

# Preliminary identification and phylogenetic relationships of begomoviruses associated with *Capsicum* spp. in the Yucatan peninsula, Mexico

## Identificación preliminar y relación filogenética de begomovirus asociados con *Capsicum* spp. en la península de Yucatán, México

Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, Josefina I. Maldonado-Borges, Lucila A. Sánchez-Cach, Yereni Minero-García, <sup>1</sup>Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., Mérida, Yucatán, México, C.P. 97205, Cecilia Hernández-Zepeda, Unidad de Ciencias del Agua, Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., C.P. 77500; Oscar A. Moreno-Valenzuela<sup>1\*</sup>.

\*Corresponding autor: oamv@cicy.mx

Received: June 16, 2022.

Accepted: August 24, 2022.

Gracia-Medrano RME, Maldonado-Borges JI, Sánchez-Cach LA, Minero-García Y, Hernández-Zepeda C and Moreno-Valenzuela AO. 2022. Preliminary identification and phylogenetic relationships of begomoviruses associated with *Capsicum* spp. in the Yucatan peninsula, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 40(3): 377-400.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-6>

First DOI publication: August 31, 2022.

Primera publicación DOI: 31 de Agosto, 2022.

**Abstract.** Pepper plants with viral symptoms were collected in the Yucatan Peninsula, Mexico (YPM) with the objective to characterize the partial identity and the genetic and phylogenetic relationship of the begomoviruses infecting different pepper species, including *Capsicum chinense*, various *C. annuum* landraces, *C. frutescens*, *C. a. var. aviculare*, as well

**Resumen.** Se colectaron plantas de chile con síntomas virales en la Península de Yucatán, México (YPM), con el objetivo de caracterizar la identidad parcial y las relaciones genéticas y filogenéticas de los begomovirus que infectan diferentes especies de chile, que incluyen *Capsicum chinense*, variedades locales de *C. annuum*, *C. frutescens* y *C. annuum* var. *aviculare*, así como algunas especies de maleza. Las muestras de hoja fueron colectadas durante dos temporadas de infestación severa de mosquita blanca. El ADN genómico de las plantas se extrajo y un fragmento de los begomovirus se amplificó utilizando cebadores universales. Los amplicones fueron secuenciados y utilizados para análisis genéticos y filogenéticos. Los resultados demostraron que el 90.1% de las plantas colectadas (151) estuvieron infectadas por begomovirus. Los datos mostraron que el *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) es el virus más frecuente en las plantas cultivadas, semicultivadas y silvestres que se

as some weeds. The leaf samples were collected during two severe whitefly infestation seasons. Total genomic DNA from the sampled plants was extracted and a fragment of the begomoviruses was amplified using universal primers. Amplicons obtained were sequenced and sequences were used for genetic and phylogenetic analysis. Our results demonstrate that 90.1 % of the total sampled plants (151) were infected with begomoviruses. The data identified *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) as the most frequent species found within cultivated, semi-cultivated, and wild-analyzed samples. In addition, sequence analysis indicates the presence of *Euphorbia mosaic virus-Yucatán Peninsula* (EuMV-YP) infecting a Habanero chili plant, as well as the predominance of PepGMV in different weed plant species. Genetic variation based on nucleotide distance analysis from partial DNA-A begomovirus sequences indicated that the PepGMV isolates were closely related among them sharing 95 to 99% nucleotide sequence identity. Data showed that begomovirus that infected the sampled plants included the partially identified species of PepGMV, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and EuMV-YP.

**Key words:** *Capsicum annuum* landraces, habanero chili, phylogeny, weed plants

Members of the family Geminiviridae have circular, single-stranded DNA (ssDNA) genomes encapsidated in twinned icosahedral particles; they form the second-largest family of plant viruses. The genus *Begomoviridae* comprises viruses with monopartite (one ~2.9-kb DNA) and/or mostly bipartite genomes (two ~2.6-kb DNAs, referred as DNA-A and DNA-B) (Brown *et al.*, 1995; Fauquet

analizaron en este trabajo. Además, las secuencias analizadas indicaron la presencia del *Euphorbia mosaic virus-Yucatán Peninsula* (EuMV-YP) en plantas de chile habanero, así como la predominancia del PepGMV en diferentes especies de maleza. La variación genética de las secuencias del fragmento del componente A de los begomovirus, mostró que los aislados del PepGMV analizados están estrechamente relacionados entre ellos y comparan un 95-99% de identidad. Los datos mostraron que los begomovirus que infectan a las plantas colectadas incluyen a las especies parcialmente identificadas como PepGMV, *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV), *Tomato severe leaf curl virus* (ToSLCV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) and EuMV-YP.

**Palabras clave:** razas silvestres de *Capsicum*, chile habanero, filogenia, maleza.

Los miembros de la familia Geminiviridae, que tienen genomas circulares de ADN monocatenario (ssDNA) encapsidados en partículas icosaédricas gemelas, forman la segunda familia más grande de virus de plantas. El género *Begomovirus* comprende virus con genomas monopartitas (un componente de ADN de ~2,9 kb) y/o en su mayoría bipartitas (dos componentes de ADN de ~2,6 kb, denominados ADN-A y ADN-B) (Brown *et al.*, 1995; Fauquet y Stanley, 2005; Jones, 2003). Los *begomovirus* incluyen más de 440 especies, algunas de las cuales pueden infectar plantas dicotiledóneas. Las especies de begomovirus son transmitidas por mosquitas blancas del complejo de especies crípticas *Bemisia tabaci* (Fiallo-Olive *et al.*, 2021). Se han documentado enfermedades devastadoras causadas por begomovirus en diferentes cultivos en América Central, México, la cuenca del Caribe, el sur de los Estados Unidos de América y América del Sur. Las

and Stanley, 2005; Jones, 2003). Begomoviruses includes more than 440 species, members of which infect dicot plants and are transmitted by whiteflies of the *Bemisia tabaci* cryptic species complex (Fiallo-Olive *et al.*, 2021). In particular, devastating diseases to cultivated plants caused by begomoviruses have been documented through Central America, Mexico, the Caribbean Basin, the Southern United States of America, and South America, yield losses range from 50 to 90% of total production. (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2005; Rausch *et al.*, 2005; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Previous reports have confirmed the incidence of begomoviruses in a range of solanaceous crop plants and native flora from various parts of Mexico (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999; Garrido-Ramirez and Gilbertson, 1998; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c; Torres-Herrera *et al.*, 2019; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). In particular, PepGMV was reported in cultivated and wild pepper, in different regions of Mexico, as Baja California, Sinaloa, Sonora, the Comarca Lagunera, Campeche, Yucatan, San Luis Potosi, Michoacan, among others (Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019).

*Capsicum annuum* (family: Solanaceae), a high-value crop for its non-pungent (sweet pepper) and pungent (chili syn. hot pepper) fruits, is the foremost pepper species cultivated worldwide (Bosland and Votova, 2000; Park *et al.*, 2021). This species, together with other pungent, valuable species, originating and domesticated in the tropical Americas—such as *C. chinense* (chili Habanero), *C. pubescens* (chili Manzano), and *C. frutescens* (chili Tabasco or Picopaloma)—are broadly cultivated and consumed in the diet throughout Mexico (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005).

pérdidas oscilan entre el 50 y el 90 % de la producción total (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Brown *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2005; Rausch *et al.*, 2005; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Reportes previos han confirmado la incidencia de begomovirus en una variedad de plantas cultivadas de la familia Solanácea y flora nativa de varias regiones de México (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999; Garrido-Ramirez y Gilbertson, 1998; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007b; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007c; Torres-Herrera *et al.*, 2019; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). En particular, el PepGMV ha sido reportado en chile cultivado y silvestre en diferentes regiones de México como Baja California, Sinaloa, Sonora, la Comarca Lagunera, Campeche, Yucatán, San Luis Potosí y Michoacán, entre otros lugares (Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019; Rodelo-Urrego *et al.*, 2015; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019).

*Capsicum annuum* (familia: Solanaceae), un cultivo de alto valor debido a sus frutos no picantes (pimiento dulce) y picantes (chile syn. hot pepper), es la especie de chile más cultivada en todo el mundo (Bosland y Votova, 2000; Park *et al.*, 2021). Esta especie, junto con otras especies picantes y valiosas que se originaron y domesticaron en América tropical, como *C. chinense* (chile habanero), *C. pubescens* (chile manzano) y *C. frutescens* (chile tabasco o picopaloma), se cultivan y se consumen ampliamente en México (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005). Los problemas persistentes que afectan a estos cultivos incluyen una variedad de virus y sus vectores. Gran parte de las pérdidas de rendimiento se atribuyen a enfermedades virales causadas por begomovirus y al uso de genotipos de chile susceptibles (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). La diversidad del chile es un recurso esencial para la mejora genética y el manejo del cultivo. En combinación con la maleza, los chiles actúan

Persistent problems affecting these crops include a range of viruses and their vectors. Of these, the viral disease that accounts for much of the yield losses is attributed to begomoviruses and the use of susceptible cultivated pepper genotypes (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Torres-Pacheco *et al.*, 1996). Pepper diversity is an essential resource for genetic improvement and crop management; in combination with natural weeds, they are host reservoirs of viruses, which, together with the whitefly-vector, might support pathogen-diversifying events that should be investigated. In the states of the Yucatan Peninsula of Mexico (YPM), variations in *C. annuum* var. *annuum* landraces (such as those the Mayan named Ya'ax iik, X'kat iik, Dulce, and the wild grown *C. annuum* var. *aviculare*, named Maax iik) in response to changing biotic and/or abiotic stresses are significant. These landraces, which are primarily grown in home gardens, the Milpa system (associated with other crops), or harvested *in situ*, are utilized for local consumption and as a source for rural family income (Cazares-Sanchez *et al.*, 2005). Despite their importance, information regarding the distribution and disease incidence by different pathogens, such as begomoviruses, is limited. In addition, the Habanero chili, an essential crop for both local use and export, is cultivated in extensive cropping areas; however, increased use of agrochemicals has not diminished losses on fruit harvest; rather, whitefly infestation and viral diseases exceeded 90% during the dry season (March to May of each year, farmer, and author observations). The severity of these problems has impacted Habanero field cultivation; traditional field production has moved toward alternative cropping systems, such as mulching, tunneling and greenhouses. Thus, as a first step towards the development of broad control strategies, pathogens common to cultivated, wild relatives, and weed species, as well as their vectors, must be recognized

