



PRIMER REPORTE DE BEGOMOVIRUS INFECTANDO CULTIVOS DE AJÍ (*Capsicum* spp.) EN COLOMBIA

First report of begomoviruses infecting pepper (*Capsicum* spp.) crops in Colombia

Juan Carlos VACA-VACA^{1,2}, Jonathan MORALES-EUSE^{1,2}, Diana Marcela RIVERA-TORO^{1,2}, Karina LÓPEZ-LÓPEZ^{1,2*}

¹Grupo IPMA Interacción Planta Microorganismo Ambiente, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Carrera 32 n°. 12 – 00, Palmira, Colombia.

²Centro de Investigación e Innovación en Bioinformática y Fotónica – CIBioFi, Calle 13 n°. 100-00, Edificio 320 No. 1069, Universidad del Valle, 760032 Cali, Colombia.

*For correspondence: klopezl@unal.edu.co

Received: 27th April 2019, Returned for revision: 05th June 2019, Accepted: 26th June 2019.

Associate Editor: Maria Cristina Navas.

Citation/Citar este artículo como: Vaca-Vaca JC, Morales-Euse J, Rivera-Toro DM, López-López K. Primer reporte de begomovirus infectando cultivos de ají (*Capsicum* spp.) en Colombia. Acta biol. Colomb. 2019;24(3):452-462. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n3.79367>

RESUMEN

Virus del género *Begomovirus* infectan cultivos de importancia económica en todo el mundo, incluyendo ají. A la fecha, en Colombia no hay reportes de la presencia de begomovirus infectando este cultivo, por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar la presencia de virus de este género en ají empleando estrategias moleculares. Se colectaron 197 muestras de ají en diez municipios del Valle del Cauca. Se extrajo el DNA genómico total vegetal y mediante PCR se detectó la presencia de begomovirus. Para establecer la identidad molecular del virus se amplificaron fragmentos de 1,4 kb de muestras colectadas en Palmira y Vijes. Los fragmentos fueron clonados, secuenciados y analizados. Se encontró que el 85,7 % de las muestras de ají evaluadas fueron positivas para begomovirus. Los análisis de secuencia de los fragmentos virales de 1,4 kb arrojaron una identidad de 91,8 % entre ellos y los de secuencia de nucleótidos de los virus aislados en Vijes y Palmira mostró que éstos presentan los valores de identidad más altos (87,2 % y 86,6 %) con el virus de la distorsión de la hoja de maracuyá, un begomovirus aislado de maracuyá en Colombia. Estos análisis estarían indicando que este begomovirus aislado de ají podría ser una nueva especie. De acuerdo con la literatura, este es el primer reporte de un begomovirus infectando cultivos de ají en Colombia.

Palabras clave: Diagnóstico molecular, geminivirus, mosca blanca, reacción en cadena de la polimerasa, Solanaceae.

ABSTRACT

Viruses of the genus *Begomovirus* infect crops of economic importance around the world, including pepper. To date, in Colombia there are no reports of the presence of begomoviruses infecting this crop; therefore, this research work aimed to identify the presence of viruses of this genus in pepper using molecular strategies. Around 197 pepper samples were collected in ten municipalities in Valle del Cauca. Total plant genomic DNA was extracted, and the presence of begomoviruses was detected by using PCR. In order to establish the molecular identity of the virus, fragments of 1.4 kb were amplified from samples collected in Palmira and Vijes municipalities. The fragments obtained were cloned, sequenced, and analyzed. The results show that about 85.7 % of the pepper samples evaluated were positive for begomoviruses. Sequence analysis of the viral fragments of 1.4 kb showed an identity of 91.8 % among them. The nucleotide sequence analysis of the begomoviruses isolated in Vijes and Palmira showed its highest identity values (87.2 % and 86.6 %) with the passion fruit leaf distortion virus, a begomovirus that is affecting passion fruit crops in Colombia. These sequences analyze would indicate that this begomovirus isolated from pepper could be a new species that has not been reported worldwide. To our knowledge, this is the first report of a begomovirus infecting pepper crops in Colombia.

Keywords: Geminivirus, molecular diagnosis, polymerase chain reaction, Solanaceae, whitefly.

INTRODUCCIÓN

El chile o ají (*Capsicum* spp.) incluye tanto plantas herbáceas anuales o bianuales como plantas perennes y arbustivas, pertenece a la familia *Solanaceae* y tiene sus orígenes en la región tropical de América del Sur, en lo que hoy se conoce como República de Bolivia (Olmstead *et al.*, 2008). El género *Capsicum* está conformado por 25 especies (Baral y Bosland, 2002), de las cuales cinco son las más cultivadas, siendo *Capsicum annuum* la primera a nivel mundial (Yoon *et al.*, 2004). El cultivo del ají es uno de los más promisorios como producto de exportación en Colombia y ha venido ganando participación en los mercados gracias a sus propiedades condimentarias, medicinales y fácil transformación agroindustrial (Corporación Colombia Internacional, 2006). De acuerdo con datos de la FAO, (2013) la producción mundial de ají y pimiento fresco va en aumento en los últimos años, pasando de 26 700 847 toneladas en el 2006 a producir 36 092 631 toneladas en el 2017. El continente con mayor producción de ají es Asia, en donde destacan países como China e Indonesia mientras que en el continente americano el mayor productor es México seguido por Estados Unidos. En Colombia, en el año 2017 se produjeron 22 030 toneladas de ají, siendo el departamento de Bolívar el mayor productor aportando el 21 % de la producción nacional seguido por el Valle del Cauca con un 19 % (MADR - Agronet, 2019). El ají posee un gran potencial económico, siendo actualmente uno de los cultivos más promisorios como producto de exportación principalmente a países como Estados Unidos, el cual es el mayor importador de ají, tanto seco como verde. Aunque el ají ha venido ganando fuerza en la apuesta exportadora agropecuaria, por su tendencia histórica de exportación en el país y por la creciente demanda internacional del mismo, las estadísticas de la FAO muestran que la producción de ají en Colombia disminuyó drásticamente a partir del año 2006, pasando de una producción de 49 500 toneladas a 17 853 toneladas en 2017 (FAO, 2013).

