al. [15] and Godínez-Hernández et al. [16] identified wild accessions of *C. annuum* and *C. chinense* with resistance to PHYVV. These species are important because they represent the genetic basis from which current commercial cultivars have been derived. For instance, transcriptomic analysis under biotic and abiotic stress in *C. chinense* led to the identification of the *CchGLP* gene in the BG-3821 accession, which encodes a germin-like protein associated with PHYVV resistance [17,18]. Furthermore, García-Neria and Rivera-Bustamante [19] demonstrated that BG-3821 displays natural resistance to both PepGMV and PHYVV, involving defense mechanisms such as systemic acquired resistance (SAR) and restricted viral replication.

Additionally, a phenomenon of symptom remission or recovery has been reported in pepper plants experimentally infected with PepGMV dimers. This recovery is associated with a specific resistance mechanism involving the accumulation of small interfering RNAs (siRNAs), suggesting the participation of post-transcriptional gene silencing (PTGS) as an antiviral defense pathway. Unlike general resistance, this response was specific to PepGMV and not observed with PHYVV, supporting the hypothesis of highly selective defense mechanisms in certain pepper accessions [20]. Despite these advances, no commercial pepper cultivars in Mexico have been confirmed to possess resistance to both PHYVV and PepGMV.

Mechanical inoculation of begomoviruses is generally inefficient or not feasible, as their transmission requires vector-mediated introduction into the phloem, and sap inoculation rarely produces consistent infections in host plants [21–23]. Traditionally, resistance screening has been performed through inoculation with *B. tabaci* which delivers viral particles directly into the plant's vascular system. While effective, this method requires high technical expertise, specialized infrastructure, and extended evaluation periods [24,25]. As an alternative, bioballistic (gene gun) inoculation has proven effective for introducing viral DNA directly into plant tissues, particularly in *Capsicum* species [20,24]. This approach circumvents the limitations associated with vector- or *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transmission, making it particularly useful for recalcitrant species [25,26].

In this study, it was proposed that pepper accessions with varying degrees of domestication would display differential resistance to PepGMV and PHYVV infection. Therefore, 15 *Capsicum annuum* accessions with different levels of domestication were inoculated separately with infectious PepGMV and PHYVV dimers by bioballistics, in order to identify

sources of genetic resistance or tolerance to these viruses. The results revealed significant differences in symptom severity and disease progression among accessions and domestication levels, with wild and semidomesticated accessions generally exhibiting lower severity and Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC), particularly in response to PHYVV. Additionally, viral DNA was detected in asymptomatic plants by PCR, indicating that some plants were able to restrict the replication or expression of these viruses. For instance, the wild accession Acc-106 showed resistance to PepGMV and tolerance to PHYVV. These findings contribute to the understanding of genetic resistance to *Begomovirus* in *C. annuum*.

2. Results

2.1. Evolution of the Symptoms of PepGMV and PHYVV

The control plants from the 15 accessions that were inoculated with tungsten particles lacking viral DNA did not exhibit any symptoms of viral infection. In contrast, plants inoculated with PepGMV and PHYVV developed characteristic symptoms, the progression of which was monitored at 7, 14, 21, 28, and 35 days postinoculation (dpi) to establish a specific severity scale for each virus. Symptom evolution was documented photographically in representative plants that displayed typical symptoms at varying degrees of severity for PepGMV (Figure 1) and PHYVV (Figure 2), and classified according to the severity scale shown described in the Section 4 Tables 4–6. Although both viruses generally induce similar symptoms in pepper plants, the descriptions accounted for the phenotypic particularities associated with each infection. The first symptoms induced by both viruses were observed starting at 7 dpi.

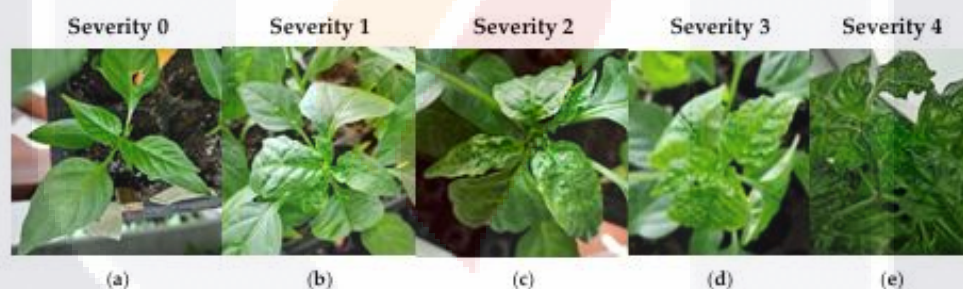


Figure 1. Pictorial scale of symptom severity in pepper plants inoculated with PepGMV. (a) Severity 0: asymptomatic plants; (b) Severity 1: initial symptoms; (c) Severity 2: moderate symptoms; (d) Severity 3: severe symptoms; (e) Severity 4: very severe symptoms. Photo credit: own elaboration.



Figure 2. Pictorial scale of symptom severity in pepper plants infected with PHYVV: (a) Severity 0: asymptomatic plants; (b) Severity 1: initial symptoms; (c) Severity 2: moderate symptoms; (d) Severity 3: severe symptoms; (e) Severity 4: very severe symptoms. Photo credit: own elaboration.

2.1.1. Development of PepGMV Symptoms

PepGMV-resistant plants remained asymptomatic (severity = 0) throughout the 35 dpi duration of the experiment (Figure 1a). Plants that developed initial symptoms of PepGMV exhibited small bumps or yellow spots at the base of the inoculated leaves (Figure 1b). These bumps and spots expanded and became more pronounced, forming yellow mosaics on the leaf surface. The symptoms intensified and spread across the leaf, covering a larger area (Figure 1c). Subsequently, infected leaves displayed deformations and chlorosis, with yellow mosaics distributed over the entire leaf surface. The leaves became curled and showed an irregular texture (Figure 1d). In severe cases, the leaves were completely deformed, becoming elongated and wavy, with prominent yellow blotches (Figure 1e).

2.1.2. Development of PHYVV Symptoms

As with PepGMV, PHYVV-resistant plants remained asymptomatic throughout the 35 dpi evaluation period (Figure 2a). Initial symptoms appeared as slight yellowing of the veins at the base of the leaves (Figure 2b). In more advanced stages, the yellowed veins formed a reticulated pattern extending from the base to the middle of the leaf. These symptoms intensified and spread across the leaf, covering a larger area (Figure 2c). In the most advanced stages, infected leaves exhibited severe deformation and chlorosis, with an intense yellow hue and a prominent network of veins affecting approximately 90% of the surface. The leaves showed a downward bend at the midsection and developed an irregular texture (Figure 2d). In extreme cases, the leaves adopted a spoon-like shape, with yellow venation distributed across the entire surface. These symptoms represented the most severe expression of PHYVV infection (Figure 2e).

2.2. Response of Pepper Accessions to PepGMV and PHYVV Inoculation

The results of the analysis of variance (ANOVA) for each virus allowed us to evaluate the effect of accession, evaluation time (dpi), and their interaction on the severity of symptoms induced by PepGMV and PHYVV. For both viruses, highly significant differences were observed among accessions and across evaluation times ($p < 0.001$), indicating that both factors had a substantial influence on symptom expression. The lack of significant interaction between accession and time indicates that, although accessions differed in their overall symptom severity, the temporal pattern of symptom development was consistent across all accessions. This suggests that the biological processes underlying symptom progression over time are conserved among the diverse genetic backgrounds studied. Furthermore, no accession exhibited atypical or delayed symptom development, supporting the reliability of the inoculation and scoring methods used.