como reservorio hospedero de virus que, junto con la mosquita blanca, contribuyen a la diversificación de patógenos en un proceso que debe investigarse más a fondo. En los estados de la Península de Yucatán en México (YPM), variaciones significativas en las razas nativas de *C. annuum* var. *annuum* (cuyos nombres mayas son Ya'ax iik, X'kat iik, Dulce y el chile silvestre *C. annuum* var. *aviculare*, llamado Maax iik), se producen en respuesta a cambios de estrés biótico y/o abiótico. Estas variedades locales, que se cultivan principalmente en huertos familiares con el sistema de Milpas (asociado a otros cultivos), o se cosechan *in situ*, se utilizan para el consumo local y como fuente de ingresos de las familias rurales (Cazares-Sánchez *et al.*, 2005). A pesar de su importancia, existe información limitada sobre la distribución e incidencia de diferentes patógenos como los begomovirus. El chile habanero, un cultivo esencial tanto para uso local como para exportación, se cultiva en extensos campos agrícolas. Sin embargo, el mayor uso de agroquímicos no ha reducido las pérdidas de la cosecha. Más bien, la infestación de la mosquita blanca y las enfermedades virales todavía afectan al 90% del cultivo durante la estación seca (marzo a mayo de cada año; observaciones de agricultores locales y del autor). La severidad de estos problemas ha afectado el cultivo de chile habanero en campo. La producción de campo tradicional se ha desplazado hacia sistemas de cultivo alternativos como el acolchado, la agricultura en microtúnel y los invernaderos. El primer paso hacia el desarrollo de estrategias amplias de control es la identificación y caracterización genética de los patógenos (y sus vectores), que son comunes a las especies de chile silvestre y cultivado, así como a las especies de maleza que están asociadas con ellas. El presente estudio tuvo como objetivo caracterizar la identidad parcial y las relaciones genéticas y filogenéticas de los begomovirus que infectan diferentes chiles, incluyendo *C.*

and genetically characterized. The objective of this study was to characterize the partial identity, the genetic diversity and the phylogenetic relationship of the begomoviruses infecting different peppers, including the cultivated *C. chinense*, various *C. a. annuum* landraces and *C. frutescens* and the wild grown *C. annuum* var. *aviculare* (Maax iik), as well as some uncultivated plants grown as weeds from different locations in the state of Yucatan and Campeche. Genetic and phylogenetic analyses based on nucleotide sequences of the core Coat Protein gene (*Cp*) region (CPR) were used to explore begomovirus genetic diversity and resolve the possible relationship with other known bipartite begomovirus.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material and source of viruses

A total of 151 symptomatic plant samples were collected, including cultivated *Capsicum chinense* Habanero-type (45) and Scotch Bonet-type (12), *C. annuum* var. *annuum* landraces regionally identify as Dulce (18), X'kat iik (12), and Ya'ax iik (8) plants of *C. annuum* var. *aviculare* locally called Maax iik (43), and *C. frutescens* (8) Tabasco-type plants that grow wild or in-home gardens. Additionally, we collected representative weeds from different families: *Callicarpa* spp., (Verbenaceae) (1), *Croton malvaviscifolius* (Euphorbiaceae) (1), *Dicliptera sexangularis* (Acanthaceae) (1), *Herissantia crispa* (Malvaceae) (1), and *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) (1). Plant material was collected in locations within the states of Yucatan (YS) and Campeche (CS) in the YPM (Table 1, Figure 1). The weed leaf samples were gathered from wild grown plants in non-cropping sites and from pepper cultivated areas during a severe whitefly

*chinense* cultivado, varias variedades locales de *C. a. annuum* y *C. frutescens* y la especie silvestre *C. annuum* var. *aviculare* (Maax iik), así como algunas plantas silvestres que crecen como maleza en diferentes localidades del estado de Yucatán y Campeche. Se utilizaron análisis genéticos y filogenéticos basados en secuencias de nucleótidos de la región central del gen de la proteína de la capsida (*Cp*) (CPR) para explorar la diversidad genética de los begomovirus y determinar la posible relación con otros begomovirus bipartitas conocidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal y fuentes de virus

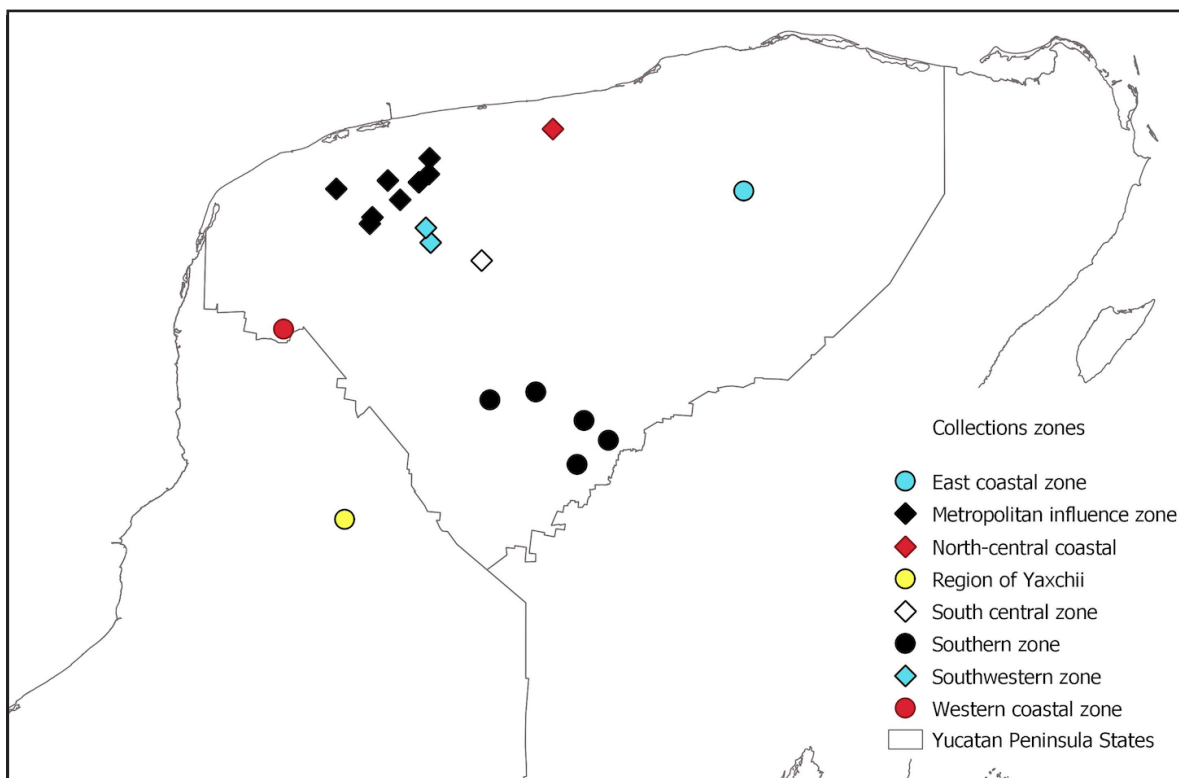
Se utilizaron un total de 151 muestras de plantas de chile con síntomas, incluidas las cultivadas de tipo habanero *Capsicum chinense* (45) y tipo Scotch Bonet (12); las variedades locales de *C. annuum* var. *annuum* identificadas regionalmente como Dulce (18); X'kat iik (12) y Ya'ax iik (8); plantas de *C. annuum* var. *aviculare* conocida localmente como Maax iik (43) y plantas de *C. frutescens* (ocho) tipo Tabasco, que crecen silvestres o en huertos familiares. Adicionalmente, se recolectó maleza representativa de diferentes familias: *Callicarpa* spp., (Verbenaceae) (uno), *Croton malvaviscifolius* (Euphorbiaceae) (uno), *Dicliptera sexangularis* (Acanthaceae) (uno), *Herissantia crispa* (Malvaceae) (uno) y *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) (uno). El material vegetal recolectó en diferentes localidades de los estados de Yucatán (YS) y Campeche (CS), ambos ubicados en la YPM (Cuadro 1, Figura 1). Se recolectaron muestras de hojas de maleza en sitios no agrícolas y en áreas de cultivo de chile, durante dos temporadas de infestación severa de mosquita blanca (de febrero a mayo y de julio a principios de octubre de 2017). Las

**Table 1. Locations where the biological material was collected within the Yucatan (YS), and Campeche (CS) states in Mexico.**

**Cuadro 1. Ubicaciones donde se recolectó el material biológico en los estados de Yucatán (YS) y Campeche (CS), México.**

State	Region/ zone	District
Yucatan	Metropolitan influence zone	Conkal (10) <sup>z</sup> , Cholul (8), Chicxulub Pueblo (8), Dzitya (5), Hunucma (6), Hunuctaman (6), Merida (6), Uman (8)
	North-central coastal	Dzidzantun (6)
	East coastal zone	Espita (10)
	Western coastal zone	Halacho (6)
	South central zone	Cuzama (8)
	Southern zone	Catmis (6), Peto (10), Polinkin (6), Tixmehuac (6), Tekax (10)
	Southwestern zone	Timucuy (8), Subincancab (8)
Campeche	Region of Yaxchii	Hopelchen (10)

<sup>z</sup>Numbers between parentheses represent the number of plants collected by locality. / <sup>z</sup>Los números entre paréntesis representan el número de plantas recolectadas por localidad.



**Figure 1. Map indicating the locations in the YPM, where symptomatic plants were collected for this study. Symbols represent the locations where the symptomatic plants were collected.**

**Figura 1. Mapa que indica las ubicaciones de la YPM en donde se recolectaron plantas sintomáticas para este estudio. Los símbolos representan los lugares donde se recolectaron las plantas sintomáticas.**

infestation seasons (February-May and July to the beginning of October of 2017). The samples were stored -20 °C in the molecular virology laboratory of CICY, to serve as a source of viral DNA. Total genomic DNA from the leaves of pepper and weed plants was extracted according to the methods of Dellaporta *et al.* (1983) and Echevarria-Machado *et al.* (2005), respectively. Leaf samples were cleaned with sterile water before the DNA extraction in order to eliminate the possible contamination of whiteflies.

### **Polymerase chain reaction (PCR) amplification, cloning, sequencing, and sequence analysis**

The primer pair prAV324/AC889 was used for PCR amplification of the begomovirus diagnostic ~576 bp core coat protein (core *Cp*) gene fragment (Brown *et al.*, 2005), following the protocol recommended by the authors. Positive virus-specific PCR products of ~576 bp were purified with a QIAEX II kit (QIAGEN) and cloned into pGEM T-Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. The nucleotide sequences were determined with an ABI 377 sequencer (Davis Sequencing Co., CA, USA). Most clones were sequenced in forward and reverse directions. To enhance the possibility of detecting multiple begomovirus genotypes due to mixed infections in field samples, three to five PCR products were cloned and their nucleotide sequences analyzed. The nucleotide sequences (120) from randomly selected cloned samples (52) were edited manually to remove degeneracy imposed by the primers (EditSeq, DNASTAR version 5.08, Madison, WI, USA), resulting in a 533 nt sequence of the core *Cp*, and partial identification of *Begomovirus* species was done by comparing with sequences available in the NCBI-GenBank database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) by BLASTn (Altschul *et al.*, 1997).

muestras se almacenaron a -20 °C en el laboratorio de virología molecular del CICY para utilizarlas como fuente del ADN viral. El ADN genómico total de las hojas de plantas de chile y de maleza se extrajo de acuerdo con los métodos de Dellaporta *et al.* (1983) y Echevarría-Machado *et al.* (2005), respectivamente. Las muestras de hojas se limpiaron con agua destilada estéril antes de la extracción de ADN para eliminar una posible contaminación por mosquita blanca.