Una de las principales limitantes en la producción de ají son las enfermedades de tipo viral, causadas comúnmente por virus pertenecientes a los géneros: *Potyvirus*, *Cucumovirus*, *Tospovirus*, *Crinivirus* y *Begomovirus* (Kenyon *et al.*, 2014). Los *Begomovirus* (Familia *Geminiviridae*) presentan un genoma de ADN cadena sencilla circular, son transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) e infectan cultivos de interés económico exclusivamente pertenecientes a las dicotiledóneas (Brown *et al.*, 2015). Los begomovirus pueden causar hasta el 20 % de pérdidas de la producción del cultivo de ají (Hernández-Espinal *et al.*, 2018) y su alta incidencia en los últimos 30 años en las zonas tropicales y subtropicales del planeta los ha catapultado como uno de los principales grupos de virus emergentes, que limitan la producción de hortalizas. Su aparición está directamente correlacionada con el incremento en las poblaciones de su insecto vector, la

mosca blanca (Roberts *et al.*, 2004). En Latinoamérica, los begomovirus han sido encontrados limitando la producción de ají en diferentes países: en México, se reportó al virus huasteco de la vena amarilla del chile (*Pepper Huasteco yellow vein virus*, PHYVV), antes conocido como el virus huasteco del chile (*Pepper Huasteco virus*, PHV) (Torres *et al.*, 1993), así como al virus tigre leve del chile (*Pepper mild tigre virus*, PepMTV) (Brown *et al.*, 1989); por su parte en América central, el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) (Lotrakul *et al.*, 2000) antes conocido como virus del chile de Texas (*Texas pepper virus*, TPV); mientras que en Jamaica, se encontró el virus de la hoja rizada enana del tomate (*Tomato dwarf leaf curl virus*, ToDfLV) (Royo *et al.*, 1999) en Trinidad y Tobago, el virus del mosaico amarillo del tomate (*Tomato yellow mosaic virus*, ToYMV), ahora conocido como virus del mosaico amarillo de la papa (*Potato yellow mosaic virus*, PYMV) (Umaharan *et al.*, 1998); en Cuba, el virus de la hoja rizada amarilla del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Quiñones *et al.*, 2001); en Perú se reportó el virus de la hoja enrollada del chile (PepLRV) (Martínez *et al.*, 2013); y en isla Guadalupe se reportó que *Capsicum annuum* también puede ser hospedero de PYMV (Urbino *et al.*, 2004).

Para el 2017 el Valle del Cauca fue el segundo departamento productor de ají en Colombia, con una producción de 4 221 toneladas distribuidas en 193 hectáreas cosechadas, aportando un 19 % a la producción total del país (MADR - Agronet, 2019). La producción de ají en este departamento se ha visto afectado por enfermedades de tipo viral, de las cuales hasta el momento se desconoce la identidad molecular de muchas de ellas. En particular en Colombia a la fecha no se cuentan con estudios detallados sobre las enfermedades causadas por begomovirus en plantas pertenecientes al género *Capsicum*. Con base en estos hechos, el objetivo de esta investigación fue identificar la presencia de begomovirus en cultivos de *Capsicum* spp. en el Valle del Cauca empleando estrategias moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta del material vegetal

Se colectaron muestras de plantas de ají tabasco (*Capsicum frutescens*), ají habanero (*Capsicum chinense*), ají cayena (*Capsicum annuum* var. *acuminatum*) y ají jalapeño (*Capsicum annuum*) provenientes de cultivos comerciales a cielo abierto ubicados en los municipios de Toro, Vijes, La Unión, Zarzal, Guacari, Roldanillo, Bolívar, Candelaria, Tuluá y Palmira, en el Valle del Cauca, en los años 2016 y 2018 (Tabla 1). Se tomaron hojas jóvenes con síntomas de enfermedad viral: mosaicos, corrugamiento o rugosidad de la hoja, clorosis generalizada, acortamiento de los entrenudos, deformación y reducción del limbo foliar, y deformación de frutos, así como también se colectaron muestras de hojas en plantas asintomáticas. Las hojas fueron

recolectadas al azar alrededor de todo el cultivo. El material se almacenó en bolsas de papel debidamente etiquetadas y colocadas dentro de neveras de icopor con hielo seco donde se mantuvieron hasta ser llevadas al Laboratorio de Sanidad y Microbiología agrícola de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira para su posterior análisis. Las plantas fueron fotografiadas y los sitios de colecta fueron georreferenciados con el equipo GPS-CSX-60 (Garmin®).

Extracción de DNA genómico

Para llevar a cabo los análisis moleculares, se realizó una extracción de ADN genómico total de cada muestra vegetal. El material vegetal se molió con nitrógeno líquido usando un molino eléctrico de acero inoxidable (B. E. Classics®). Se realizó la extracción de ADN genómico total utilizando la metodología reportada por Doyle y Doyle, (1987) con la siguiente modificación: se adicionó 0,1 volumen de SDS 20 % al buffer de lisis. Posteriormente para verificar la calidad y cantidad del ADN genómico total extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,8 % (p/v), teñido con bromuro de etidio (10 ng/μl). Finalmente, el gel se visualizó y fotografió en un transiluminador (Molecular Imager Gel DocXR+ Systems BIORAD®) utilizando el software Quantity-One® 4.6.5 provisto por el fabricante del equipo.