Notably, the effect of accession was more pronounced in response to PHYVV ($f = 22.495$) than to PepGMV ($f = 9.493$), indicating greater differentiation in accession response to PHYVV. Likewise, the progressive increase in symptom severity over time was more marked in PHYVV-infected plants ($f = 40.16$), suggesting a more aggressive or persistent infection compared to PepGMV ($f = 13.553$).

2.3. Incidence and Severity of PepGMV and PHYVV Infection

Symptom assessment at 35 dpi revealed substantial variability in both incidence and severity among the 15 *Capsicum annuum* accessions inoculated with PepGMV and PHYVV (Table 1). Overall, higher incidence and severity were observed in response to PHYVV compared to PepGMV.

For PepGMV, incidence ranged from 0% (Acc-106) to 67% (Acc-12 and Acc-113), with an overall average of 40% (Table 2). The mean severity across all accessions was 0.65. The accession with the lowest severity was Acc-106 (0.0, Pico Paloma), while the highest was

Acc-113 (1.33, Bola). Although the mean severity recorded for all 15 accessions in response to PepGMV did not exceed 1.4 on the 0–4 scale, the differences among some accessions were statistically significant.

Table 1. Influence of the level of domestication on the response to PepGMV and PHYVV in pepper accessions at 35 days postinoculation.

Level of Domestication.	n	PepGMV			PHYVV		
		MS ⁱ	Min–Max ⁱⁱⁱ	% Inci.	MS	Min–Max	% Inci.
Domesticated	10	0.66 ± 0.07 a ⁱⁱ	0.20–1.33	45	1.30 ± 0.07 b	0.88–2.30	86
Semi-domesticated	1	0.50 ± 0.27 a	0.50	30	0.90 ± 0.26 ab	0.90	80
Wild	4	0.44 ± 0.13 a	0–1.11	21	0.61 ± 0.12 a	1.15–0.13	34

n = total accessions that make up the domestication group. ⁱ Mean severity ± standard error. ⁱⁱ Means with the same letter within the same column are not significantly different according to Tukey's test ($p \leq 0.05$). ⁱⁱⁱ Minimum and maximum value of mean severity between accessions that make up each domestication group.

Table 2. Mean severity and incidence (%) of symptoms at 35 days postinoculation in 15 accessions of *Capsicum annuum* inoculated with Pepper golden mosaic virus (PepGMV) and Pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV).

Accession	Type or Breed	DD	PepGMV				PHYVV			
			TSP/TPI	Rank Min–Max	MS ⁱ (0–4)	% Inci.	TSP/TPI	Rank Min–Max	MS (0–4)	% Inci.
Acc-06	Guajillo	D	7/15	0–2.0	0.87 ± 0.19 ab ⁱⁱ	47	13/14	0–3.0	2.30 ± 0.20 a	93
Acc-12	Puya	D	12/18	0–2.0	0.89 ± 0.18 ab	67	17/19	0–2.0	1.16 ± 0.17 b	89
Acc-21	Puya	D	9/17	0–1.0	0.52 ± 0.18 ab	53	14/17	0–2.0	1.06 ± 0.18 bc	82
Acc-50	Ancho	D	6/12	0–2.0	0.92 ± 0.22 ab	50	10/11	0–2.0	1.09 ± 0.23 bc	91
Acc-60	Huacle	D	3/15	0–1.0	0.20 ± 0.20 ab	20	13/15	0–3.0	1.33 ± 0.20 ab	87
Acc-62	Huacle	D	6/16	0–2.0	0.62 ± 0.19 ab	38	12/16	0–4.0	1.31 ± 0.19 b	75
Acc-63	Serrano CM334	SD	3/10	0–2.0	0.50 ± 0.24 ab	30	8/10	0–2.0	0.90 ± 0.24 bc	80
Acc-65	Cascabel	D	3/17	0–2.0	0.24 ± 0.19 ab	18	17/18	0–2.0	1.06 ± 0.18 bc	94
Acc-66	Cora	D	10/16	0–2.0	0.81 ± 0.20 ab	63	15/16	0–2.0	1.38 ± 0.19 ab	94
Acc-67	Chile de agua	D	3/8	0–2.0	0.75 ± 0.27 ab	38	4/8	0–2.0	0.88 ± 0.27 bc	50
Acc-70	Chiltepín	W	3/12	0–2.0	0.33 ± 0.22 ab	25	9/13	0–2.0	1.15 ± 0.21 b	69
Acc-104	Amashito	W	2/7	0–4.0	0.71 ± 0.30 ab	29	2/7	0–3.0	0.85 ± 0.29 bc	29
Acc-105	Amashito	W	4/9	0–3.0	1.11 ± 1.26 a	44	2/9	0–2.0	0.44 ± 0.25 bc	22
Acc-106	Pico Paloma	W	0/15	0	0 b ± 0.20 b	0	2/15	0–1.0	0.13 ± 0.20 c	13
Acc-113	Bola	D	4/6	0–2.0	1.33 ± 0.31 a	67	5/5	0–2.0	1.60 ± 0.34 ab	100
Overall average			75/193	0–4.0	0.65 ± 0.10	40	143/193	0–4.0	1.10 ± 0.13	77

DD = Degree of domestication. D = Domesticated, SD = Semidomesticated, and W = Wild. TSP = Total symptomatic plants. TPI = Total of plants inoculated. MS = Mean of the severity calculated with a Tukey test ($p \leq 0.05$). Inci. = Incidence. ⁱ Mean severity ± standard error. ⁱⁱ Means with the same letter within the same column are not significantly different according to Tukey's test ($p \leq 0.05$).

In the case of PHYVV, incidence was generally higher, with a mean of 77%, ranging from 13% (Acc-106) to 100% (Acc-113). The overall mean severity was 1.10, with the lowest value again in Acc-106 (0.13, Pico Paloma), while the highest severity was observed in Acc-06 (2.30, Guajillo).

2.4. Influence of the Level of Domestication of Accessions on the Response to Viral Inoculation

The results of the factorial ANOVA by domestication group revealed a significant effect on symptom severity (PepGMV: $f = 13.055$, $p < 0.001$; PHYVV: $f = 63.663$, $p < 0.001$), indicating that the degree of domestication had a considerable influence on symptom expression. Specifically, wild and semidomesticated accessions exhibited lower severity levels compared to domesticated ones, suggesting greater tolerance or natural resistance in less domesticated groups. Time also had a significant effect on both virus treatments

(PepGMV: $f = 12.535$, $p < 0.001$; PHYVV: $f = 34.779$, $p < 0.001$), confirming that symptom severity increased over time (dpi). In contrast, the interaction between domestication level and time was not significant (PepGMV: $f = 0.226$, $p = 0.986$; PHYVV: $f = 1.051$, $p = 0.396$), indicating that the temporal progression of symptoms was consistent within each domestication group. In other words, although symptom severity differed by domestication level, the pattern of increase or stability over time remained similar across groups.

Table 1 shows the mean severity, severity range (minimum and maximum values among accessions within each group), and percentage of incidence for domestication groups (wild, semidomesticated, and domesticated) of *C. annuum* accessions. Mean values suggested that domesticated accessions tended to exhibit higher severity and incidence against both viruses, particularly PHYVV. However, according to Tukey's test ($p \leq 0.05$), these differences were not statistically significant for PepGMV, and only domesticated vs. wild groups differed significantly for PHYVV. The lack of statistical separation in some cases may be due to the high variability among accessions within groups and the unequal sample sizes, which could mask differences in central tendency.