### **Amplificación, clonación, secuenciación y análisis de secuencias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Se utilizó el par de cebadores prAV324/AC889 para la amplificación por PCR del fragmento genómico de la región central del gen de la proteína de la capsida viral (core *Cp*) de ~576 pb para el diagnóstico de los begomovirus (Brown *et al.*, 2005), siguiendo el protocolo recomendado por los autores. Los productos de PCR específicos de begomovirus de ~576 pb se purificaron con un kit QIAEX II (QIAGEN) y se clonaron en el vector pGEM T-Easy (Promega, Madison, WI, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las secuencias de nucleótidos se determinaron con un secuenciador ABI 377 (Davis Sequencing Co., CA, EE. UU.). La mayoría de las clonas se secuenciaron en dirección directa e inversa. Para aumentar la probabilidad de detectar múltiples especies de begomovirus en muestras de campo con infecciones mixtas, se clonaron de tres a cinco productos de PCR y se analizaron sus secuencias de nucleótidos. Las secuencias de nucleótidos (120) de muestras clonadas seleccionadas al azar (52) se editaron manualmente para reducir la degeneración en los cebadores (EditSeq, DNASTAR versión 5.08, Madison, WI, EE. UU.), lo que resultó en una secuencia de 533 nt del core *Cp*. La identificación parcial de especies

### Sequence data analysis

For genetic and phylogenetic analysis, data of 25 selected core *Cp* partial begomoviruses sequences identified in the present study were used, 23 of which were isolated from species and landraces of *Capsicum* and two from different weed species. In addition, 36 reference standard sequences were obtained by cropping the core *Cp* of the full-length begomoviral genome from the GenBank database (Table 2), and included in the phylogenetic analysis. Multiple sequence alignment of the taxa was prepared with the CLUSTAL W in MegAlign (DNASTAR version 5.08, Madison, WI). Genetic distance matrix, diversity and pattern of nucleotide substitutions

de los Begomovirus se realizó mediante la comparación con secuencias disponibles en la base de datos NCBI-GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) por BLASTn (Altschul *et al.*, 1997).

### Análisis de datos de las secuencias

Los análisis genéticos y filogenéticos se realizaron sobre los datos de 25 secuencias parciales del core *Cp* de begomovirus identificadas en el presente estudio, 23 de las cuales se aislaron de especies y variedades locales de *Capsicum* y de dos diferentes especies de maleza. Además, se obtuvieron 36 secuencias de referencia estándar, editando el core *Cp* del genoma begomoviral completo de secuencias obtenidas de la base de datos GenBank (Tabla 2).

**Table 2. Geminivirus used in the nucleotide alignment and phylogenetic analyses and the respective virus acronym and GenBank accession number.**

**Cuadro 2. Geminivirus utilizado en el alineamiento de nucleótidos y análisis filogenéticos, con el respectivo acrónimo del virus y número acesión de GenBank.**

Geminivirus	Acronym	GB Acc No
<i>African cassava mosaic virus</i> -[Nigeria]	ACMV-[NG]	X17095
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	X15983
<i>Bean calico mosaic virus</i>	BCaMV	AF11018
<i>Bean golden mosaic virus</i> -[Brazil]	BGMV-[BR]	M88686
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i> -[Mexico]	BGYMV-[MX]	AF17355
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i> -[Guatemala]	BGYMV-[GT]	M91604
<i>Cabbage leaf curl virus</i>	CaLCuV	U65529
<i>Chino del tomate virus</i>	CdTV	AF22666
<i>Corchorus yellow vein virus</i>	CYVV-[Hoa]	AY72790
<i>Cotton leaf curl Gezira virus</i>	CLCuGV	AY03600
<i>Cucurbit leaf crumple virus</i> -[Arizona]	CuLCrV-[Ari]	AF25620
<i>Euphorbia mosaic virus</i> -[Yucatan Peninsula]	EuMV-[YP]	DQ31893
<i>Euphorbia mosaic virus</i> <sup>z</sup>	H6-EuM-YP ( <i>C. chinense</i> cv. Habanero) <sup>z</sup>	EU15585
<i>Maize streak virus</i>	MSV-CP	NC00134
<i>Melon chlorotic leaf curl virus</i> -[Guatemala]	MCLCuV-[GT]	AF32549
<i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Chiapas]	PepGMV-[Chi]	AF07702
<i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Costa Rica]	PepGMV-[CR]	AF14922
<i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Distorter]	PepGMV-[D]	AY92851
<i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Mo]	PepGMV-[Mo]	AY92851
<i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Serrano]	PepGMV-[Ser]	AY92851
<i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Tamaulipas]	PepGMV-[Tam]	U57457
<i>Pepper golden mosaic virus</i> -[Nicaragua]	PepGMV-[Ni]	AJ842140



**Table 2. Continue.**  
**Cuadro 2. Continúa.**

Geminivirus	Acronym	GB Acc No
	1-3-PepGMV ( <i>D. sexangularis</i> ) <sup>z</sup>	EU155830
	3-PepGMV ( <i>C. annuum</i> cv Sweet pepper) <sup>z</sup>	EU155831
	43-PepGMV ( <i>C. annuum</i> ) <sup>z</sup>	EU155834
	45-PepGMV <i>C.annuum</i> cv Cubano) <sup>z</sup>	EU155835
	120-PepGMV ( <i>C. chinense</i> cv Habanero) <sup>z</sup>	EU155836
	122-PepGMV ( <i>C. chinense</i> cv Habanero) <sup>z</sup>	EU155838
	138-PepGMV( <i>C. annuum</i> cv Sweet pepper) <sup>z</sup>	EU155839
	144-PepGMV ( <i>C. annuum</i> cv Xkatic) <sup>z</sup>	EU155841
<i>Pepper golden mosaic virus</i> <sup>z</sup>	151-PepGMV ( <i>C. annuum</i> cv Sweet pepper) <sup>z</sup>	EU155843
	164-PepGMV ( <i>C. annuum</i> cv Xkatic) <sup>z</sup>	EU155844
	240-2-PepGMV ( <i>C. annuum</i> cv Maax) <sup>z</sup>	EU155846
	250-2-PepGMV ( <i>H. crispa</i> ) <sup>z</sup>	EU155847
	R3-PepGMV ( <i>C. annuum</i> ) <sup>z</sup>	EU155853
	R6-PepGMV ( <i>C. frutescens</i> ) <sup>z</sup>	EU155854
	R10-PepGMV ( <i>C. chinense</i> cv Habanero) <sup>z</sup>	EU155855
	R13-PepGMV <i>C. chinense</i> cv Scotch bonnet <sup>z</sup>	EU155856
	R15-PepGMV ( <i>C. annuum</i> cv Maax) <sup>z</sup>	EU155858
	R16-PepGMV ( <i>C. chinense</i> cv Habanero) <sup>z</sup>	EU155859
	R12-PepGMV ( <i>C. annuum</i> cv Maax) <sup>z</sup>	
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i>	PHYVV	X70418
	40-PHYVV ( <i>C. annuum</i> ) <sup>z</sup>	EU155833
<i>Pepper huasteco yellow vein virus</i> <sup>z</sup>	120- PHYVV ( <i>C. chinense</i> cv Habanero) <sup>z</sup>	EU155837
	183- PHYVV ( <i>C. chinense</i> cv Habanero) <sup>z</sup>	EU155845
<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i>	RhGMV	AF239671
<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i> -[Chiapas]	RhGMV-[Chi]	AF408199
<i>Sida golden mosaic Costa Rica virus</i>	SiGMCRV	X99550
<i>Sida golden mosaic virus</i> -[Florida]	SiGMV-[Flo]	AF049336
<i>Sida golden mosaic Honduras virus</i>	SiGMHV	Y11097
<i>Squash leaf curl virus</i>	SLCV	M38183
<i>Tomato golden mosaic virus</i> -Yellow vein	TGMV-YV	K02029
<i>Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus</i>	TMYLCAV	AY927277
<i>Tomato mottle virus</i> -[Florida]	ToMoV-[Flo]	L14460
<i>Tomato severe leaf curl virus</i> -[Guatemala]	ToSLCV-[GT]	AF130415
<i>Tomato severe leaf curl virus</i> <sup>z</sup>	144- <i>Tomato severe leaf curl virus</i> Gu <sup>z</sup>	EU155842
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -Mild	TYLCV-Mld	X76319
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> -[Dominican Republic]	TYLCV-[DR]	AF024715
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> <sup>z</sup>	138-TYLCV DR ( <i>C. annuum</i> cv Sweet pepper) <sup>z</sup>	EU155840

<sup>z</sup>Begomovirus clones isolated from plants collected in the states of Campeche and Yucatan. / <sup>z</sup>Clonas de begomovirus aislados de plantas recolectadas en los estados de Campeche y Yucatán.

(total, synonymous and non-synonymous) analyses were complete with 23 PepGMV *CP* selected nucleotide sequences (Table 2). Selected PepGMV sequences included three samples of each *Capsicum* species and one sequence of each weed plant; the *CP* genomic region (CPR) comprised position 147-

Estas secuencias se incluyeron en el análisis filogenético. La alineación de secuencias múltiples de los taxones se realizó con CLUSTALW en MegAlign (DNASTAR versión 5.08, Madison, WI). El análisis de la matriz de distancia genética, la diversidad y el patrón de sustituciones de nucleótidos (total,

679 according to GenBank sequence AF077025. Molecular evolutionary testing was conducted using the Kimura 2-parameter and Kumar methods, Bootstrap analysis with 1000 replicates, with MEGA version 11 (Tamura *et al.*, 2021). Codon-based Z-test analysis averaging over all sequence pairs was performed to test for the selective force operating on *CP* sequences, using the Kumar method in MEGA 11. All positions containing gaps and missing data were eliminated (complete deletion option). There were a total of 177 positions in the final dataset. To reconstruct a phylogenetic tree, multiple aligned sequences were analysed by multiple parsimony using MEGA 11 with 1000 iterations per search. The strict consensus tree was constructed using the standard settings of MEGA 11, and statistical support for each major clade was calculated using Bootstrap with 1000 iterations per search. The tree was rooted using the *CP* sequence edited from the core *CP* sequence of the *Maize streak virus* (MSV-CP) of the genus *Mastrevirus*, family Geminiviridae (Table 2).