Detección de begomovirus mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La detección molecular de begomovirus se llevó a cabo mediante la técnica de PCR empleando un juego de iniciadores universales MP16 y MP82 (Umaharan *et al.*, 1998) que amplifican un fragmento de 0,4 - 0,5 kb del componente genómico A geminiviral. Este fragmento amplificado abarca la región intergénica así como parte del

marco de lectura abierto de la proteína de la cápside (CP). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 ul con los siguientes componentes: 1,0 μM de cada iniciador, 0,2 mM de una mezcla de dNTPs, buffer 1X, 1,25 U Taq polimerasa (Fermentas), 500 ng DNA genómico total y agua Milli-Q hasta completar el volumen final deseado. Para la amplificación se usó un termociclador BioRad® (Modelo C1000) siguiendo las condiciones de amplificación reportadas por Umaharan *et al.*, (1998). Como control positivo se utilizó ADN plasmídico que porta el componente genómico A de PYMV, un begomovirus bipartita endémico que afecta tomate en Colombia (Vaca-Vaca *et al.*, 2012); mientras que como control negativo se usó agua.

Para la caracterización molecular del begomovirus se utilizó un segundo juego de iniciadores universales de begomovirus, RepDGRN y YMAC-N (Mauricio-Castillo *et al.*, 2007) que amplifican un fragmento de 1,4 kb del componente genómico ADN-A y que abarca la región que porta los genes AL1 (Rep), región intergénica y AR1 (CP). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 25 ul siguiendo las condiciones de amplificación descritas por el autor.

Clonación y secuenciación

Los fragmentos 1,4 kb amplificados por PCR fueron ligados en el vector pGem T-Easy (Promega®) y transformados en células competentes de *E. coli* dh5α Rec(-) por choque térmico (Sambrook y Russell, 2001). Se realizó extracción de ADN plasmídico de las células transformantes empleando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen®) y se verificó la presencia del inserto mediante análisis de restricción con la enzima EcoRI. El ADN plasmídico de las clonas que portaban inserto fue enviado a secuenciar en Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Tabla 1. Descripción de los sitios de colecta de *Capsicum* spp. en el Valle del Cauca y detección de begomovirus mediante PCR (ver metodología). La incidencia se calculó como el porcentaje de infección (número de muestras positivas sobre muestras colectadas multiplicado por 100).

Región geográfica	Municipio	Localidad o Finca	Coordenadas Geográficas	Altura	Especie	Número de muestras colectadas	Número de muestras infectadas (incidencia)
Norte	Toro	San Francisco	04° 40' N 76° 1' W	949 m.s.n.m.	Tabasco	14	10 (71 %)
		Bohio	04° 36' N 76° 3' W	967 m.s.n.m.	Tabasco	6	5 (83 %)
		El Zanco	04° 36' N 76° 4' W	988 m.s.n.m.	Tabasco	6	0 (0 %)
			Cayena			4	4 (100 %)
		El Mirador	04° 35' N 76° 04' W	956 m.s.n.m.	Cayena	4	3 (75 %)
La Unión	Álamos		04° 30' N 76° 05' W	943 m.s.n.m.	Tabasco	9	9 (100 %)
					Habanero	1	1 (100 %)

(Continúa)

Tabla 1. Descripción de los sitios de colecta de *Capsicum* spp. en el Valle del Cauca y detección de begomovirus mediante PCR (ver metodología). La incidencia se calculó como el porcentaje de infección (número de muestras positivas sobre muestras colectadas multiplicado por 100) (continuación).

Región geográfica	Municipio	Localidad o Finca	Coordenadas Geográficas	Altura	Especie	Número de muestras colectadas	Número de muestras infectadas (incidencia)	
Norte	Roldanillo	Finca - Luis Benjumea	04° 26' N 76° 08' W	951 m.s.n.m.	Cayena	6	5 (83 %)	
		Finca el Palacio	04° 42' N 76° 09' W	942 m.s.n.m.	Tabasco	5	5 (100 %)	
		Isogu	04° 41' N 76° 10' W	934 m.s.n.m.	Tabasco	3	3 (100 %)	
	Bolívar	Ricaurte - El Cairo		04° 31' N 76° 19' W	889 m.s.n.m.	Cayena	5	5 (100 %)
						Tabasco	7	7 (100 %)
	Zarzal	Finca la samaria - Lote 9B		04° 24' N 76° 03' W	914 m.s.n.m.	Habanero	14	10 (71 %)
				04° 24' N 76° 06' W	958 m.s.n.m.	Jalapeño	5	5 (100 %)
		Finca la samaria - Lote B		04° 24' N 76° 03' W	953 m.s.n.m.	Tabasco	5	0 (0 %)
				04° 24' N 76° 03' W	954 m.s.n.m.	Tabasco	5	5 (100 %)
				04° 25' N 76° 03' W	959 m.s.n.m.	Cayena	5	5 (100 %)
				04° 25' N 76° 03' W	915 m.s.n.m.	Tabasco	9	9 (100 %)
	Centro	Tuluá	El Cofre	04° 10' N 76° 23' W	934 m.s.n.m.	Tabasco	6	3 (50 %)
		Guacarí	Guacarí	03° 45' N 76° 19' W	990 m.s.n.m.	Cayena	5	5 (100 %)
	Sur	Vijes	Mozambique - El Danubio	03° 45' N 76° 31' W	1186 m.s.n.m.	Habanero	10	10 (100 %)
Mozambique			03° 45' N 73° 31' W	1223 m.s.n.m.	Habanero	10	10 (100 %)	
El Romerito			03° 43' N 76° 31' W	1284 m.s.n.m.	Habanero	5	5 (100 %)	
El Tambor			03° 46' N 76° 30' W	1328 m.s.n.m.	Habanero	7	7 (100 %)	
Bonanza			03° 70' N 76° 49' W	917 m.s.n.m.	Tabasco	4	4 (100 %)	
Palмира		Finca - Alberto Flores	03° 37' N 76° 23' W	931 m.s.n.m.	Tabasco	11	11 (100 %)	
		Rozo	03° 37' N 76° 25' W	943 m.s.n.m.	Cayena	4	3 (75 %)	
		Vereda Piles, corregimiento La Dolores	03° 32' N 76° 27' W	967 m.s.n.m.	Habanero	10	10 (100 %)	
Candelaria		CEUNP				Habanero	6	6 (100 %)
				02° 06' N 65° 03' W	1008 m.s.n.m.	Jalapeño	1	1 (100 %)
					Cayena	1	1 (100 %)	
Tres zonas	10 municipios	26 fincas		915-1328 m.s.n.m.	Tabasco	4	2 (50 %)	
					Tabasco	94	73 (78 %)	
					Habanero	63	59 (93 %)	
					Cayena	34	31 (91 %)	
					Jalapeño	6	6 (100 %)	
Total						197	169 (85,7 %)	