These results suggest that domestication may be associated with increased susceptibility to both viruses, with a more pronounced effect observed in the case of PHYVV. Nonetheless, the observed pattern was not uniformly supported by statistical significance, highlighting the influence of within-group variability and sample size. The difference in symptom severity between domesticated and wild accessions may be attributed to the domestication syndrome, which encompasses drastic or gradual changes in plant physiology, anatomy, and defense-related traits. Additionally, resistance or susceptibility mechanisms may vary depending on the virus species and environmental conditions.

2.5. Area Under the Disease Progression Curve (AUDPC)

The results of the AUDPC, calculated from the mean severity and incidence for each of the 15 accessions inoculated with PepGMV and PHYVV during the 35 dpi period, as well as the classification of the accessions, are presented in Table 3. Based on these AUDPC values, the accessions were classified according into categories of resistant (R), tolerant (T), moderately susceptible (MS), susceptible (S), and highly susceptible (HS), as described in the Section 4.

Table 3. Area under the disease progression curve estimated for mean severity and incidence, and classification of 15 *Capsicum annuum* accessions.

Accession	DD	PepGMV			PHYVV		
		AUDPC MS	AUDPC % Inci.	Classification	AUDPC MS	AUDPC % Inci.	Classification
Acc-06	D	5.83 b ^a	327	T	16.00 a	650	S
Acc-12	D	6.03 b	447	T	8.11 b	626	MS
Acc-21	D	3.29 c	329	T	7.00 c	556	T
Acc-50	D	5.83 b	350	T	7.32 c	636	T
Acc-60	D	1.17 e	117	T	8.87 b	607	MS
Acc-62	D	3.94 c	241	T	8.53 b	525	MS
Acc-63	SM	2.45 d	175	T	6.30 d	560	T
Acc-65	D	1.65 e	124	T	7.19 c	642	T
Acc-66	D	5.69 b	438	T	9.19 b	656	MS
Acc-67	D	4.81 c	263	T	6.13 d	350	T
Acc-70	W	2.33 d	175	T	8.08 b	485	MS
Acc-104	W	4.00 d	200	MS	5.50 e	200	MS
Acc-105	W	6.61 b	311	MS	2.33 f	156	T
Acc-106	W	0.00 f	0	R	0.93 g	93	T
Acc-113	D	7.00 a	467	MS	7.7 c	700	MS

^a Values with the same letter in the same column do not differ significantly according to Dunn's test ($p \leq 0.05$). DD: Degree of domestication; D = Domesticated, SD = Semidomesticated, and W = Wild. AUDPC MS: Area under the disease progression curve estimated from mean severity values. AUDPC % Inci.: area under the disease progression curve estimated from the percentage of incidence. Classification: category assigned based on the value of mean severity and behavior of the AUDPC: R = Resistant, T = Tolerant, MS = Moderately susceptible, S = Susceptible, HS = Highly susceptible.

The nonparametric Kruskal–Wallis analysis for AUDPC revealed significant differences among accessions for both viruses: PepGMV ($\chi^2 = 54.12$, $df = 14$, $p < 0.001$) and PHYVV ($\chi^2 = 43.17$, $df = 14$, $p < 0.001$).

Using these categories, phenotyping enabled the establishment of specific symptom progression profiles for each accession, facilitating their classification.

For PepGMV, most accessions were classified as tolerant, three as moderately susceptible (Acc-104, Acc-105, Acc-113), and one as resistant (Acc-106). In the case of PHYVV, the response was more heterogeneous: seven accessions were tolerant, seven moderately susceptible, and one susceptible (Acc-06).

Overall, accessions inoculated with PepGMV exhibited lower AUDPC values compared to those inoculated with PHYVV, suggesting that PHYVV induced greater severity in most of the evaluated accessions.

The disease induced by PepGMV showed wide variability in AUDPC progression. Accession Acc-106 (wild, Tabasco) was the only one classified as resistant (AUDPC = 0), exhibiting no symptoms (Figure 3a). Among the domesticated accessions, Acc-60 (Huacle, Oaxaca) and Acc-65 (Cascabel, Jalisco) displayed low AUDPC values (1.17 and 1.65, respectively), indicating a tolerant response (Figure 3b,c). In contrast, Acc-113 (Bola), an improved variety, recorded the highest AUDPC value (7.00), reflecting greater susceptibility (Figure 3d).

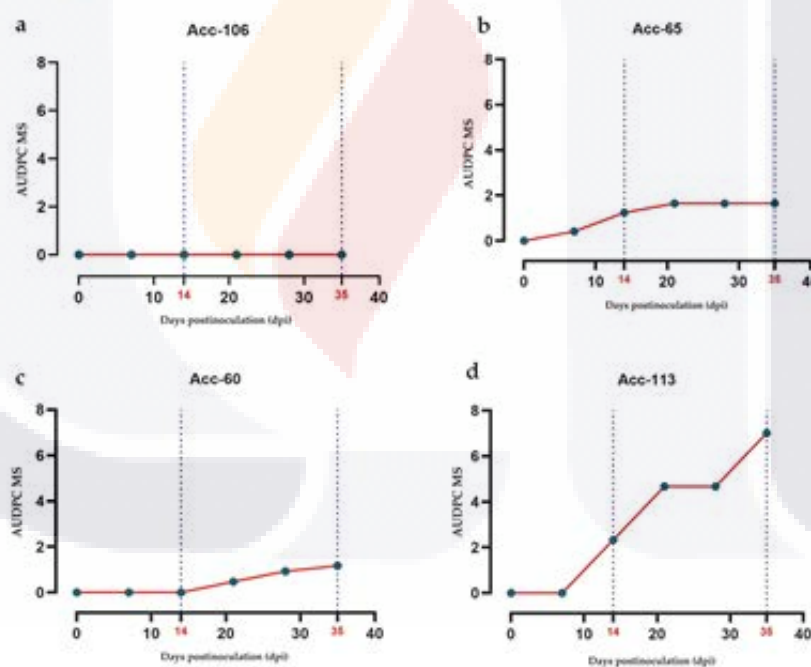


Figure 3. Dynamics of the area under the disease progression curve (AUDPC) for mean severity caused by PepGMV in four *Capsicum annuum* accessions with different susceptibility levels: (a) Acc-106 (wild) Resistant; (b) Acc-65 (domesticated) Tolerant; (c) Acc-60 (domesticated) Tolerant; (d) Acc-113 (domesticated) Moderately susceptible.

For PHYVV, increased disease progression and accumulation were observed in most accessions. Although Acc-106 (wild, Tabasco) maintained a low AUDPC value (0.93), other wild accessions such as Acc-105 and Acc-104 (both Amashito types) also showed low AUDPC values (2.33 and 5.50, respectively), being classified as tolerant and moderately

susceptible (Figure 4a–c). In contrast, the domesticated accession Acc-06 (Guajillo) exhibited the highest AUDPC value (16.00) and was therefore classified as susceptible (Figure 4d).