## RESULTS

### Search for viral symptoms in cultivated and field plants

In a disease survey during high whitefly infestation seasons at locations of the YS and CS (Figure 1), virus-like symptoms were collected on diverse cultivated and non-cultivated pepper and weed plants. All of sampled cultivated pepper plants, namely *C. chinense*, *C. a.* var. *annuum*, landrace Dulce, X'kat iik and Ya'ax iik, *C. frutescens*, and wild grown *C. a.* var. *aviculare* Maax iik, showed symptoms of golden mosaics, distorted leaves and stunting growth. Symptoms, clearly distinguished in *C. frutescens*, were often moderately perceived

sinónima y no sinónima) se realizó con 23 secuencias de nucleótidos del core *Cp* del PepGMV (Cuadro 2). Las secuencias del PepGMV seleccionadas incluyeron tres muestras de cada especie de *Capsicum* y una secuencia de cada maleza. La región genómica del core *Cp* (*CPR*) corresponde a la región del gen en las posiciones 147-679, de acuerdo a la secuencia del GenBank AF077025. Las pruebas evolutivas moleculares se realizaron utilizando los métodos de 2 parámetros de Kimura y Kumar. El análisis Bootstrap con 1000 repeticiones se realizó utilizando el software MEGA versión 11 (Tamura *et al.*, 2021). Se realizó una prueba Z basada en codones, promediando secuencias generales, para probar la fuerza selectiva que opera en secuencias del core *Cp*, utilizando el método Kumar en MEGA 11. Se eliminaron todas las posiciones que contenían espacios y datos faltantes (opción de eliminación completa). Hubo un total de 177 posiciones en el conjunto de datos final. Para reconstruir el árbol filogenético, se analizaron múltiples secuencias alineadas por parsimonia múltiple usando MEGA 11, con 1000 iteraciones por réplica. El árbol de consenso estricto se construyó usando la configuración estándar de MEGA 11. El soporte estadístico para cada clado principal se calculó usando Bootstrap con 1000 iteraciones por réplica. El árbol se enraizó usando la secuencia del core *Cp* editada del *virus del rayado del maíz* (MSV-CP) del género *Mastrevirus*, familia Geminiviridae (Tabla 2).

## RESULTADOS

### Búsqueda de síntomas virales en plantas cultivadas y de campo.

En un estudio de la enfermedad durante temporadas de alta infestación de mosquita blanca, en localidades de YS y CS (Figura 1), se encontraron plantas de chile de diferentes especies y maleza con

in one or two branches of Maax iik, rarely affecting the whole plant (Figure 2A). On the other hand, landrace X'kat iik (Figure 2B), Chile Dulce (Figure 2C and D) and Habanero chili (Figure 2E and F) plants showed noticeable foliar symptoms of varied severity, including yellowing with downward curly leaves, golden mosaics, and stunting growth. Comparable symptoms were recorded for weed

síntomas similares a los causados por virus. Todas las plantas de chile cultivadas colectadas, como *C. chinense*, *C. a.* var *annuum*, variedad local Dulce, X'kat iik y Ya'ax iik, *C. frutescens* y la especie silvestre *C. annum* var. *aviculare* Maax iik, mostraron síntomas como mosaicos dorados, deformación en las hojas y retraso en el crecimiento. En *C. frutescens* los síntomas se observaban claramente,



**Figure 2.** Symptoms observed in wild-grown (A) and cultivated (B, C, D, E and F) plants sampled at Catmis (A), Muna (B), Merida (C), Cuzama (D), and Tekax (E and F) infected with Begomovirus (PCR+). (A) *Capsicum annum* var. *aviculare* (Maax iik) plant showing branches with golden mosaic and distorted leaves, and stunting growth; (B) *C. annum* var. *annuum* (X'kat iik) with severe golden mosaic, and distorted leaves; (C and D) *C. annum* var. *annuum* (Chile Dulce) with severe golden mosaics, distorted leaves, and stunting growth; (E and F) *C. chinense* (Habanero type) with golden mosaics, and with downward curly leaves and severe stunting growth.

**Figura 2.** Síntomas observados en plantas silvestres (A) y cultivadas (B, C, D, E y F) muestreadas en Catmis (A), Muna (B), Mérida (C), Cuzama (D) y Tekax (E y F) infectadas con Begomovirus (PCR+). (A) *Capsicum annum* var. *aviculare* (Maax iik) que muestra ramas con mosaicos dorados, hojas distorsionadas y crecimiento atrofiado; (B) *C. annum* var. *annuum* (X'kat iik) con mosaico dorado severo y hojas distorsionadas; (C y D) *C. annum* var. *annuum* (Chile Dulce) con mosaicos dorados severos, hojas distorsionadas y crecimiento atrofiado; (E y F) *C. chinense* (tipo Habanero) con mosaicos dorados, hojas rizadas hacia abajo y crecimiento gravemente atrofiado.

species (images not shown). Nevertheless, in the majority of cases, chili plants showing small curled leaves were stunted and bushy in appearance because of reduced length internodes (Figure 2D).

### Begomoviruses preliminary identification

Of the total collected plant samples (151), including 146 peppers and 5 weeds, 90.1% were PCR positive using the core *CP* primer (Table 3). That is, 89.7% of the peppers (131), including plant samples of all the pepper species and all the weed (5) plant samples were positive to begomoviruses. Sequencing of amplicons, on average two to three per sample of plants (52), uncovered the likely incidence of single and mixed begomovirus infections. Of these, virus species determined in 120 sequenced clones were

mientras que en el chile Maax iik, a menudo aparecían moderadamente presentes en una o dos ramas y rara vez afectaban a toda la planta (Figura 2A). Las variedades locales X'kat iik (Figura 2B), Chile Dulce (Figura 2C y D) y Chile Habanero (Figura 2E y F) mostraron síntomas foliares notables de diversa gravedad, que incluyen amarillamiento, hojas rizadas hacia abajo, mosaicos dorados y retraso en el crecimiento. Se observaron síntomas comparables en especies de maleza (imágenes no mostradas). En la mayoría de los casos, las plantas de chile mostraron hojas pequeñas y rizadas y tenían un aspecto atrofiado y tupido, debido a la longitud reducida de los entrenudos (Figura 2D).

### Identificación preliminar de Begomovirus

Del total de muestras de plantas colectadas (151), incluyendo 146 chiles y cinco plantas de

**Table 3. Provisional sequence identification of Begomovirus (identity >89% nt) found in samples of cultivated\*, semi-cultivated<sup>‡</sup>, wild † grown pepper plants and weed (w) plants collected in the state of Yucatan. Viruses revealed by PCR with universal primers for the core *Cp*. Number of +PCR positives clones over total sampled plants per species and/or landrace type. In parenthesis number of positive sequenced clones, underlined are the possible mixed virus infections found.**

**Cuadro 3. Identificación provisional de Begomovirus (identidad >89% nt) basado en secuencias parciales, encontrada en muestras de plantas de chile cultivadas\*, semicultivadas<sup>‡</sup>, silvestres† y plantas de maleza (w) recolectadas en el estado de Yucatán y Campeche. Virus amplificados por PCR con cebadores universales para core *Cp*. Número de clonas positivas +PCR sobre el total de plantas muestreadas por especie y/o tipo de raza local. Entre paréntesis, el número de clonas secuenciadas positivas. Las posibles infecciones virales mixtas aparecen subrayadas.**

Host species	No. +PCR / total samples	Virus species identity >89% nt (No. of sequenced clones to core Cp)
<i>Capsicum chinense</i> (habanero) <sup>‡</sup>	53/57	(35) PepGMV, (6) PHYVV, (2) ToSLCV, (4) EuMV-YP, <u>1PepGMV:1PHYVV</u>
<i>C. annuum</i> var. <i>Annuum</i> (dulce)*	16/18	(12) PepGMV, (3) ToSLCV, <u>1PepGMV:1TYLCV</u> .
<i>C. a. var. Annuum</i> (X'kat iik)*	11/12	(9) PepGMV, <u>1PepGMV:1ToSLCV</u> .
<i>C. a. var. Annuum</i> (Ya'ax iik) <sup>‡</sup>	8/8	(7) PepGMV
<i>C. frutescens</i> (Pico de paloma) <sup>‡</sup>	6/8	(5) PepGMV
<i>C. a. var. aviculare</i> (Maax iik) <sup>†</sup>	37/43	(18) PepGMV
<i>Callicarpa</i> spp (w)	1/1	(3) PepGMV
<i>Croton malvaviscifolius</i> (w)	1/1	(3) PepGMV
<i>Nicotiana tabacum</i> (w)	1/1	(3) PepGMV
<i>Dicliptera sexangularis</i> (w)	1/1	(2) PepGMV
<i>Herissantia crispa</i> (w)	1/1	(2) PepGMV

provisionally identified based on the comparison of nucleotide identity (>89% nt) with viral core CP sequences of well-studied begomoviruses (Table 3). Single infections with *Pepper golden mosaic virus* PepGMV predominated, representing 82.5% of the sequenced clones (99) detected in materials of the different *Capsicum* species and in the weed species *Callicarpa* spp., *C. malvaviscifolius*, *D. sexangularis*, *H. crispa*, and *N. tabacum* (Table 3). This was followed by *Pepper huasteco yellow vein virus* PHYVV (5 %) found in two *C. chinense* plants, one clone isolated from Habanero and the other from Scotch Bonnet type, plus the *Tomato severe leaf curl virus* ToSLCV (4.2%) found in the Habanero and Dulce plants. Interestingly, four sequenced clones (3.3%) from a single Habanero chili plant (sample H6 EuMV-YP[*C. chinense* H]) displayed high identity (98-99%) to the *Euphorbia mosaic virus*-[Yucatan Peninsula] EuMV-YP isolate described from *Euphorbia heterophylla* (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b). Possible mixed infections were confirmed by bi-directionally searching of three to five clones of each partial begomoviral species isolated from each plant. These included a mixture of PepGMV-PHYVV in the Habanero chili (sample 120, *C. chinense* H), the PepGMV-TYLCV in the Dulce pepper (sample 138, *C. annum* D) and the PepGMV-ToSLCV in a X'kat iik plant (sample 144, *C. annum*, Table 3).