Análisis bioinformático

Para cada fragmento viral se realizó el ensamble de las lecturas de secuenciación empleando el software CLC Main workbench v7.0 (Qiagen®). Con el fin de conocer la identidad de las secuencias de nucleótidos, se realizó una comparación usando el algoritmo Blastn contra la base de datos “*refseq_genomic*” de GenBank (Altschul *et al.*, 1997). De acuerdo con este análisis, se seleccionaron ocho secuencias de begomovirus que presentaban mayor identidad con las secuencias del virus aislado en cultivos de ají de Palmira y Vijes (Tabla 2). Y se adicionaron al análisis, cuatro secuencias de begomovirus aislados de ají en México y Brasil; y un begomovirus aislado de yuca (*Manihot esculenta* L.) en África, para incluirlo como secuencia externa del análisis. Todas las secuencias de nucleótidos de los begomovirus arriba mencionadas se obtuvieron del GenBank y se editaron en el programa Bioedit para realizar un alineamiento múltiple en el programa Clustal W, junto con la secuencia de nucleótidos de los begomovirus aislados de ají de Palmira y Vijes (Larkin *et al.*, 2007). A partir del alineamiento múltiple se calcularon los valores de identidad entre estas secuencias a nivel de nucleótidos empleando el software *Sequence Demarcation Tool* SDT 1.2® (Muhire *et al.*, 2014).

Los análisis filogenéticos para los virus identificados se realizaron con el alineamiento múltiple de las secuencias seleccionadas en el programa Mega 7 (Kumar *et al.*, 2016). La historia evolucionaria se infirió usando el método de *Neighbor-joining* (Saitou y Nei, 1987) y las distancias evolutivas

se obtuvieron usando el método de máxima probabilidad (Tamura *et al.*, 2004) con 1 000 *bootstrap*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección por primera vez de begomovirus en muestras de ají colectadas en el Valle del Cauca

Un total de 197 muestras de cuatro variedades de ají fueron colectadas en los municipios de Toro, Vijes, La Unión, Zarzal, Guacari, Roldanillo, Bolívar, Candelaria, Tuluá y Palmira, localizados en el Valle del Cauca: 34 de ají cayena (*Capsicum annuum* var. *acuminatum*), 63 de ají habanero (*Capsicum chinense*), 94 de ají tabasco (*Capsicum frutescens*) y seis de ají jalapeño (*Capsicum anuum*). Las plantas de la variedad cayena y jalapeño en su mayoría se presentaron asintomáticas o con síntomas muy leves, como se observa en la Fig. 1c y d; es decir, no se apreciaron manifestaciones visibles de la interacción entre estas y el virus. Mientras que las variedades tabasco y habanero mostraron sintomatología característica de enfermedad viral, en donde predominaba la presencia de mosaicos y deformación de la lámina foliar (rugosidad) (Fig. 1a y b). También, algunas plantas presentaban clorosis intervenal y generalizada, acortamiento de los entrenudos, deformación de frutos y enanismo.

Mediante la técnica de PCR se detectaron como positivas por infección por begomovirus el 85,7 % (169/197) de las muestras colectadas en campo (Tabla 1). Estas muestras

Tabla 2. Porcentaje de identidad de secuencia de nucleótidos del fragmento de 1,4 kb del componente genómico de DNA-A de begomovirus aislados de *Capsicum* spp. de Palmira y Vijes con otros begomovirus, utilizando el software SDT v1.2.

Virus /Número de accesión en GenBank	Acrónimo	Hospedero		País	% identidad nt)	
		Familia	Especie		Vijes	Palmira
Passionfruit leaf distortion virus / NC_031764	PLDV	Pasifloraceae	<i>Passiflora edulis</i>	Colombia	87,2	86,6
Bean dwarf mosaic virus / NC_001931	BDMV	Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia	86,9	84,9
Corchorus yellow spot virus / NC_008492	CoYYuV	Malvaceae	<i>Corchorus siliquosus</i>	México	85,3	84,6
Bean white chlorosis mosaic virus / NC_022005	BChMV	Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Venezuela	84,5	84,9
Sida yellow vein virus / NC_004661	SiYV	Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Honduras	83,8	83,4
Sida yellow mottle virus strain Cuba / NC_016082	SiYMoV	Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Cuba	83,3	84,7
Sida golden mosaic Honduras virus / NC_004659	SiGMHV	Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	Honduras	83,3	83,8
Tomato severe rugose virus / NC_009607	ToSRV	Solanaceae	<i>Capsicum</i> sp	Brasil	78,3	78,5
Tomato golden vein virus / NC_038807	TGVV	Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	Brasil	77,5	76,9
Pepper leafroll virus isolate / KC769819	PepLRV	Solanaceae	<i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	Perú	76,9	76,7
Pepper huasteco yellow vein virus / NC_001359	PHYV	Solanaceae	<i>Capsicum</i> sp	México	76,4	76,5
Pepper golden mosaic virus / NC_004101	PepGMV	Solanaceae	<i>Capsicum</i> sp	México	72,1	71,2
African cassava mosaic virus / NC_001467	ACMV	Euphorbiaceae	<i>Manihot esculenta</i>	Kenya	68,3	66,7