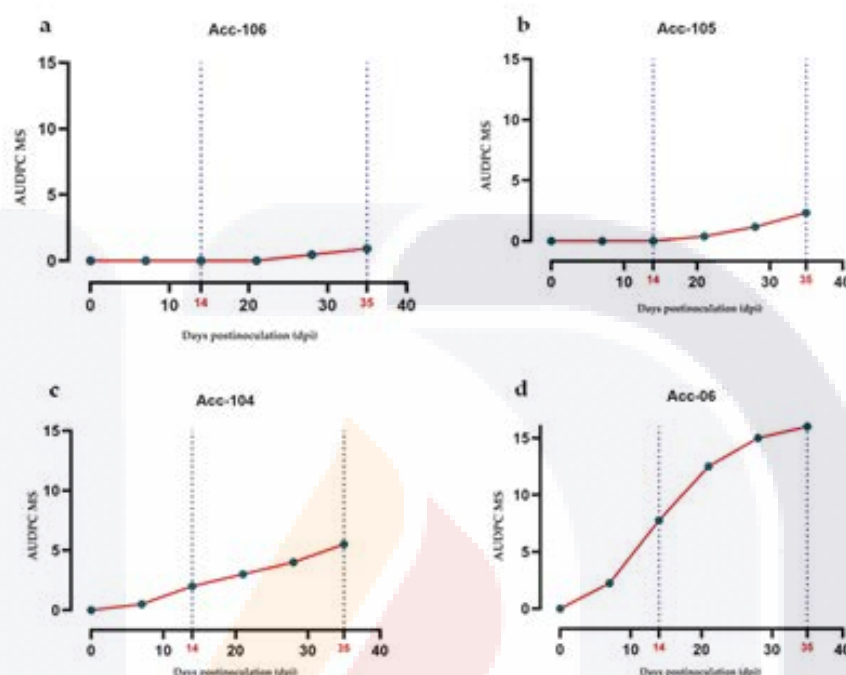


Figure 4. Dynamics of the area under the disease progression curve (AUDPC) for mean severity caused by PHYVV in four *Capsicum annuum* accessions with different susceptibility levels: (a) Acc-106 (wild) Tolerant; (b) Acc-105 (wild) Tolerant; (c) Acc-104 (wild), Moderately Susceptible; (d) Acc-06 (domesticated) Susceptible.

2.6. Identification of PepGMV and PHYVV in Asymptomatic Plants by PCR

PCR analysis confirmed the quality of all DNA samples through successful amplification of the actin gene, ensuring reliable PCR performance. Using this validated method, PCR analysis for PepGMV and PHYVV detection revealed an infection rate of over 90% in asymptomatic plants, confirming the high reliability of the bioballistic inoculation method. Out of the 167 asymptomatic plants, 154 were analyzed, yielding a 96% rate of positive detection. Specifically, 98% of the samples tested positive for PepGMV, while 91% were positive for PHYVV. PCR analysis targeting fragments of the replication (Rep) and capsid (CP) genes for both viruses confirmed the presence of viral DNA in some asymptomatic individuals. Figure 5 illustrates the amplification of PepGMV genes in Accession Acc-106. In plants 2, 3, and 5, no amplification of the Rep gene was detected (Figure 5a), while in plant 7, the CP gene was not amplified (Figure 5b). Both genes play essential roles in the viral infection cycle Rep in replication and CP in “encapsidation”, and their lack of amplification may be associated with the activation of the plant’s defense mechanisms that interfere with viral gene expression.

The presence of viral DNA in asymptomatic plants suggests that some accessions may limit viral replication or movement, effectively suppressing symptom development despite infection. This observation aligns with resistance mechanisms reported in *Capsicum* species, where the plant can tolerate or restrict virus proliferation without displaying visible symptoms. Further studies quantifying viral loads and characterizing host defense responses would be valuable to elucidate these tolerance mechanisms.

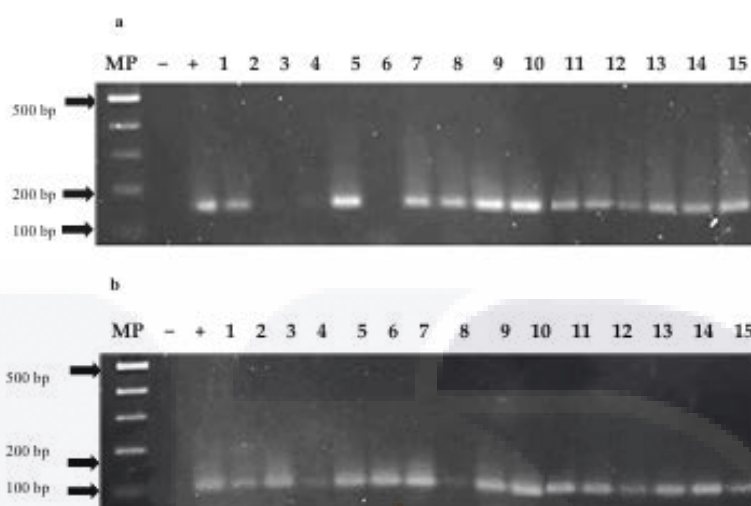


Figure 5. PCR identification of PepGMV viral DNA in 15 asymptomatic Acc-106 pepper plants. (a) Amplification of the Rep protein fragment (121 bp) and (b) Amplification of the CP protein fragment (104 bp). Samples taken 14 days postinoculation. Lane 1: 100 bp marker, Lane 2: Negative control (bombarded sheets with no viral DNA). Lane 3: Positive control (symptomatic leaves). Lanes with numbers 1 to 15 correspond to the asymptomatic plants of Acc-106.

3. Discussion

Several studies have highlighted the importance of wild *Capsicum* populations as valuable genetic sources for pathogen resistance due to their high genetic diversity and adaptability [15,27,28]. These populations, not subjected to artificial selection processes, exhibit a wide phenotypic and genotypic variability, including high levels of disease resistance [28]. This genetic diversity present in these groups has been used to identify individuals with different degrees of resistance or tolerance, which can be useful in breeding programs aimed at managing viral diseases such as those caused by PepGMV and PHYVV [29]. In this study, the use of bioballistic inoculation of infectious clones allowed a precise assessment of resistance across 15 wild, semidomesticated, and domesticated *Capsicum annuum* accessions. Our findings revealed that wild and semidomesticated accessions consistently exhibited lower levels of symptom severity and incidence compared to domesticated ones. The wild accession Acc-106 did not develop any symptoms after PepGMV inoculation and showed a tolerant response to PHYVV, with a mean severity of 0.13 and an incidence of 13% at 35 dpi. In contrast, some domesticated accessions, such as Acc-06 and Acc-113, developed more severe symptoms, reflecting higher susceptibility to viral infection. Although severity and incidence tended to increase with the degree of domestication, statistical analyses indicated that these differences were not always significant across all groups, particularly in the case of PepGMV. This lack of consistent statistical significance may be attributed to the high phenotypic variability within domestication groups and the unequal sample sizes, both of which can reduce the statistical power to detect biologically relevant differences in resistance or susceptibility. Such variability is common in *Capsicum* germplasm and underscores the importance of evaluating a broader range of accessions to more robustly detect resistance patterns associated with domestication.

It is important to highlight that alternative inoculation methods, such as whitefly (*Bemisia tabaci*)-mediated transmission, require specialized infrastructure and expertise, limiting their accessibility and consistency for large-scale screening. Additionally, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated inoculation, although commonly used in other plant virus

systems, is often inefficient in *Capsicum* species due to their recalcitrant nature. Preliminary experiments conducted in this study confirmed that *Agrobacterium*-mediated inoculation failed to infect any of the tested accessions, including Acc-106. Consequently, bioballistic inoculation was employed as a reliable and effective alternative, enabling direct delivery of viral DNA into plant tissues and achieving infection rates exceeding 90%. This method has been successfully applied in prior studies [10,19,20,24,25,30], supporting its suitability for resistance screening in *Capsicum* germplasm. These findings align with those of Godínez-Hernández et al. [16], who evaluated 49 populations of wild habanero pepper (*Capsicum chinense*) from Yucatán, Mexico, and reported significant resistance to PHYVV, attributed to low viral DNA accumulation and absence of visible symptoms in experimentally infected plants. Subsequently, Barrera-Pacheco et al. [17] identified the *CchGLP* gene in the wild accession BG-3821 of *C. chinense*, associating it with resistance to PHYVV. More recently, Retes-Manjarrez et al. [31,32] confirmed these findings by identifying wild populations of *C. annuum* with a high level of resistance to PHYVV, in which the presence of the *CchGLP* gene was also detected in the three lines evaluated.