#### **Genetic variation of PepGMV isolates based on nucleotide distance analysis from partial DNA-A begomovirus sequences**

Genetic distance analysis based on pairwise analysis of 23 chosen core CP nucleotide sequences (Table 4) indicated that PepGMV isolates were closely related strains sharing from 95 to 99% nucleotide sequence identity; percentage nt identity was calculated as  $[1 - \text{genetic distance}] \times 100$

maleza, el 90.1% fueron PCR positivas con los cebadores que amplifican el core Cp (Cuadro 3). Es decir, el 89.7% de los chiles (131), incluyendo las muestras de plantas de todas las especies de chile y todas las muestras de maleza (5), fueron positivas para begomovirus. La secuenciación de los amplicones, en promedio de dos a tres por muestra de planta (52), reveló la probable incidencia de infecciones simples y mixtas de begomovirus. Las especies de virus detectadas en 120 clonas secuenciadas se identificaron provisionalmente en base a comparaciones de identidad de nucleótidos (> 89% nt) con secuencias del core Cp viral de begomovirus reportados previamente (Cuadro 3). Las infecciones simples con el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) fueron las más frecuentes, representando el 82.5% de las clonas secuenciadas (99), detectados en hojas de las diferentes especies de *Capsicum* y en las especies de maleza *Callicarpa* spp., *C. malvaviscifolius*, *D. sexangularis*, *H. crispa* y *N. tabacum* (Cuadro 3). Le siguió el virus de la vena amarilla del pimiento huasteco (PHYVV) (5%), que se encontró en dos plantas de *C. chinense*, una clona aislada de Habanero y el otro de tipo Scotch Bonnet. Además, se encontró el virus del enrollamiento severo de la hoja del tomate (ToSLCV) (4.2%) en plantas de Habanero y Dulce. Curiosamente, cuatro clonas secuenciadas (3.3%) de una sola planta de chile habanero (muestra H6 EuMV-YP[*C. chinense* H]) mostraron una alta identidad (98-99%) con el virus del mosaico de Euphorbia-[Península de Yucatán] EuMV-YP aislado en *Euphorbia heterophylla* (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b). Las posibles infecciones mixtas se confirmaron realizando una búsqueda bidireccional de la secuencia parcial de tres a cinco clonas de cada especie begomoviral aislada en cada planta. Estas incluyeron una mezcla del PepGMV-PHYVV en chile Habanero (muestra 120, *C. chinense* H), PepGMV-TYLCV en chile Dulce

(Brown *et al.*, 2005). The average nt distance of CPR estimated for the number of base substitutions per site over all 23 sequence pairs was equal to 0.027 ( $\pm 0.004$  SE), with a calculated transitional to transversal distance per site ratio (R) equal to 0.641 ( $\pm 0.21$  SE). In general, the estimated average codon-based divergence of all sequence pairs showed a low value of nonsynonymous (dN) substitutions to synonymous (dS) substitutions,  $dN = 0.003 < dS = 0.130$ , and a low  $dN / dS$  ratio of 0.023 (Table 4), respectively.

### Phylogenetic analysis based on partial DNA-A begomovirus sequences

The phylogenetic analysis examined the probable relationship between begomovirus-infected pepper and those of weed species collected in the YS and CS relative to their corresponding sequences from a database (Gen-Bank). The analysis incorporated the nt sequences of the Coat protein gene (*CP*) core region from 61 taxa. The matrix was constructed with 23 nt sequences isolated from *Capsicum* spp., two from plants grown as weeds (Table 3), and 36 from Gen-Bank sequences (Table 2). The evolutionary history was inferred using the Maximum Parsimony method. The most parsimonious tree with length = 3191 was shown (Figure 3). The consistency index is 0.376378 (0.309704), the retention index is 0.634911 (0.634911) and the composite index is 0.238966 (0.196634) for all sites and parsimony-informative sites (in parentheses). The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) were shown next to the branches. The MP tree was obtained using the Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) algorithm with search level 1 in which the initial trees were obtained by the random addition of sequences (10 replicates). There were a total

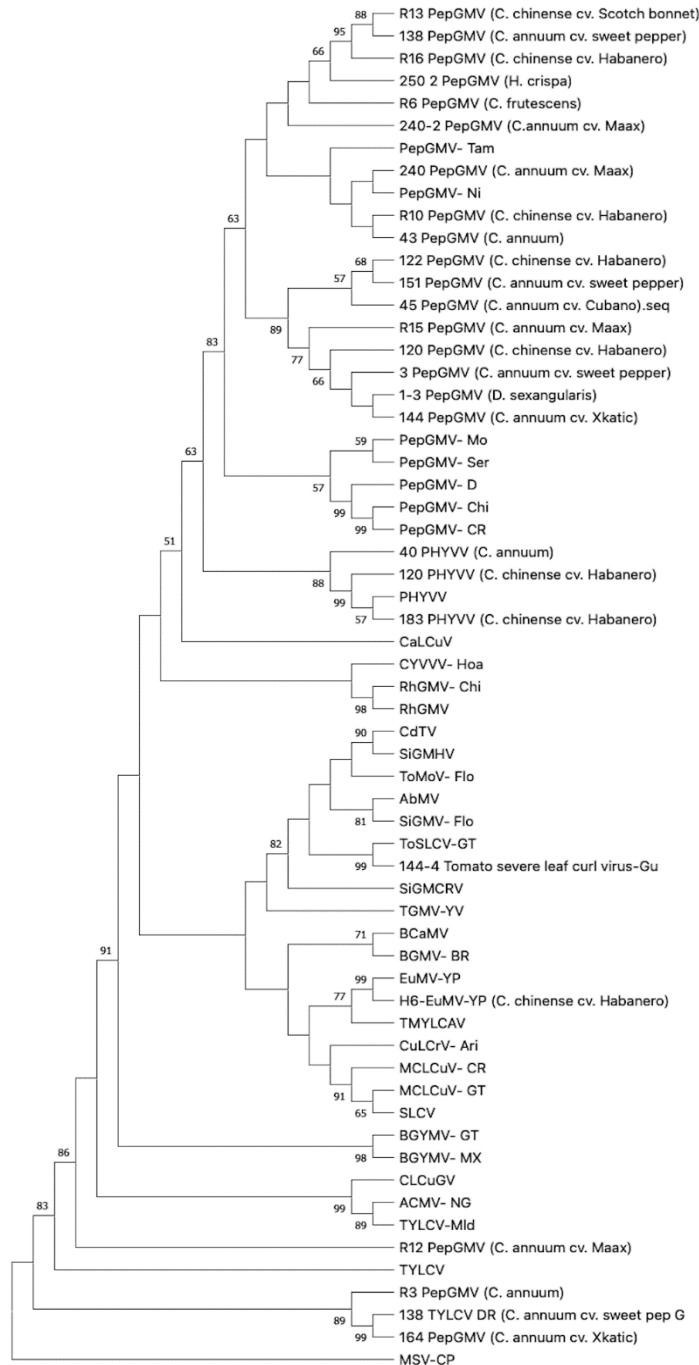
(muestra 138, *C. annuum* D) y PepGMV-ToSLCV en una planta X'kat iik (muestra 144, *C. annuum*, Cuadro 3).

### Variación genética de aislados del PepGMV basada en análisis de distancia de nucleótidos a partir de secuencias parciales del ADN-A de begomovirus

El análisis de distancia genética basado en el análisis por parejas de 23 secuencias de nucleótidos del core *Cp* seleccionadas (Cuadro 4), indicó que los aislados del PepGMV son cepas estrechamente relacionadas, que compartían entre 95 y 99% de identidad de secuencia de nucleótidos. El porcentaje de identidad de nt se calculó como  $[1 - \text{distancia genética}] \times 100$  (Brown *et al.*, 2005). La distancia promedio de nt del CPR estimada para el número de sustituciones de bases por sitio en los 23 pares de secuencias fue igual a 0.027 ( $\pm 0.004$  SE), con una distancia de transición a transversión calculada por proporción de sitio (R) igual a 0.641 ( $\pm 0.21$  SE). En general, la divergencia promedio estimada basada en codones de todos los pares de secuencias mostró un valor bajo de sustituciones no sinónimas (dN) a sustituciones sinónimas (dS) ( $dN = 0.003 < dS = 0.130$ ) y una proporción  $dN/dS$  baja de 0.023 (Cuadro 4).

### Análisis filogenético basado en secuencias parciales del ADN-A de begomovirus

El análisis filogenético analizó la relación probable entre los begomovirus encontrados que infectan chiles y aquellos que infectan especies de maleza colectadas en YS y CS, según sus secuencias correspondientes en el GenBank. El análisis incorporó las secuencias de nt de la región central del gen de la proteína de la capsida (core *Cp*) de 61 taxones. La matriz se construyó con secuencias



**Figure 3.** Cp sequence-inferred phylogenetic relationships of begomoviruses identified in field-grown and cultivated pepper plants from Yucatan and Campeche, Mexico; the analysis also includes the Cp sequence of selected, well-studied begomoviruses which are available in GenBank. Presented is the single most parsimonious tree; numbers placed at nodes represent Bootstrap values over than 50%, lower values are not shown (1000 iterations).

**Figura 3.** Relaciones filogenéticas inferidas por la secuencia parcial del core *Cp* de begomovirus identificados en plantas de chile cultivadas y silvestres provenientes de Yucatán y Campeche, México. El análisis también incluye la secuencia del core *Cp* de begomovirus seleccionados y bien estudiados que están disponibles en el GenBank. La figura muestra el árbol más parsimonioso. Los números colocados en los nodos representan valores de Bootstrap superiores al 50%. Los valores más bajos no se muestran (1000 iteraciones).

of 566 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA11. The cluster of Eastern Hemisphere begomoviruses with a 99% Bootstrap supported value includes the *Tomato yellow leaf curl virus*, of which clone 138-TYLCV-[*C. annuum* D], isolated from a single plant with a likely mix infection (Table 3, Figure 3), showed high identity (99%) to the Dominican Republic isolate of TYLCV. Interestingly, a divergent clade containing three clones of PepGMV isolates from different *C. annuum* cultivars was observed close to the MSV-CP, the *Mastrevirus* that was selected as root of the phylogenetic tree, with 89% Bootstrap supported value. The Western Hemisphere cluster divides into two subclades (63% support node). One group holds the *Tomato severe leaf curl virus* clone 144-ToSLCV-[*C.annuum* X)], isolated from a X'kaat ik plant with a probable mixed infection (Table 3, Figure 3). This is related to the ToSLCV-[GT] reference isolate (82% Bootstrap), shares common nodes with other begomoviruses, and is grouped with species of *Sida golden mosaic virus* (SiGMV), *Tomato mottle virus* (ToMoV), *Chino del tomate virus* (CdTV), and *Abutilon mosaic virus* (AbMV). The second group, with two branches, contains the pepper isolate of the *Euphorbia mosaic virus* isolate, H6 EuMV-YP (*C. chinense* H) with its sister species, the EuMV-YP reference isolate (99% Bootstrap) and the *Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* (TMYLCAV), a relation supported by a 77% value (Figure 3). The former groups are assembled with a begomovirus species that received no Bootstrap support, including the SLCV clade. The other relationships inferred for the collections with no Bootstrap support are subdivided into two subclades. One subclade comprising the *Pepper huasteco yellow vein virus* (PHYVV) cluster is grouped with three isolates from *C. chinense*, clones 120 and 183 of PHYVV-from Habanero and the 40-PHYVV isolate from the

de 23 nt aisladas de *Capsicum* spp., dos de maleza (Cuadro 3) y 36 de secuencias publicadas en el GenBank (Cuadro 2). La historia evolutiva se infirió utilizando el método de Máxima Parsimonia. La Figura 3 muestra el árbol más parsimonioso, con una longitud =3191. El índice de consistencia es 0.376378 (0.309704), el índice de retención es 0.634911 (0.634911) y el índice compuesto es 0.238966 (0.196634) para todos los sitios y sitios informativos de parsimonia (entre paréntesis). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados se agruparon por Bootstrap (1000 repeticiones) se muestra junto a las ramas. El árbol MP se generó utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) (nivel de búsqueda 1). Los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones). Hubo un total de 566 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA11. El grupo de begomovirus del hemisferio oriental con un valor de Bootstrap del 99% incluye el virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*), del cual la clona 138-TYLCV-[*C. annuum* D], aislado de una planta con una probable infección mixta (Cuadro 3, Figura 3), mostró una alta identidad (99%), con el aislado de TYLCV de la República Dominicana. Curiosamente, se observó un clado divergente que contenía tres clones de aislados del PepGMV de diferentes cultivares de *C. annuum* cerca del MSV-CP, el *Mastrevirus*, que se seleccionó como la raíz del árbol filogenético, con un 89 % del valor de Bootstrap. El grupo del Hemisferio Occidental se divide en dos subclados (63% soporte del nodo). Un grupo incluye el virus del enrollamiento severo de la hoja del tomate (*Tomato severe leaf curl virus*) clon 144-ToSLCV-[*C. annuum* X)], aislado de una planta X'kaat ik con una probable infección mixta (Cuadro 3, Figura 3). Este grupo está asociado con el aislado de referencia ToSLCV-[GT] (82%