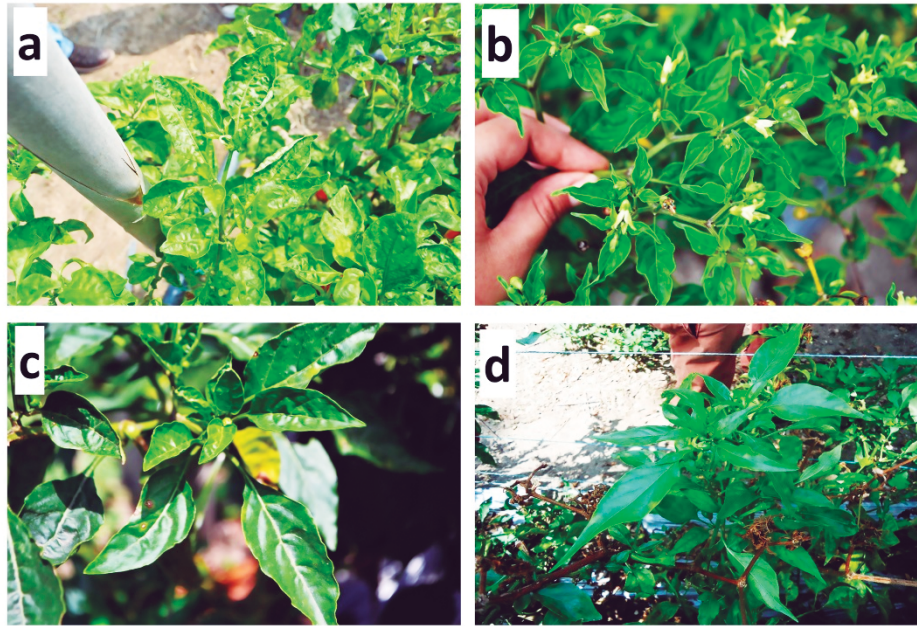


Figura 1. Variedades de ají (*Capsicum spp.*) colectadas en campo y síntomas observados en la mayoría de las muestras positivas a begomovirus. a., ají habanero (*Capsicum chinense*) con síntomas como deformación rugosa de la lámina foliar y mosaicos; b., ají tabasco (*Capsicum frutescens*) con deformación rugosa de la lámina foliar e islas verdes; c., ají cayena (*Capsicum annuum* var. *acuminatum*) asintomática; d., ají jalapeño (*Capsicum annuum*) asintomática.

amplificaron un fragmento de aproximadamente 0,4 kb del componente genómico Ageminiviral (Fig. 2), el cual presenta un tamaño diferente con respecto al control positivo PYMV (ver asterisco). Este resultado indica que el virus detectado en ají es diferente a PYMV, un begomovirus que afecta tomate en Colombia. Esto es interesante, ya que muchos de los begomovirus que infectan tomate se han reportado que afectan ají; por ejemplo, en Trinidad y Tobago, y en la Isla Guadalupe se ha reportado que PYMV afecta *Capsicum* (Umaharan *et al.*, 1998; Urbino *et al.*, 2004); en Cuba, TYLCV se ha detectado en cultivos de ají y frijol (Quiñones *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2002); en Perú se reportó que PePLRV infecta cultivos de ají, frijol y tomate (Martínez *et al.*, 2013); y en México, se ha reportado que PHYVW y PepGMV afectan tomate y ají (Torres *et al.*, 1993; Lotrakul *et al.*, 2000).

En la Tabla 1, se observa que la mayor cantidad de muestras positivas para begomovirus se presentó en la zona Centro-Sur del Valle del Cauca, representada por los municipios de Tuluá, Guacarí, Vijes, Palmira y Candelaria; en donde se colectaron 84 muestras de ají (habanero, 48; tabasco, 25; cayena, diez; jalapeño, uno), y de las cuales 78 fueron positivas con un porcentaje de incidencia de 92,8 %. La zona norte, representada por los municipios de Toro, La Unión, Zarzal, Roldanillo y Bolívar presentó un porcentaje de incidencia menor, 80,5 % (91/113). La variedad con mayor porcentaje de incidencia fue jalapeño, donde el 100 % de las muestras resultaron positivas para este virus. La variedad habanera presentó un 93,6 % de incidencia, cayena

un 91,1 % y por último, tabasco con un 77,6 %. Aunque la mayoría de las muestras de la variedad cayena y jalapeño se mostraron asintomáticas, tras los análisis moleculares, un alto porcentaje resultaron positivas para begomovirus (Tabla 1). Esto podría indicar que estas variedades estarían funcionando como hospedero asintomático de este virus y fuente de inóculo para otras variedades de ají.

Con base en la literatura reportada a la fecha y en los resultados de esta investigación, este sería el primer reporte en Colombia de un begomovirus infectando cultivos comerciales de *Capsicum spp.* a lo largo y ancho del Valle del Cauca. Basados en el gran porcentaje de muestras de ají que resultaron positivas para begomovirus (85,7 %), se puede deducir que estos virus se encuentran distribuidos biogeográficamente afectando esta solanácea y muy probablemente hacen presencia en otras regiones del país debido al gran movimiento e intercambio de material vegetal entre productores a nivel país.

En el Valle del Cauca, los reportes de begomovirus afectando cultivos de interés agronómico, no son nuevos. Desde 1975, se han reportado infecciones begomovirales en cultivos de frijol, donde fueron detectados los virus del mosaico dorado y del moteado clorótico del frijol (Gálvez *et al.*, 1975). En 1990, Morales *et al.*, (1990) caracterizaron parcialmente el virus del mosaico enano del frijol (BDMV) en muestras de frijol. Posteriormente, Vaca-Vaca *et al.*, (2012) identificaron un begomovirus, PYMV, como el virus que predomina y afecta los cultivos de tomate en las principales