Among the key mechanisms potentially underlying viral resistance is the restriction of viral movement within the plant [19,23,33]. Although viral DNA quantification was not performed, the viral Rep and CP genes of PepGMV were detected in 98% of asymptomatic plants, and those of PHYVV in 91% of asymptomatic plants, suggesting that the virus was able to replicate but not to trigger visible symptoms. This detection highlights the complexity of resistance mechanisms in *Capsicum* accessions, where plants support viral presence without developing symptoms, indicating a form of tolerance or restricted viral movement and replication.

This phenomenon has been reported previously in Begomovirus-resistant *Capsicum*, where defense mechanisms such as transcriptional gene silencing, DNA methylation, or inhibition of viral movement proteins contribute to suppressing symptom expressions despite infection. Understanding these processes is crucial for breeding strategies aiming not only at symptom reduction but also at limiting viral spread.

Furthermore, the observed difference in disease aggressiveness between PHYVV and PepGMV, reflected in AUDPC values and symptom severity, suggests that resistance or tolerance may be virus-specific, requiring evaluation of host responses to multiple viral species. This underscores the importance of integrating both phenotypic assessments and molecular diagnostics into the characterization of resistance to begomoviruses in pepper germplasm. This observation aligns with previous studies indicating that begomovirus resistance may involve limited viral replication or activation of host defense responses that suppress viral DNA accumulation in infected tissues [4,16]. These resistance mechanisms have been further associated with transcriptional and post-transcriptional gene silencing, DNA methylation, and inhibition of viral movement proteins within the host plant [10,19,23,30]. Although absolute viral DNA levels were not quantified in our study, the presence of the virus in asymptomatic plants suggests that certain accessions, particularly wild ones, may possess mechanisms that limit viral replication or spread to undetectable levels, which coincides with what has been reported in resistant accessions of *Capsicum* in previous studies [15,16,19,34].

Our results show that symptom severity and incidence induced by PepGMV and PHYVV were significantly influenced by domestication level when evaluated through the Area Under the Disease Progression Curve (AUDPC). Statistical analyses of individual accessions revealed significant differences in AUDPC values, with wild accessions generally exhibiting lower symptom progression and incidence compared to many domesticated accessions. However, when grouped by degree of domestication, differences among the domesticated (D), semidomesticated (SD), and wild (W) groups were not always

consistently significant, likely due to considerable phenotypic variability within groups and unequal sample sizes. This trend is consistent with what was reported by Hernández-Verdugo et al. [15], who found high levels of begomovirus resistance in wild *Capsicum annuum* accessions, and with what was pointed out by Meyer and Purugganan [28], who argue that the domestication process may reduce the genetic variability associated with defense genes.

Regarding symptom development, both viruses (PepGMV and PHYVV) induced visible symptoms from 7 dpi, with more pronounced and persistent symptoms observed in PHYVV-infected plants. Systematic photographic documentation, along with the development of a pictorial scale of severity, allowed for a detailed description of symptom evolution and the establishment of reliable visual categories. This five-level scale (ranging from 0 to 4) not only complements previously published scales by Anaya-López [34] for PepGMV and by Torres-Pacheco [35] for PHYVV but also provides a visual framework adapted for evaluating *Capsicum* under controlled conditions.

The wide phenotypic variability observed among accessions in response to both viruses reflects the underlying genetic diversity and differing domestication levels of the evaluated materials. In this context, visual phenotyping, complemented with the calculation of the area under the disease progression curve (AUDPC), offered a robust tool to integrate the temporal dynamics of the disease progression. This phenotyping strategy, widely validated in plant pathology [36,37], enabled the detection of differentiated patterns in the progression of symptom severity and incidence. Accessions inoculated with PHYVV tended to develop higher AUDPC values than those inoculated with PepGMV, confirming a more aggressive infection by the former. Once again, accession Acc-106 stood out as the only one with zero or minimal AUDPC values, reinforcing its classification as resistant. Together, systematic visual characterization using a pictorial scale, combined with quantitative analysis through AUDPC, strengthens the selection process of resistant or tolerant genotypes and provides a solid methodological foundation for future breeding efforts and resistance evaluations against begomoviruses.

4. Materials and Methods

4.1. Plant Material

The pepper accessions evaluated correspond to genetic material stored in the Germplasm Bank of the Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. We selected 15 accessions of *Capsicum annuum* with high genetic diversity, originating from different regions of Mexico and exhibiting various degrees of domestication: wild, semidomesticated, domesticated, or cultivated. This set includes *Criollo de Morelos 334* (CM334), an accession known for its resistance to *Phytophthora capsici* (Table 4).

4.2. Plant Production

The seeds of each accession were germinated following the procedure proposed by García-Nevárez et al. [38] with some modifications. A pregermination treatment with 10% NaOH was applied for 4 min followed by four 1 min rinses with distilled water. The seeds were then soaked in a solution of 5000 mg/L of gibberellic acid (Bio Gib®) for 24 h at 25 °C. Afterward, the seeds of each accession were sown in 50 cavity trays previously prepared with Peat moss as a substrate. Following sowing, a fungicide suspension (3.0 mL per cavity of Interceptan® 2.0 g/L) was applied. The seedlings were watered, covered with black plastic, and incubated in darkness at room temperature until they emerged. Once the seedlings emerged, the plastic was removed, and the trays were maintained under a photoperiod of 16 h light/8 h darkness at a temperature of 28 ± 2 °C until the plants developed 4 to 6 true leaves. Virus inoculation was then performed using bioballistics [20].

Table 4. Pepper accessions (*Capsicum annuum*) selected for the study of Begomovirus transmission: PepGMV and PHYVV by Bioballistics.

Accession	Region of Origin	Type or Breed	DD	Handling Category
Acc-6	Zacatecas, Zac.	Guajillo	D	Cultivated Creole
Acc-12	El Saladillo, Zac.	Puya	D	Cultivated Creole
ACC-21	El Saladillo, Zac.	Puya	D	Cultivated Creole
Acc-50	El Saladillo, Zac.	Ancho	D	Cultivated Creole
Acc-60	Oaxaca	Huacle	D	Cultivated Creole
Acc-62	Oaxaca	Huacle	D	Cultivated Creole
Acc-63	Morelos	Serrano CM334	SD	Uncultivated Creole *
Acc-65	Guadalajara, Jal.	Cascabel	D	Cultivated Creole
Acc-66	Nayarit	Cora	D	Cultivated Creole
Acc-67	Oaxaca	Chile de agua	D	Cultivated Creole
Acc-70	Queretaro	Chiltepín	W	Wild
Acc-104	Tabasco	Amashito	W	Wild
Acc-105	Tabasco	Amashito	W	Wild
Acc-106	Tabasco	Pico Paloma	W	Wild
Acc-113	Improved variety	Bola	D	Variety grown

DD = Degree of domestication. D = Domesticated, SD = Semidomesticated, and W = Wild. * Source of resistance to *P. capsici*.