Maax iik plant, with 88 to 99 % Bootstrap values. The second subclade is composed of collections of the *Pepper golden mosaic virus* PepGMV from the most of the pepper and weed isolates set with well-known begomovirus reference isolates forming a major PepGMV clade supported by Bootstrap (83%). This PepGMV clade visibly split into three subclades (Bootstrap 89%) (Figure 3). Two clones of PepGMV, R3 and 164 were grouped in a separate clade with TYLCV-DR, with 89% of Bootstrap support. A future analysis with the complete sequence of the A Component of both clones should be necessary, in order to corroborate this phylogenetic relationship.

## DISCUSSION

Plant viruses have enormous potential for genetic variation and rapid evolution; although mutation, reassortment, and recombination are known as mechanisms that generate variation, less is known about the selection pressures that operate and drive their evolution (Font *et al.*, 2007; Garcia-Arenal *et al.*, 2003; Seal *et al.*, 2006). Evidence is provided here that YPM infections by members of the genus *Begomovirus* are common in cultivated peppers, as well as non-cultivated weed plants. Nearly all plants in fields with cultivated peppers, landrace Dulce, X'kat ikk, Ya'ax ikk, Pico de Paloma, and Habanero chili analyzed during this work showed severe symptoms. In fact, most of the collected tested samples (90%) were PCR begomovirus-positive (PCR-BG-+), in which the conserved core Coat Protein region of the *AVI* gene was used for the provisional identification of begomoviruses. This partial sequence provides provisional virus identification, while for definite classification, complete DNA-A and DNA-B particle sequences are required (Brown *et al.*, 2001; Fauquet *et al.*, 2003). Actually, Central America,

de Bootstrap), comparte nodos comunes con otros begomovirus y se agrupa con especies del virus del mosaico dorado de Sida (*Sida golden mosaic virus* -SiGMV), el virus del moteado del tomate (*Tomato mottle virus* -ToMoV), el virus del Chino del tomate (*Chino del tomate virus* - CdTV) y el virus del mosaico de Abutilon (*Abutilon mosaic virus* - AbMV). El segundo grupo, con dos ramas, incluye una clona del virus del mosaico de Euphorbia (*Euphorbia mosaic virus*), H6 EuMV-YP (*C. chinense* H), aislado de Chile, con su especie hermana, el aislado de referencia EuMV-YP (99% de Bootstrap) y el virus del encrespado amarillo de la hoja del tomate (*Tomato mild yellow leaf curl Aragua virus* - TMYLCAV), relación sustentada con un valor de Bootstrap del 77% (Figura 3). Los primeros grupos se ensamblan con una especie de begomovirus que no recibió soporte de Bootstrap, incluido el clado SLCV. Las otras relaciones inferidas para las colecciones no tienen soporte de Bootstrap y se subdividen en dos subclados. Un subclado que comprende el cluster del virus huasteco de la vena amarilla de Chile (*Pepper huasteco yellow vein virus* - PHYVV) se agrupa con tres aislados de *C. chinense*, las clonas 120 y 183 de PHYVV- de Habanero y el aislado 40-PHYVV de la planta Maax iik, con 88 a 99 % de valores Bootstrap. El segundo subclado está formado por secuencias del virus del mosaico dorado de Chile (*Pepper golden mosaic virus* - PepGMV) de la mayoría de los aislamientos de Chile y maleza con aislamientos de referencia de begomovirus bien conocidos, formando un clado principal del PepGMV respaldado por Bootstrap (83%). Este clado del PepGMV se dividió visiblemente en tres subclados (Bootstrap 89%) (Figura 3). Dos clonas del PepGMV, R3 y 164, se agruparon en un clado separado con el TYLCV-DR, con un 89% de soporte de Bootstrap. Es necesario un análisis posterior con la secuencia completa del Componente A de ambas clonas para corroborar esta relación filogenética.

México, and Brazil appear to be important Western Hemisphere centers of begomovirus diversity (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019). Actually, more than 440 begomovirus species are reported, and among these a large number are emerging pathogens of pepper, bean (*Phaseolus vulgaris*), cotton (*Gossypium* sp.), cucurbits, okra (*Abelmoschus esculentus*), papaya (*Carica papaya*), tomato (*Solanum lycopersicum*), and weed plants (ICTV, 2022). In a previous study, from 119 symptomatic plants belonging to 16 different species, only 58% of the YPM samples were positive to begomovirus. In these samples, 13 distinct begomovirus species were identified, including the PepGMV isolated from *C. annuum* (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). In contrast, almost 90% of the analyzed samples in this work were positive to PepGMV. In both cases, all the collected plants showed viral symptoms. As reported before, one possibility is that some symptomatic plants collected here were infected with other viruses that produce similar symptom (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). Another report showed that geminivirus infection in tomato, with similar symptoms to those caused by geminivirus was induced by Potyviridae and Tobamoviridae (Polston and Anderson, 1997). It is notable that *C. annuum* var. *aviculare* Maax iik plants examined here did show mild symptoms present in even one branch of the plant and rarely in two. Yet 86% of the collected material of Maax iik was PCR-BG+. Symptom remission or host recovery has been associated with specific resistance of pepper plants to PepGMV, and silencing mechanisms in the recovery process have been suggested (Carrillo-Trip *et al.*, 2007). This is important, as evidence from the literature suggests that the sources of resistance to PHYVV and PepGMV are to be found within wild relatives of *C. annuum* and some

## DISCUSIÓN

Los virus de las plantas tienen un enorme potencial para la variación genética y la rápida evolución. La mutación, el reordenamiento y la recombinación son mecanismos conocidos que generan variación genética, pero se sabe poco sobre las presiones de selección que operan e impulsan su evolución (Font *et al.*, 2007; Garcia-Arenal *et al.*, 2003; Seal *et al.*, 2006). Aquí se proporciona evidencia de que las infecciones en la YPM causadas por miembros del género Begomovirus son comunes en chiles cultivados y plantas de maleza. Casi todas las plantas de Chile cultivadas en campo estudiadas en el presente trabajo, incluidas las variedades locales Dulce, X'kat iik, Ya'ax iik, Pico de Paloma y Chile habanero, mostraron síntomas graves de infección por Begomovirus. De hecho, la mayoría de las muestras recolectadas (90%) fueron positivas para begomovirus por PCR (PCR-BG+). La región central conservada del gen *AVI* de la proteína de la capsida (core *Cp*) se utilizó para la identificación provisional de los begomovirus. Esta secuencia parcial permitió la identificación provisional del virus. Para una clasificación definitiva, se requieren secuencias completas de los componentes ADN-A y ADN-B (Brown *et al.*, 2001; Fauquet *et al.*, 2003). Centroamérica, México y Brasil parecen ser importantes centros de diversidad de begomovirus en el hemisferio occidental (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Fernandes *et al.*, 2006; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a; Rodriguez-Negrete *et al.*, 2019). Se han reportado más de 440 especies de begomovirus, incluyendo un gran número de patógenos emergentes que afectan Chile, frijol (*Phaseolus vulgaris*), algodón (*Gossypium* sp.), cucurbitáceas, okra (*Abelmoschus esculentus*), papaya (*Carica papaya*), tomate (*Solanum lycopersicum*) y maleza (ICTV, 2022). En un estudio anterior, de 119 plantas sintomáticas pertenecientes a 16 especies

accessions of *C. chinense* (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Hernandez-Verdugo *et al.*, 2001).

Based on the *Cp* sequences, the five partially identified species of begomovirus associated with cultivated pepper plants in the YPM are in accordance with those described by other authors (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Godinez-Hernandez *et al.*, 2001; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). The unusual finding of EuMV-YP infecting a Habanero chili plant, reported here, is remarkable given that this viral species commonly lives in the neotropical weed *Euphorbia heterophylla* (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). In Mexico, this virus was reported in the YPM and in Jalisco (Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a). In Cuba, it was reported that the EuMV infects tobacco plants collected in the field (Fiallo-Olive, 2010). Although experimental data have confirmed that *P. vulgaris*, *S. lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*, *C. annuum*, *C. chinense*, *Cnidoscolus chayamansa*, *Jatropha curcas*, *Ricinus comunis*, *Arabidopsis thaliana*, and *Nicotiana tabacum* plants are hosts of EuMV-YP (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007b; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013), additional field studies are needed to establish the extent of host range and distribution of EuMV-YP in Mexico and other countries of Central and South America.

In the present study, PepGMV was the most widespread begomoviral species found to infect cultivated *C. chinense*, *C. annuum* landrace Dulce and X'kat iik, the home-garden grown *C. frutescens*, and wild grown Maax iik, as well as collected weed plants in the YPM. Most weed samples should be analyzed in order to look for PepGMV infection in the YPM. This species has also been reported in Central America, infecting

diferentes, solo el 58% de las muestras de la YPM fueron positivas a begomovirus. En ese estudio, se identificaron 13 especies distintas de begomovirus, incluido el PepGMV aislado de *C. annuum* (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). Por el contrario, casi el 90% de las muestras analizadas en el presente trabajo fueron positivas para PepGMV. En ambos casos, todas las plantas recolectadas presentaron síntomas virales. Como se comentó anteriormente, una posible explicación es que algunas plantas sintomáticas recolectadas en el presente estudio estaban infectadas con otros virus que producen síntomas similares (Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007c). Otro reporte mostró que una infección de tomate con síntomas similares a los causados por geminivirus fue inducida por Potyviridae y Tobamoviridae (Polston y Anderson, 1997). Es notable que las plantas de *C. annuum* var. *s. aviculare* Maax iik examinadas en el presente estudio mostraron síntomas leves en una rama de la planta y rara vez en dos. Sin embargo, el 86% del material recolectado de Maax iik fue PCR-BG+. La remisión de los síntomas o la recuperación del huésped se ha asociado con la resistencia específica de las plantas de Chile al PepGMV y se han sugerido mecanismos de silenciamiento en el proceso de recuperación (Carrillo-Trip *et al.*, 2007). Esto es importante, ya que la evidencia de la literatura sugiere que las fuentes de resistencia a PHYVV y PepGMV se encuentran entre los parientes silvestres de *C. annuum* y algunas accesiones de *C. chinense* (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Hernández-Verdugo *et al.*, 2001).