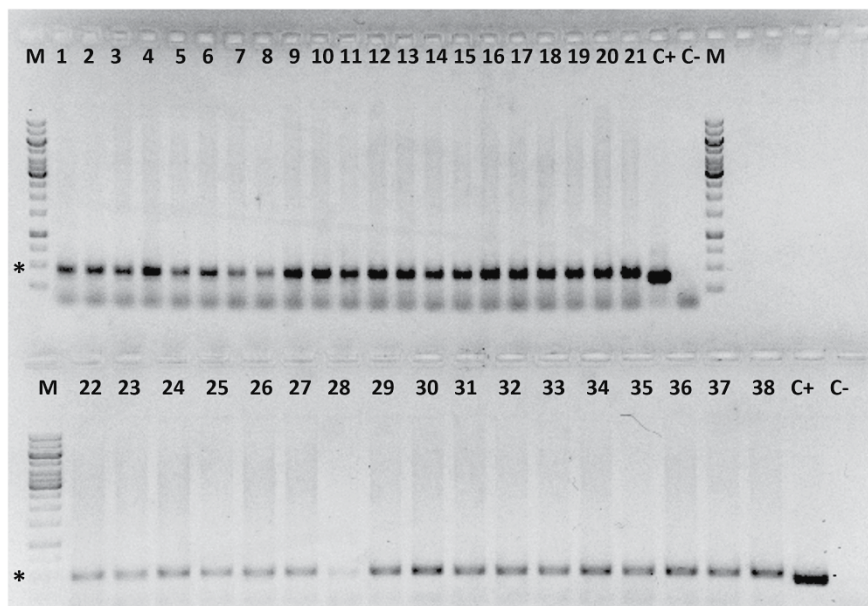


Figura 2. Detección molecular de begomovirus en plantas de ají, con el empleo de PCR según la metodología propuesta por Umaharan *et al.*, (1998). M, Marcador de peso molecular GeneRuler® 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific®); 1-11, muestras colectadas en el corregimiento de Rozo; 12-21, muestras colectadas en el corregimiento de Mozambique-Vijes; 22-28, Muestras colectadas en la vereda el Tambor-Vijes; 29-38, muestras colectadas en el corregimiento de Mozambique-Vijes; C+: Control positivo (begomovirus PYMV); C-: Control negativo (agua). El asterisco indica el tamaño del fragmento amplificado de aproximadamente 0,4 kb.

zonas productoras de esta solanácea en Colombia (Valle, Región cafetera, Cundinamarca, Santander y Antioquia). Y recientemente, Vaca-Vaca *et al.*, (2017) reportaron el virus de la distorsión de la hoja de maracuyá (*Passionfruit leaf distortion virus*, PLDV), un nuevo begomovirus infectando maracuyá en el Valle del Cauca.

Los resultados de la presente investigación sugieren la presencia de un geminivirus no descrito en la literatura, que se adicionaría a los previamente descritos en América infectando al cultivo del ají. Por ejemplo, Torres *et al.*, (1993) reportaron el virus PHYVV en la región Huasteca de México infectando *C. annuum*, variedad Serrano. Umaharan *et al.*, (1998) en Trinidad y Tobago identificó los virus PHYVV y PYMV en *C. annuum* y *C. frutescens*. Lotrakul *et al.*, (2000) aisló PepGMV de ají tabasco (*C. frutescens*) y de *Capsicum chinense* variedad habanero en Costa Rica. También se reportó que el virus de la distorsión de la hoja clorótica del tomate (*Tomato chlorotic leaf distortion virus*, TCLDV) aislado de tomate en Venezuela puede infectar plantas de *C. chinense* (Zambrano *et al.*, 2011). En ensayos por biobalística en Venezuela se inoculó el virus del mosaico de Euphorbia de Venezuela (*Euphorbia mosaic Venezuela virus*, EuMVV) en *C. annuum* y se observó amarillamiento y distorsión de la hoja (Zambrano *et al.*, 2012). Además, en Perú en otras especies, como *C. bacatum* en Cv. Pendulum, se detectó y aisló PepLRV de chile amarillo peruano (Martínez *et al.*, 2013). Con base en lo expuesto anteriormente se establece que los begomovirus figuran entre las principales amenazas fitopatológicas para el cultivo de ají en este hemisferio.

En el caso concreto del Valle del Cauca los resultados de esta investigación demuestran que la mayoría de los

materiales de ají sembrados son susceptibles al ataque de los begomovirus. Se podría de alguna manera exceptuar las variedades cayena y jalapeño, las cuales, aunque fueron fenotípicamente asintomáticas, resultaron positivas a begomovirus en los análisis moleculares. Este resultado podría explicarse si tenemos en cuenta que, posiblemente los begomovirus presentes en cayena y jalapeño, hasta el momento se están adaptando a estos hospederos, siendo probablemente el factor movimiento y dispersión vía floema, el principal cuello de botella que les ha impedido alcanzar otros tejidos vegetales y generar allí la sintomatología geminiviral típica, tal y como lo demuestran los estudios de Hipper *et al.*, (2013). Por lo cual estas variedades podrían ser una opción temporal para los productores de la zona, mientras se desarrollan materiales tolerantes o resistentes a este nuevo begomovirus en las variedades habanero y tabasco.

Caracterización molecular de begomovirus detectados en ají en Palmira y Vijes

Para conocer la identidad de los begomovirus detectados en muestras de ají habanero (*C. chinense*) colectadas en Palmira y Vijes, municipios donde la presencia de begomovirus fue alta (100 % de infección por begomovirus), fragmentos virales de 1,4 kb fueron clonados. Estos fragmentos virales portan una parte de los genes que codifican para las proteínas Rep y CP, e incluye toda la región intergénica. Se obtuvieron cinco clones independientes a partir de muestras de ají colectadas en Palmira y el análisis de la secuencia de nucleótidos de estas mostró que todas eran el mismo virus