4.3. Viral Clones and Inoculum Preparation

The viral clones of PepGMV and PHYVV used for inoculation were kindly donated by Dr. Rafael Rivera Bustamante, from the Laboratorio de Virología Vegetal of the CINVESTAV-IPN Irapuato. These correspond to infectious dimers of PepGMV and PHYVV, constructed and described by Carrillo-Tripp et al. [20]. For particle preparation, 60 mg of 0.7 µm tungsten particles (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) were used. The particles were washed with 2.0 mL of HNO₃, sonicated for 20 min with H₂O and ice in Corex glass tubes, and then transferred to 1.5 mL microcentrifuge tubes. After centrifugation, the HNO₃ was decanted, and 1.0 mL of absolute ethanol was added. The mixture was sonicated and stirred for 1 min, followed by centrifugation at 12,000 rpm for 15 min. Ethanol was discarded, and 1 mL of sterile distilled water was added. Then, 250 µL of the particle suspension was taken, and 700 µL of sterile distilled water was added. To coat the particles with viral DNA (infectious dimeric clones), the suspension was sonicated, and 50 µL was transferred to a new 1 mL tube (sufficient for six bombardments). Then, 5 µL (1 µg/µL) of viral DNA, 50 µL of 2.5 M CaCl₂, and 20 µL of 0.1 M spermidine were added. The mixture was vortexed for 1 min, sonicated, and centrifuged at 10,000 rpm for 15 min. The supernatant was discarded, and the pellet containing the DNA-coated particles was washed once with 500 µL of absolute ethanol, then sonicated and centrifuged again at 12,000 rpm for 15 min. Finally, the supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 60 µL of ethanol for bioballistic bombardment [2].

4.4. Inoculation of Plants with PepGMV and PHYVV by Bioballistics

The infectious clones PepGMV and PHYVV were inoculated separately. The plants of each accession were arranged on individual trays, each corresponding to a specific accession. The number of plants per tray ranged from a minimum of 15 and a maximum of 45 plants, depending on seed availability and germination rate, which among accessions. Each tray was divided into three sections: one for inoculation with PepGMV, another for PHYVV, and a third section with five control plants that were bombarded only with particles lacking viral DNA. This design allowed the response of each accession to infection by both begomoviruses to be evaluated independently.

The particles previously coated with the PepGMV and PHYVV clones were applied using bioballistics device. Inoculation was performed on the first and second youngest leaves; each shot was directed at the center of the leaf blade, near the main vein. The

tungsten microparticles were accelerated by helium pressure to 100 or 120 psi using an adapted delivery device [2].

4.5. Evaluation of PepGMV and PHYVV Symptoms in Pepper Accessions

The inoculated plants were kept in a growth chamber with a photoperiod of 16:8 (light–dark) at an average temperature of 27 ± 2 °C [16]. Symptom severity caused by the viruses was evaluated qualitatively using the scales proposed by Anaya-López [34] for PepGMV and by Torres-Pacheco [35] for PHYVV, with some modifications (Table 5). Weekly severity ratings were recorded for each plant and accession, starting at 7 days and continuing up to 35 days postinoculation (dpi). Disease progression was documented through photographs taken at 7, 14, 21, 28, and 35 dpi to identify virus-induced symptoms and phenotypic traits, and to relate them to the severity scale.

Table 5. Modified symptom severity scale for Pepper golden mosaic virus (PepGMV) and Pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV).

Severity	Symptoms	
	PepGMV	PHYVV
0	No symptoms	No symptoms
1	Slight distortion on apical leaves and visible yellow dots on leaves. Yellow dots visible in isolated patches on apical leaves.	Presence of dots in isolated groups slightly yellow. Slight wrinkling of the apical leaves.
2	Isolated and yellow mosaics forming a network at the base of the apical leaves.	The groups of isolated points begin to be observed as a network at the base of the apical sheets.
3	Leaves curly in the middle part. Slight curvature of the leaves and slightly distorted wrinkles.	Formation of insula-like bumps in the middle parts of the leaves and begin to curve slightly.
4	Complete distortion of the blades and they are smaller in size with respect to the control.	The curved leaves begin to distort. The leaves of the affected plants are smaller.
Own elaboration		

Disease progression was assessed by calculating the Area Under the Disease Progress Curve (AUDPC), using mean severity values recorded at times 7, 14, 21, 28, and 35 dpi. Based on these values and following the classification proposed by Reyes-Tena et al. [39] with modifications, accessions were categorized into five groups: Resistant, Tolerant, Moderately Susceptible, Susceptible, and Highly Susceptible (Table 6). This classification integrated the slope of the curve and the mean severity at 35 dpi for each accession.

Table 6. Classification of *Capsicum annuum* germplasm susceptibility based on mean severity and area under the disease progression curve (AUDPC) for Pepper golden mosaic virus (PepGMV) and Pepper yellow vein huasteco virus (PHYVV) inoculated by Bioballistics.

Severity Level	Behavior of the Area Under the Disease Progression Curve	Classification
0	No slope, no presence of the disease.	Resistant (R)
0.1–1.0	With a slight increase and reaching the asymptote at low levels and then remaining constant.	Tolerant (T)
1.1–2.0	The slope increases over time.	Moderately Susceptible (MS)
2.1–3.0	Steep slope with increments over time.	Susceptible (S)
3.1–4.0	Steep and steep slope from the onset of the disease.	Highly Susceptible (HS)

4.6. Analysis of Viral Infection by PCR in Asymptomatic Plants

To confirm the efficiency and consistency of the bioballistic inoculation method, molecular detection of viral DNA specific to PepGMV and PHYVV was performed by PCR targeting the Rep and CP genes. A constitutively expressed plant gene (actin) was amplified as an internal control to verify DNA extraction quality and PCR performance.

Tissue samples were collected from distal leaves (new leaves) at 14 dpi from plants of each accession that did not exhibit characteristic viral symptoms. Samples were immediately frozen at -80 °C and pulverized using liquid nitrogen. For DNA extraction, 0.1 g

of pulverized tissue was used following the CTAB protocol with modifications [40]. To detect PepGMV and PHYV viral DNA, 20 ng of DNA was used for PCR. Amplification was performed in a thermal cycler SelectCycler™ II (Select BioProducts, Edison, NJ, USA) using virus-specific primers. For PepGMV, a 121 bp fragment of the Rep protein gene was amplified using the forward primer 5'-CAAAGCTGGTGATCCGAAAACG-3' and the reverse primer 5'-GTAAACGAGGATAATGGATAAGG-3'. A 104 bp fragment of the CP protein gene was amplified using the forward primer 5'-CCCATCGTGTAGGCAAGCGTTTCTG-3' and the reverse primer 5'-CATGACCTGTGTGTGTGGTGTGTGTGTTCTG-3' [20]. For PHYVV, a 142 bp fragment of the Rep protein gene was amplified using the forward primer 5'-CGTCTCCCTCAACTACAAAACC-3' and the reverse primer 5'-ATCGGTGTTCGTGCATTGG-3'. For the CP protein gene, a 99 bp fragment was amplified using the forward primer 5'-CCTCAGCTTGGGTTAATCGC-3' and the reverse primer 5'-CCTTACAGGGACCTTCACAACC-3' [41]. PCR conditions for both viruses were as follows: an initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, with a final extension at 72 °C for 10 min. The PCR products were separated by electrophoresis on 2% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualized under ultraviolet light using a DyNA Dual-Intensity UV Transilluminator.