En base a las secuencias del core *Cp*, las cinco especies de begomovirus parcialmente identificadas asociadas a plantas de Chile cultivadas en la YPM concuerdan con las descritas por otros autores (Anaya-Lopez *et al.*, 2003; Godinez-Hernandez *et al.*, 2001; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007b; Morales-Aguilar *et*

peppers in Costa Rica and Honduras (Lotrakul *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2005), and tomato, pepper, and cucurbits in Nicaragua (Ala-Poikela *et al.*, 2005). In addition, tested samples of Habanero chili showed a single infection with PHYVV and ToSLCV, consistent with other studies reported for other parts of Mexico and Nicaragua (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). Moreover, the finding of an isolate of TYLCV reported here in a possible mixture with PepGMV infecting a single plant of *C. annuum* Dulce is supported by earlier reports of the presence of TYLCV in tomato in Yucatan since 1999 Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999). This strain of TYLCV shares 99% identity with the Dominican Republic strain (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999), a strain that is considered a component of the Eastern North American and Caribbean clade (ENAC) of TYLCV (Duffy and Holmes, 2007). The other possible mixed infections, PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV and PepGMV-ToSLCV, frequently occur in association with only cultivated peppers, such as Habanero chili and *C. annuum* var. *annuum*, landrace Dulce and X'kat ikk, in farming areas where striking whitefly infestations were recorded (Escobedo-García Medrano, unpublished data). It is remarkable that PepGMV and PHYVV mixed infections indeed occur naturally in many horticultural crops in México, where the distribution of the two viruses often overlaps (Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). Symptom expression in PepGMV-PHYVV interactions seems to be host-dependent (Mendez-Lozano *et al.*, 2003). Future research on PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV, and PepGMV-ToSLCV interactions should address the biological significance of each mixture, how their respective genomes interact with the host cell genome during each of these mixed infections, and what is their relationship to the vector biotype involved in their transmission.

*al.*, 2019). El hallazgo inusual del EuMV-YP infectando una planta de chile habanero, reportado aquí, es notable dado que esta especie viral comúnmente infecta la maleza neotropical *Euphorbia heterophylla* (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007a; Hernández-Zepeda *et al.*, 2007c). En México, este virus ha sido reportado en la YPM y en Jalisco (Gregorio-Jorge *et al.*, 2010; Hernandez-Zepeda *et al.*, 2007a). En Cuba se reportó que el EuMV infecta plantas de tabaco recolectadas en el campo (Fiallo-Olive, 2010). Aunque los datos experimentales han confirmado que las plantas *P. vulgaris*, *S. lycopersicum*, *Nicotiana benthamiana*, *C. annuum*, *C. chinense*, *Cnidoscolus chayamansa*, *Jatropha curcas*, *Ricinus communis*, *Arabidopsis thaliana* y *N. tabacum* son hospederos del EuMV-YP (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007b; Villanueva-Alonzo *et al.*, 2013), se requieren estudios de campo adicionales para establecer la extensión del rango de hospederos y la distribución del EuMV-YP en México y otros países de América Central y del Sur.

En el presente estudio, el PepGMV fue la especie de begomovirus más extendida que se encontró infectando a *C. chinense* cultivada, *C. annuum* variedad local Dulce y X'kat iik, a *C. frutescens* cultivada en huertos domésticos y la planta silvestre Maax ikk, así como a la maleza recolectada en la YPM. Se deben analizar más muestras de maleza para establecer la distribución del PepGMV en estas plantas en la YPM. Esta especie de virus también ha sido reportada en América Central, infectando chiles en Costa Rica y Honduras (Lotrakul *et al.*, 2000; Morales *et al.*, 2005), así como plantas de tomate, chile y cucurbitáceas en Nicaragua (Ala-Poikela *et al.*, 2005). Además, las muestras analizadas de chile habanero presentaron una infección simple con el PHYVV y el ToSLCV, en concordancia con los resultados de otros estudios en otras partes de México y Nicaragua (Ala-Poikela *et al.*, 2005; Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-

The results shown here concerning *C. annuum* var. *aviculare*, Maax iik, and the weed, e.g., *D. sexangularis*, and *H. crispa* are relevant because they demonstrate that native hosts could be reservoirs of genetic diversity for PepGMV-associated viruses. This may be important for the understanding of epidemic dynamics and evolution of the viruses under the prevailing conditions in YPM. Support for this comes from this fact: although Maax iik plants showed mild virus symptoms when collected, the majority that tested BG positive by PCR (86.05%) turned out to be infected by the partially identified PepGMV. It is interesting to note that the genetic evidence provided here concerning a low genetic diversity within PepGMV (particularly the low nucleotide substitutions of dN/dS ratio in the CP-core gene region (CPR) analyzed) strongly suggests that a negative selective pressure (dN/dS) is operating on the gene region analyzed. This is comparable to that reported for TYLCV (Font *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONS

In this work, almost 90% of the sampled plants were positive to begomovirus, including the partially identified species of PepGMV, PHYVV, ToSLCV, TYLCV and EuMV-YP. Single infections with PepGMV predominated, representing 82.5% of the sequenced clones. Mixed infection including the PepGMV-PHYVV the PepGMV-TYLCV and the PepGMV-ToSLCV were observed in different plant species. These partial sequences provide provisional virus identification isolates in the YPM, while for definite classification and phylogenetic analyzes, complete DNA-A and DNA-B component sequences will be required.

Aguilar *et al.*, 2019). En el presente estudio, el hallazgo de un aislado de TYLCV en posible combinación con el PepGMV que infecta una planta de *C. annuum* Dulce, está respaldado por reportes anteriores de la presencia de TYLCV en plantas de tomate en Yucatán desde 1999 (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999). Esta cepa de TYLCV comparte un 99% de identidad con la cepa de República Dominicana (Ascencio-Ibañez *et al.*, 1999), una cepa que se considera un componente del clado del este de América del Norte y el Caribe (ENAC) del TYLCV (Duffy y Holmes, 2007). Las otras posibles infecciones mixtas, de PepGMV-PHYVV, de PepGMV-TYLCV y de PepGMV-ToSLCV, se presentaron frecuentemente en asociación solo con chiles cultivados, como el chile habanero y *C. annuum*. Var. *annuum*, variedad local Dulce y X'kat iik, en áreas de cultivo con registros de infestaciones de mosquita blanca (Escobedo-García Medrano, datos no publicados). Es de destacar que las infecciones mixtas con el PepGMV y el PHYVV ocurran naturalmente en muchos cultivos hortícolas en México en donde la distribución de los dos virus a menudo se superpone (Hernandez-Espinal *et al.*, 2018; Morales-Aguilar *et al.*, 2019). La expresión de síntomas en las interacciones de PepGMV-PHYVV parece depender del hospedero (Mendez-Lozano *et al.*, 2003). Las investigaciones futuras sobre las interacciones PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV y PepGMV-ToSLCV deberían abordar la importancia biológica de cada combinación, cómo interactúan sus respectivos genomas con el genoma de la célula hospedera durante cada una de estas infecciones mixtas y cuál es su relación con el biotipo del vector implicado en su transmisión.

Los resultados del presente estudio sobre *C. annuum* var. *aviculare*, Maax iik y maleza (p. ej., *D. sexangularis* y *H. crispa*) son relevantes porque

## ACKNOWLEDGEMENT

We thank Jose Luis Tapia for his help with the plant collections and plant identification, and Celene Espadas for her technical assistance with the map elaboration.

## CITED LITERATURE

- Ala-Poikela M, Svensson E, Rojas A, Horko T, Paulin L, Valkonen JPT and Kvarneden A. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathology* 54: 448-459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2005.01226.x>.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W and Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acid Research* 25: 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Anaya-Lopez JL, Torres-Pacheco I, Gonzalez-Chavira M, Garzon-Tiznado JA and Pons-Hernandez JL. 2003. Resistance to geminivirus mixed infections in mexican wild peppers. *HortScience* 38: 251-255. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.38.2.251>.
- Ascencio-Ibañez JT, Diaz-Plaza R, Mendez-Lozano J, Monsalve-Fonnegra ZI, Argüello-Astorga GR and Rivera-Bustamante RF. 1999. First Report of Tomato yellow leaf curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease* 83: 1178. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1178A>.
- Bosland PW and Votova EJ. 2000. Peppers: Vegetable and spice Capsicums, *Crop Production Science in Horticulture* 12, CABI International UK. <https://doi.org/10.1079/9781845938253.0000>.
- Brown JK, Frohlich D and Rosell R. 1995. The sweetpotato or silverleaf whiteflies: biotypes of *Bemisia tabaci* or a species complex? *Annual Review of Entomology* 40: 511-534. <https://www.annualreviews.org/toc/ento/40/1>.
- Brown JK, Idris AM, Ostrow KM, Goldberg N, French R and Stenger DC. 2005. Genetic and Phenotypic Variation of the *Pepper golden mosaic virus* complex. *Phytopathology* 95: 1217-1224. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1217>.
- Brown JK, Idris AM, Torres-Jerez I, Banks GK and Wyatt D. 2001. The core region of the coat protein gene is highly useful for establishing the provisional identification and classification of begomoviruses. *Archives of Virology* 146: 1581-1598. <https://doi.org/10.1007/s007050170080>.
- Carrillo-Tripp J, Lozoya-Gloria E and Rivera-Bustamante RF. 2007. Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology* 97: 51-59. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0051>.
- Cazares-Sanchez E, Ramirez-Vallejo P, Castillo-Gonzalez F, Soto-Hernandez M, Rodriguez-Gonzalez MT y Chavez-Servia JL. 2005. Capsaicinoides y preferencia de uso en diferentes morfotipos de chile (*Capsicum annuum* L.) del Centro-Oriente de Yucatán. *Agrociencia* 39: 627-638. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30239606.pdf>.

demuestran que los hospederos silvestres podrían ser reservorios de diversidad genética para los virus asociados con el PepGMV. Esto puede ser importante para la comprensión de la dinámica epidemiológica y la evolución de los virus en las condiciones imperantes en la YPM. Esta conclusión está respaldada por este hecho: aunque las plantas de Maax ikk mostraron síntomas leves del virus cuando se recolectaron, la mayoría de las que dieron positivo a BG por PCR (86.05%) resultaron estar infectadas por el PepGMV. Es interesante notar que la evidencia genética mostrada aquí, de una baja diversidad genética dentro del PepGMV (particularmente las bajas sustituciones de nucleótidos de la proporción dN/dS en la región del core *Cp*) sugieren fuertemente que una presión selectiva negativa (dN/dS) está operando en la región del gen analizado. Esto es similar a los resultados que se han reportado para el TYLCV (Font *et al.*, 2007).