(99-100 % identidad). De manera similar, la secuencia de ADN de seis clonas independientes obtenidas de muestras de ají colectadas en Vijes, fueron idénticas entre nucleótidos (99-100 % identidad). Por lo tanto, se obtuvieron dos secuencias de nucleótidos de 1429 y 1425 pb cada uno, correspondientes a un begomovirus identificados en ají habanero colectado en Vijes y Palmira, respetivamente. Los fragmentos virales mostraron un 91,6 % de identidad entre ellos, por lo que se pueden considerar aislados de una misma especie, ya que el porcentaje de identidad está entre el límite entre especies (< 91 %) y aislados (< 94 %) (Brown *et al.*, 2015). Estas secuencias fueron depositadas en la base de datos de GenBank con los siguientes números de accesión: MG888725, para el begomovirus de Piles, Palmira y MG888726, para el begomovirus de Vijes. El análisis de secuencia de nucleótidos en el software SDT (Tabla 2), mostró que los begomovirus aislados en Vijes y Palmira comparten la identidad más alta (87 % y 86 %) con el virus de la distorsión de la hoja de maracuyá (PLDV, número de accesión NC_031764), un begomovirus aislado de maracuyá (*Passiflora edulis*) en Valle del Cauca (Vaca-Vaca *et al.*, 2017); así como un bajo porcentaje de identidad (76,9 % y 76,7 %) con el virus de la hoja enrollada del chile (PepLRV, KC769819), un begomovirus detectado afectando el cultivo de ají (*Capsicum baccatum* var. *Pendulum*) en Perú (Martínez *et al.*, 2013). Con base al criterio de demarcación actual para las especies de *Begomovirus* establecidas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) en 2017 (< 91 % a nivel de nucleótidos del genoma del virus) (Brown *et al.*, 2015), se plantea la hipótesis de que los begomovirus aislados de ají en este trabajo de investigación podrían ser una nueva especie geminiviral que está infectando este cultivo en Colombia. Para confirmar esta hipótesis, se está trabajando en la obtención del genoma completo ADN-A y ADN-B de estos begomovirus.

Los análisis filogenéticos (Fig. 3) muestran que los begomovirus aislados de Vijes y Palmira se agrupan en un mismo clado, pero separados de PLDV y BDMV, dos begomovirus que afectan maracuyá y frijol en Colombia, con los cuales presentó un mayor acercamiento, pero con una identidad no muy cercana, pues es menor al 91 %. Asimismo, los begomovirus aislados de ají se agrupan también con virus aislados de arvenses como *Sida rhombifolia* y *Corchorus siliquosus*, pero no con otros virus aislados de ají en el continente americano. Este resultado coincide con los obtenidos a partir de la comparación de pares de secuencias de nucleótidos (Tabla 2), en donde begomovirus aislados de ají en Perú y México mostraron baja identidad y se localizan en grupos separados del grupo de begomovirus de Colombia. Una posible explicación para esto es la existencia de dos grandes barreras ecológicas, una hacia el norte en lo que se conoce como el tapón del Darien, es decir, la selva tropical entre Panamá y Colombia; y hacia el sur, la selva húmeda tropical del Amazonas, barrera que separa al

país del Perú, Ecuador y Brasil. Estas dos barreras ecológicas generaron para los begomovirus de Colombia un escenario único para evolucionar y especiarse bajo condiciones de selección diferentes a las que pudieron estar sometidos los geminivirus que afectan ají en Perú y México. Sustentan esta afirmación los resultados previamente reportados por Vaca-Vaca *et al.*, (2017), quienes caracterizaron un begomovirus nuevo aislado de maracuyá (PLDV) en Valle del Cauca, el cual se agrupó en un clado independiente del begomovirus que infecta este cultivo en Brasil.

La alta distribución y diseminación de este begomovirus en cultivos de ají en el Valle del Cauca, podría ser explicada por fenómenos como el aumento de poblaciones de *B. tabaci* biotipo B (Roberts *et al.*, 2004), el cual tiende a tener un mayor potencial biótico y desplazar al biotipo A. Esto fue demostrado en estudios en la costa norte del país (Quintero *et al.*, 2001) y en el Valle del Cauca donde el biotipo B desplazo no solamente al biotipo A, sino también a *Trialeurodes vaporariorum*, especie que por muchos años fue la más predominante en estos departamentos (Rodríguez *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2012). Otras posibles explicaciones son también la expansión e intensificación de los sistemas de producción, la reducción de la variación genética en las especies cultivadas y el uso generalizado e indiscriminado de insecticidas en la agricultura. En consecuencia, *B. tabaci* y los virus que transmite ya no están restringidos a hábitats nativos ni a límites geográficos naturales (Brown, 2010).

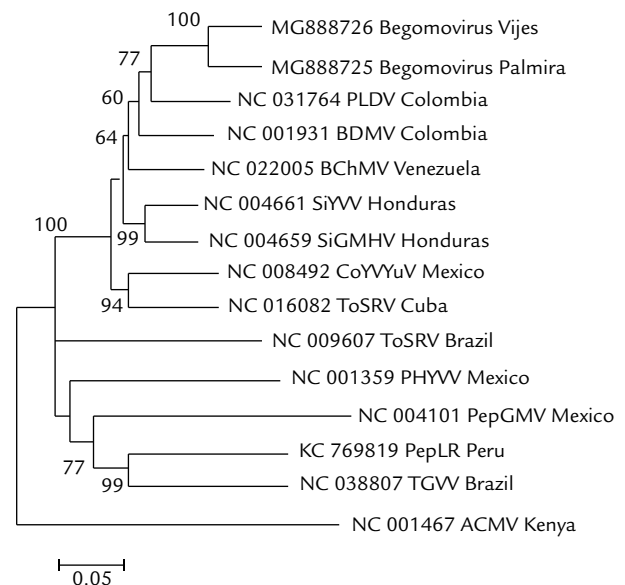


Figura 3. Análisis filogenético de los begomovirus aislados de ají en Palmira y Vijes. Árbol filogenético construido con el método Neighbor-joining usando un fragmento de 1,4 kb del genoma A que porta la región 5' de los genes AC1 (Rep) y proteína de la cápside (CP), y la región intergénica empleando 1 000 *bootstrap*. Para los nombres de las secuencias de begomovirus usados en el análisis ver Tabla 2. El virus del mosaico de yuca de África (*Africa cassava mosaic virus* -ACMV) se utilizó como grupo externo.