4.7. Statistical Analysis

The weekly data on symptom severity, recorded by plant and accession, were organized into a database for statistical analysis. The mean weekly severity per accession caused by each virus was estimated, along with the percentage of incidence (% of plants with severity > 0). Based on the data on mean severity and incidence, the Area Under the Disease Progression Curve (AUDPC) was calculated using the formula proposed by Pedroza and Samaniego [41]. AUDPC values were analyzed using the Kruskal–Wallis test to detect significant differences in disease progression and total disease accumulation among accessions.

The response of pepper accessions to viral inoculation was analyzed independently for each virus (PepGMV and PHYVV). For each case, a two-way factorial ANOVA was performed considering the effects of accession and time (dpi) on symptom severity. Differences among accessions at 35 dpi were analyzed using Tukey's test ($p < 0.05$). The effect of domestication level on virus-induced severity was assessed by grouping accessions into domesticated, semidomesticated, and wild accession categories. Differences in severity at 35 dpi among these groups were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's test ($p < 0.05$).

All statistical analyses were conducted using R software (version 4.3.3), and graphs were generated with GraphPad Prism (version 10.5.0).

5. Conclusions

This study revealed significant variability in symptom severity, incidence, and area under the disease progression curve (AUDPC) among *C. annuum* accessions inoculated with the begomoviruses PepGMV and PHYVV. Wild and semidomesticated accessions exhibited lower susceptibility compared to domesticated ones, suggesting that the degree of domestication influences resistance levels to these viral pathogens. However, differences were not always statistically significant across all groups, particularly for PepGMV, which may be attributed to phenotypic variability within domestication groups and unequal sample sizes. Notably, the wild accession Acc-106 (from Tabasco) showed resistance to PepGMV and tolerant behavior against PHYVV, highlighting its potential as a valuable genetic resource for breeding programs focused on viral resistance. Overall, this work

underscores the importance of Mexican wild germplasm as a potential source of resistance genes against begomoviruses in pepper.

Author Contributions: Conceptualization, K.V.D.L.-R. and D.L.T.-S.; methodology, K.V.D.L.-R., J.F.M.-D. and D.L.T.-S.; formal analysis, J.d.J.L.-R. and E.G.-G.; investigation, K.V.D.L.-R.; writing—original draft preparation, K.V.D.L.-R.; writing—review and editing, J.d.J.L.-R., E.G.-G., J.F.M.-D., J.S.-R., D.L.T.-S. and R.F.R.-B.; supervision, J.d.J.L.-R., E.G.-G., J.F.M.-D. and J.S.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Universidad Autónoma de Aguascalientes under research projects number PIBT23-1 and PIAGR-24-1.

Data Availability Statement: All data generated or analyzed during this study are included in this published article, and the other specific data are available upon request from the corresponding author.

Acknowledgments: The authors are grateful for the grant awarded by Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología E Innovación (SECIHTI), grant number 667012.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Lee, Y.H.; Jung, M.; Shin, S.H.; Lee, J.H.; Choi, P.H.; Her, N.H.; Lee, J.H.; Ryu, K.H.; Paek, K.Y.; Harn, C.H. Transgenic peppers that are highly tolerant to a new CMV pathotype. *Plant Cell Rep.* **2009**, *28*, 223–232. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Garzón-Tiznado, J.A.; Torres-Pacheco, I.; Ascencio-Ibanez, J.T.; Herrera-Estrella, L. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathol.-N. Y. Baltim. Then St Paul* **1993**, *83*, 514. [\[CrossRef\]](#)
- Escobedo Gracia-Medrano, R.M.; Maldonado-Borges, J.I.; Sánchez-Cach, L.A.; Minero-García, Y.; Hernández-Zepeda, C.; Moreno-Valenzuela, O.A. Preliminary identification and phylogenetic relationships of begomoviruses associated with *Capsicum* spp. in the Yucatan peninsula, Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2022**, *40*, 377–400. [\[CrossRef\]](#)
- Garzón-Tiznado, J.A.; Acosta-García, G.; Torres-Pacheco, I.; González-Chavira, M.; Rivera Bustamante, R.F.; Maya-Hernández, V.; Guevara-González, R.G. Presence of the Geminivirus, Huasteco del Chile (PHV), Texan Tamaulipas Chili Variant (TPV-T) and Chinese Tomato (VCDT), in the states of Guanajuato, Jalisco and San Luis Potosí, Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* **2002**, *20*, 45–52.
- Méndez-Lozano, J.; Torres-Pacheco, I.; Fauquet, C.M.; Rivera-Bustamante, R.F. Interactions between Geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* **2003**, *93*, 270–277. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Torres-Pacheco, I.; Garzón-Tiznado, J.A.; Brown, J.K.; Becerra-Flora, A.; Rivera-Bustamante, R.F. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the southern United States. *Phytopathology* **1996**, *86*, 1186–1192. [\[CrossRef\]](#)
- 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. Phylogenetic analysis and distribution of Begomovirus in the culture of chili pepper (*Capsicum annuum* L.) in Sinaloa, Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* **2018**, *41*, 149–157. [\[CrossRef\]](#)
- Morales-Aguilar, J.J.; Rodríguez-Negrete, E.A.; Camacho-Beltrán, E.; López-Luque, C.A.; Leyva-López, N.E.; Jiménez-Díaz, F.; Voloudakis, A.; Santos-Cervantes, M.E.; Méndez-Lozano, J. Identification of Tomato yellow leaf curl virus, *Pepper huasteco yellow vein virus* and *Pepper golden mosaic virus* associated with pepper diseases in northern Mexico. *Can. J. Plant Pathol.* **2019**, *41*, 544–550. [\[CrossRef\]](#)
- Zamora-Macorra, E.J.; Ávila-Alistac, N.; Lagunes-Fortiz, E. Viruses and viroids in tomato (*Solanum lycopersicum*) and plant growth-promoting rhizobacteria as a management alternative. *Phytopathology* **2023**, *41*, 6. [\[CrossRef\]](#)
- Rodríguez-Negrete, E.A.; Carrillo-Tripp, J.; Rivera-Bustamante, R.F. RNA silencing against geminivirus: Complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *J. Virol.* **2009**, *83*, 1332–1340. [\[CrossRef\]](#)
- Rodelo-Urrego, M.; García-Arenal, F.; Pagan, I. The effect of ecosystem biodiversity on virus genetic diversity depends on virus species: A study of chiltepin-infecting begomoviruses in Mexico. *Virus Evol.* **2015**, *1*, vev004. [\[CrossRef\]](#)
- Díaz-Nájera, J.F.; Aybar-Serna, S.; Arispe-Vázquez, J.L.; Terrones-Salgado, J.; Flores-Yáñez, A.; Vargas-Hernández, M.; De Lira-Ramos, K.V.; Carnero-Avilés, L.; Felipe-Victoriano, M.; Mayo-Hernández, J. Report of *Pepper golden mosaic virus* in Native Apaxtleco Chili Pepper in Guerrero, Mexico. *Trop. Subtrop. Agroecosystems* **2025**, *28*, 1–5. [\[CrossRef\]](#)
- Borah, B.K.; Dasgupta, I. Begomovirus research in India: A critical appraisal and the way ahead. *J. Biosci.* **2012**, *37*, 791–806. [\[CrossRef\]](#)
- Hernández-Verdugo, S.; Guevara-González, R.G.; Rivera-Bustamante, R.F.; Vázquez-Yanes, C.; Oyama, K. The wild relatives of the chili pepper (*Capsicum* spp.) as genetic resources. *Boletín Soc. Botánica México* **1998**, *62*, 171–181. [\[CrossRef\]](#)