## CONCLUSIONES

En el presente trabajo, casi el 90% de las plantas muestreadas fueron positivas a begomovirus, incluidas las especies parcialmente identificadas del PepGMV, el PHYVV, el ToSLCV, el TYLCV y el EuMV-YP. Predominaron las infecciones simples del PepGMV, que representaron el 82.5% de las clonas secuenciadas. Se observaron infecciones mixtas, incluyendo PepGMV-PHYVV, PepGMV-TYLCV y PepGMV-ToSLCV en diferentes especies de plantas. Las secuencias parciales proporcionan la identificación provisional de virus aislados en la YPM. La clasificación definitiva y el análisis filogenético requieren secuencias completas de los componentes ADN-A y ADN-B.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a José Luis Tapia por su ayuda con la recolección e identificación de plantas y a Celene Espadas por su asistencia técnica con la generación de mapas.

- Dellaporta SL, Wood J and Hicks JB. 1983. A Plant DNA Miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reports 1: 19-21. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/BF02712670.pdf>.
- Duffy S and Holmes EC. 2007. Multiple introductions of the Old World Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* into the New World. Applied Environmental Microbiology 73: 7114-7117. <https://doi.org/10.1128/AEM.01150-07>.
- Echevarría-Machado I, Sanchez-Cach LA, Hernandez-Zepeda C, Rivera-Madrid R and Moreno-Valenzuela OA. 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. Molecular Biotechnology 31: 129-136. <https://doi.org/10.1385/MB:31:2:129>.
- Fauquet CM, Bisaro DM, Briddon RW, Brown JK, Harrison BD, Rybicki EP, Stenger DC and Stanley J. 2003. Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of begomovirus species. Archives of Virology 148: 405-421. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0957-5>.
- Fauquet CM and Stanley J. 2005. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. Archives of Virology 150: 2151-2179. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0583-0>.
- Fernandes JJ, Carvalho MG, Andrade EC, Brommonschenkel SH, Fontes EPB and Zerbini FM. 2006. Biological and molecular properties of *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), a new tomato-infecting begomovirus from Brazil. Plant Pathology 55: 513-522. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01395.x>.
- Fiallo-Olive E, Lett JM, Martin D P, Roumagnac P, Varsani A, Murilo-Zerbini F and Navas-Castillo J. 2021. ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae 2021. Journal of General Virology 102: 1-2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001696>.
- Fiallo-Olive E, Rivera-Bustamante RF and Martínez-Zubiaur Y. 2010. First report of tobacco as a natural host of *Euphorbia mosaic virus* in Cuba. Plant Pathology 59: 795. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02238.x>.
- Font MI, Rubio L, Martínez-Culebras PV and Jordá C. 2007. Genetic structure and evolution of natural populations of viruses causing the tomato yellow leaf curl disease in Spain. Virus Research 128: 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2007.04.003>.
- García-Arenal F, Fraile A and Malpica JM. 2003. Variation and evolution of plant virus populations. International Microbiology 6: 225-232. <https://doi.org/10.1007/s10123-003-0142-z>.
- Garrido-Ramírez ER and Gilbertson RL. 1998. First report of tomato mottle geminivirus infecting tomatoes in Yucatan, Mexico. Plant Disease 82: 592. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.5.592B>.
- Garzon-Tiznado JA, Acosta-García G, Torres-Pacheco I, González-Chavira M, Rivera-Bustamante RF, Maya-Hernández V y Guevara-González RG. Presencia de los geminivirus huasteco del chile (PHV), texano del chile variante Tamaulipas (TPV-T) y Chino del tomate (CdTV) en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. Revista Mexicana de Fitopatología 20: 45-52. <https://www.redalyc.org/pdf/612/61220108.pdf>.
- Godínez-Hernández Y, Anaya-López JL, Díaz-Plaza R, González-Chavira M and Torres-Pacheco I. 2001. Characterization of resistance to Pepper Huasteco Geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. HortScience 36: 139-142. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.36.1.139>.
- Gregorio-Jorge J, Bernal-Alcocer A, Bañuelos-Hernández B, Alpuche-Solís AG, Hernández-Zepeda C, Moreno-Valenzuela O, Frías-Treviño G and Argüello-Astorga GR. 2010. Analysis of a new strain of *Euphorbia mosaic virus* with distinct replication specificity unveils a lineage of begomoviruses with short rep sequences in the DNA-B intergenic region. Virology Journal 7: 275. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-275>.
- Hernández-Espinal LH, Enriquez-Verdugo I, Melgoza-Villagomez CM, Retes-Manjarrez JE, Velarde-Felix S, Linares-Flores PJ y Garzon-Tiznado JA. 2018. Análisis filogenético y distribución de begomovirus en el cultivo del chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. Revista Fitotecnia Mexicana 41: 149-157. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.149-157>.
- Hernández-Verdugo S, Guevara-González RG, Rivera-Bustamante RF and Oyama K. 2001. Screening wild plants of *Capsicum annum* for resistance to *Pepper huasteco virus* (PHV): presence of viral DNA and differentiation among populations. Euphytica 122: 31-36. <https://doi.org/10.1023/A:1012624830340>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela O. 2007a. Molecular characterization and experimental host range of *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan Peninsula, a begomovirus species in the *Squash leaf curl virus* clade. Plant Pathology 56: 763-770. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01652.x>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela O. 2007b. Molecular characterization and phylogenetic relationships of two new bipartite begomovirus infecting malvaceous plants in Yucatan, Mexico Virus Genes 35: 369-377. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0080-5>.
- Hernández-Zepeda C, Idris AM, Carnevali G, Brown JK and Moreno-Valenzuela OA. 2007c. Preliminary identification and coat protein gene phylogenetic relationships of begomoviruses associated with native flora and cultivated plants from the Yucatan Peninsula of Mexico. Virus Genes 35: 825-833. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0149-1>.
- Jones DR. 2003. Plant Viruses transmitted by whiteflies. European Journal of Plant Pathology 109: 195-219. <https://doi.org/10.1023/A:1022846630513>.
- Lotrakul P, Valverde R A, De La Torre R, Sim J and Gómez A. 2000. Occurrence of a strain of Texas pepper virus in Tabasco and Habanero pepper in Costa Rica. Plant Disease 84: 168-172. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.168>.
- Mendez-Lozano J, Torres-Pacheco I, Fauquet CM, and Rivera-Bustamante RF. 2003. Interactions Between Geminiviruses in a naturally occurring mixture: *Pepper huasteco virus* and *Pepper golden mosaic virus*. Phytopathology 93: 270-277. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.3.270>.
- Morales-Aguilar JJ, Rodríguez-Negrete EA, Camacho-Beltrán E, López-Luque CA, Leyva-López NE, Jiménez-Díaz F, Voloudakis A, Santos-Cervantes ME and Méndez-Lozano

- J. 2019. Identification of *Tomato yellow leaf curl virus*, *Pepper huasteco yellow vein virus* and *Pepper golden mosaic virus* associated with pepper diseases in northern Mexico. *Canadian Journal of Plant Pathology* 41: 544-550. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1591509>.
- Morales F, Hilje L, Vallejos J, Sibaja G, Araya C and Araya R. 2005. Whiteflies as vectors of viruses in legume and vegetable mixed cropping systems in the tropical lowlands of Central America, Mexico and the Caribbean: Costa Rica, 217-221. *In: Whitefly and Whitefly-borne Viruses in the Tropics: Building a Knowledge Base for Global Action*. editors: Anderson P. K. and Morales F. J. CIAT publication No. 34, Cali, CO. [http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos\\_CIAT/9586940748.pdf](http://ciat-library.ciat.cgiar.org/Articulos_CIAT/9586940748.pdf).
- Rausch FF, de Albuquerque LC, de Brito GL, Boiteux LS, de Ávila AC and Inoue-Nagata K. 2008. Diversity and prevalence of Brazilian bipartite begomovirus species associated to tomatoes. *Virus Genes* 36: 251-258. <https://doi.org/10.1007/s11262-007-0184-y>.
- Polston JE and Anderson PK. 1997. The Emergence of Whitefly-Transmitted Geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease* 81: 1358. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.12.1358>.
- Rodelo-Urrego M, García-Arenal F and Pagan I. 2015. The effect of ecosystem biodiversity on virus genetic diversity depends on virus species: A study of chiltepin-infecting begomoviruses in Mexico. *Virus Evolution* 1:1-13. <https://doi.org/10.1093/ve/vev004>.
- Rodriguez-Negrete EA, Morales-Aguilar JJ, Dominguez-Duran G, Torres-Devora G, Camacho-Beltran E, Leyva-Lopez NE, Voloudakis AE, Bejarano ER and Mendez-Lozano J. 2019. High-throughput sequencing reveals differential begomovirus species diversity in non-cultivated plants in Northern-Pacific Mexico. *Viruses* 11: 594. <https://doi.org/10.3390/v11070594>.
- Seal SE, vandenBosch F and Jeger MJ. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25: 23-46. <https://doi.org/10.1080/07352680500365257>.
- Tamura K, Stecher G and Kumar S. 2021. MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38: 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Torres-Herrera SI, Romero-Osorio A, Moreno-Valenzuela O, Pastor-Palacios G, Cardenas-Conejo Y, Ramirez-Prado JH, Riego-Ruiz L, Minero-Garcia Y, Ambriz-Granados S and Argüello-Astorga GR. 2019. A lineage of begomoviruses encode REP and AC4 proteins of enigmatic ancestry: hints on the evolution of geminiviruses in the New World. *Viruses* 11: 644. <https://doi.org/10.3390/v11070644>.
- Torres-Pacheco I, Garzon-Tiznado JA, Brown JK, Becerra-Flora A and Rivera-Bustamante RF. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192. <https://doi.org/10.1094/phyto-86-1186>.
- Villanueva-Alonzo HJ, Us-Camas RY, Lopez-Ochoa LA, Robertson D, Guerra-Peraza O, Minero-Garcia Y and Moreno-Valenzuela OA. 2013. A new virus-induced gene silencing vector based on *Euphorbia mosaic virus*-Yucatan peninsula for NPR1 silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Capsicum annuum* var. Anaheim. *Biotechnology Letters* 35: 811-823. <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1146-1>.