15. Hernández-Verdugo, S.; Guevara-González, R.G.; Rivera-Bustamante, R.F.; Oyama, K. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus (PHV): Presence of viral DNA and differentiation among populations. *Euphytica* **2001**, *122*, 31–36. [\[CrossRef\]](#)
16. Godínez-Hernández, Y.; Anaya-López, J.L.; Díaz-Plaza, R.; González-Chavira, M.; Torres-Pacheco, I.; Rivera-Bustamante, R.F.; Guevara-González, R.G. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatan, Mexico. *HortScience* **2001**, *36*, 139–142. [\[CrossRef\]](#)
17. Barrera-Pacheco, A.; Joaquín-Ramos, A.D.J.; Torres-Pacheco, I.; González-Chavira, M.M.; Perez-Perez, M.C.I.; Guevara-Olvera, L.; Guevara-Gonzalez, R.G. Analysis of transcriptional expressions induced in *Capsicum chinense* BG-3821 under conditions of biotic and abiotic stress. *Agrociencia* **2008**, *42*, 95–106.
18. Anaya-López, J.L.; Pérez-Mora, E.; Torres-Pacheco, I.; Muñoz-Sánchez, C.I.; Guevara-Olvera, L.; González-Chavira, M.M. Inducible gene expression by Pepper huasteco virus in *Capsicum chinense* plants with resistance to geminivirus infections. *Can. J. Plant Pathol.* **2005**, *27*, 276–282. [\[CrossRef\]](#)
19. García-Neria, M.A.; Rivera-Bustamante, R.F. Characterization of Geminivirus resistance in an accession of *Capsicum chinense* Jacq. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2011**, *24*, 172–182. [\[CrossRef\]](#)
20. Carrillo-Tripp, J.; Lozoya-Gloria, E.; Rivera-Bustamante, R.F. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* **2007**, *97*, 51–59. [\[CrossRef\]](#)
21. Kushawaha, A.K.; Dasgupta, I. Infectivity of cloned begomoviral DNAs: An appraisal. *VirusDis* **2019**, *30*, 13–21. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Morales, F.J. *Whitefly and Whitefly-Transmitted Viruses in the Tropics: Building a Knowledge Base for Global Action*; Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT): Cali, Colombia, 2006; pp. 1–351.
23. Rojas, M.R.; Hagen, C.; Lucas, W.J.; Gilbertson, R.L. Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2005**, *43*, 361–394. [\[CrossRef\]](#)
24. Rentería-Canett, I.; Xoconostle-Cázares, B.; Ruiz-Medrano, R.; Rivera-Bustamante, R.F. Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virol. J.* **2011**, *8*, 104. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. López-López, K.; Rodríguez-Mora, D.M.; Vaca-Vaca, J.C. Optimization of the conditions of inoculation by bioballistics of a Begomovirus in tomato and tobacco. *Colomb. J. Biotechnol.* **2013**, *15*, 8–17. [\[CrossRef\]](#)
26. Gasca-González, M.R.; Rivera-Herrera, Y.; Torres-Pacheco, I.; González-Chavira, M.M.; Guevara-Olvera, L.; Muñoz-Sánchez, C.I.; Guevara-González, R.G. Study of the transcriptome in *Capsicum chinense* Jacq. resistant to the huasteco yellow vein virus of the chili. *Agrociencia* **2008**, *42*, 107–117.
27. Pickersgill, B. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution* **1971**, *25*, 683–691.
28. Meyer, R.S.; Purugganan, M.D. Evolution of crop species: Genetics of domestication and diversification. *Nat. Rev. Genet.* **2013**, *14*, 840–852. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Hajjar, R.; Hodgkin, T. The use of wild relatives in crop improvement: A survey of developments over the last 20 years. *Euphytica* **2007**, *156*, 1–13. [\[CrossRef\]](#)
30. Rodríguez-Gandarilla, M.G.; Rodríguez-Negrete, E.A.; Rivera-Bustamante, R.F. Superinfection by PHYVV alters the recovery process in PepGMV-infected pepper plants. *Viruses* **2020**, *12*, 286. [\[CrossRef\]](#)
31. Retes-Manjarrez, J.E.; Hernández-Verdugo, S.; Pariaud, B.; Melgoza-Villagómez, C.M.; Pacheco-Olvera, A.; Parra-Terraza, S.; Garzón-Tiznado, J.A. Detección de resistencia al virus huasteco vena amarilla del chile y su heredabilidad en genotipos silvestres de *Capsicum annuum* L. *Interciencia* **2016**, *41*, 541–547.
32. Retes-Manjarrez, J.E.; Hernández-Verdugo, S.; Pariaud, B.; Hernández-Espinal, L.A.; Parra-Terraza, S.; Trejo-Saavedra, D.L.; Rivera-Bustamante, R.F.; Garzón-Tiznado, J.A. Resistance to *Pepper huasteco yellow vein virus* and its heritability in wild genotypes of *Capsicum annuum*. *Bot. Sci.* **2018**, *96*, 52–62. [\[CrossRef\]](#)
33. Hull, R. The movement of viruses in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1989**, *27*, 213–240. [\[CrossRef\]](#)
34. Anaya-López, J.L.; Torres-Pacheco, I.; González-Chavira, M.; Garzon-Tiznado, J.A.; Pons-Hernandez, J.L.; Guevara-González, R.G.; Hernández-Verdugo, S. Resistance to geminivirus mixed infections in Mexican wild peppers. *HortScience* **2003**, *38*, 251–255. [\[CrossRef\]](#)
35. Torres-Pacheco, I. Geminiviruses Involved in the Yellow Curl of the Chili: Interactions Between PHV and TPV. Ph.D. Thesis, Center for Research and Advanced Studies of the I.P.N., Irapuato Unit. Irapuato, Guanajuato, Mexico, 1997.
36. Shaner, G.; Finney, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology* **1977**, *67*, 1051–1056. [\[CrossRef\]](#)
37. Simko, I.; Piepho, H.P. The area under the disease progress stairs: Calculation, advantage, and application. *Phytopathology* **2012**, *102*, 381–389. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

38. García-Nevárez, G.; Campos-Figueroa, M.; Chávez-Sánchez, N.; Quiñones-Pando, F.J. Efficacy of Biorational and Conventional Insecticides against the Pepper Weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) in the South-Central Chihuahua. *Southwest. Entomol.* **2012**, *37*, 391–401. [\[CrossRef\]](#)
39. Reyes-Tena, A.; Rodríguez-Alvarado, G.; Luna-Ruiz, J.J.; Arreola-Romero, V.; Arriaga-Solorio, K.L.; Gómez-Dorantes, N.; Fernández-Pavía, S.P. Tolerance to virulence phenotypes of *Phytophthora capsici* in pasilla pepper cultivars. *HortScience* **2021**, *56*, 1239–1243. [\[CrossRef\]](#)
40. Doyle, J.J.; Doyle, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **1990**, *12*, 12–31.
41. Pedroza, S.A.; Samaniego, J.A. Análisis del Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) en patosistemas agrícolas. In *Tópicos Selectos de Estadística Aplicados a la Fitosanidad*, 1st ed.; Bautista, M.N., Soto, R.L., Pérez, P.R., Eds.; Colegio de Posgraduados: Montecillo, Mexico, 2009; pp. 179–189. [\[CrossRef\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.