Estos factores podrían favorecer una mayor presión de selección en el vector *B. tabaci*, donde se pueden generar especies crípticas adaptadas a múltiples hospederos como se ha encontrado en Cuba (Martínez *et al.*, 2016). Basados en los hechos hasta aquí expuestos, bien se podría pensar que los begomovirus podrían colonizar nuevos cultivos de interés agronómico en Colombia y llegar a nuevas regiones geográficas donde previamente no se habían reportado.

Adicionalmente, las arvenses o plantas acompañantes, podrían tener un papel muy importante en la aparición y distribución de los begomovirus aislados de los cultivos de ají en el Valle del Cauca. Esto debido a que las arvenses pueden actuar como reservorios temporales de begomovirus así como de ser fuente de inóculo primario para la diseminación de begomovirus a través de la mosca blanca, desde las propias arvenses hacia las plantas cultivadas de interés económico (Ambrozevicius *et al.*, 2002; López-López *et al.*, 2012). En diversos estudios se ha identificado que arvenses tales como *Desmodium uncinatum*, *Macroptilium lathyroides*, *Rhynchosia minima*, *Malva sp.*, *Malvastrum sp.*, *Sida rhombifolia*, *Eragrostis tenella*, *Ehretia tpinifolia*, *Megathopa villosa*, y *Pavonia sp.* actúan como fuente de begomovirus que infectan frijol común (Morales *et al.*, 2000). López-López *et al.*, (2012; 2014) y Vaca-Vaca *et al.*, (2018) identificaron arvenses asociados al cultivo de tomate en Valle del Cauca que eran hospederos de begomovirus: *Desmodium sp.*, *Amaranthus dibiis*, *Laportea aestuans*, *Rivina humilis*, *Lantana camara*, *Hybanthus attenuatus*, *Vervena sp.*, *Crotón hirtus*, *Petiveria alliacea*, *Amaranthus dubius*, *Rhynchosia minima*, *Rivina humilis*, *Desmodium sp.*, *Caesalpinia sp.* y *Plumbago sp.* Razón por la cual, podríamos decir que cabe la posibilidad de que estos virus aislados de cultivos de ají, pudieron haber estado latentes en las arvenses; y con la llegada y adaptación de *B. tabaci* biotipo B a nuevos agro ecosistemas, se diseminaron a cultivos de interés agronómico como tomate, frijol, maracuyá y ahora a cultivos de ají en el Valle del Cauca. Todos los resultados hasta aquí expuestos apoyan la hipótesis de que el virus aislado de ají en Valle del Cauca podría ser una nueva especie begomoviral. Actualmente, se está trabajando en la obtención del genoma completo de este virus para utilizarlo como fuente de inóculo para evaluar colecciones de ají en la búsqueda de un cultivar de ají resistente a este nuevo begomovirus.

CONCLUSIONES

Se detectó la presencia de begomovirus en cultivos de ají de las variedades cayena, habanero, tabasco y jalapeño, ubicados en diez municipios del Valle del Cauca (Colombia) productores de esta solanácea, con un porcentaje de infección por begomovirus del 85,7 %. Esto se constituye en el primer reporte de un begomovirus infectando cultivos de ají en Valle del Cauca y Colombia.

Se caracterizaron a nivel molecular dos fragmentos begomovirales de 1,4 kb aislados de ají habanero colectado en Palmira y Vijes (Valle del Cauca), respectivamente. Los

análisis bioinformáticos indicaron que estos begomovirus eran diferentes a otros previamente reportados que limitan la producción de ají en el mundo; y que están más relacionados con virus endémicos del Valle del Cauca, PLDV y BDMV, virus que infectan maracuyá y frijol, respectivamente. Estos análisis estarían indicando que este begomovirus que infecta cultivos de ají podría ser una nueva especie que no ha sido reportada en el mundo.

Los resultados de este trabajo de investigación sirven de materia prima esencial para implementar estrategias de manejo integrado que permitan reducir la infección y diseminación de este begomovirus en cultivos de ají en el departamento, y el país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Sistema General de Regalías de Colombia por la financiación del proyecto CIBioFi (Código BPIN 2013000100007), a Colciencias, la Gobernación del Valle del Cauca y a Hugo Restrepo & Cia. S. A. A la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por la financiación parcial de este trabajo de investigación a través del Proyecto código Hermes 43908.

REFERENCIAS

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25(17):3389-3402. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Ambrozevicius LP, Calegario RF, Fontes E, Carvalho M, Zerbini FM. Genetic diversity of Begomovirus infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Fitopatol Bras.* 2002;27(4):372-377. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-41582002000400006>
- Baral J, Bosland PW. Genetic Diversity of a Capsicum Germplasm Collection from Nepal as Determined by Randomly Amplified Polymorphic DNA Markers. *J Am Soc Hortic Sci.* 2002;127(3):318-324. Doi: <https://doi.org/10.21273/jashs.127.3.318>
- Brown J, Campodonico O, Nelson M. A whitefly-transmitted geminivirus from peppers with tigré disease. *Plant Dis.* 1989;73(7):610. Doi: <https://doi.org/10.1094/PD-73-0610E>
- Brown JK. Taxonomy, Molecular Systematics, and Gene Flow in the Bemisia tabaci Complex and Bemisia Relatives. In: Stansly PA, and Naranjo SE, editors. *Bemisia: Bionomics and Management of a Global Pest.* London, New York: Springer Science and Business Media B. V; 2010. p. 1-4.
- Brown JK, Zerbini FM, Navas-Castillo J, Moriones E, Ramos-Sobrinho R, Silva JC F, *et al.* Revision of Begomovirus taxonomy based on pairwise sequence comparisons. *Arch Virol.* 2015;160(6):1593-1619. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-y>

- Corporación Colombia Internacional (CCI). Plan Hortícola Nacional [online] 2006. Disponible en: http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_28_PHN.pdf [Citado: 3 Abr 2019].
- Doyle JJ, and Doyle JL. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*. 1987;19:11-15.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2013. FAOSTAT-Producción agrícola [online]. Disponible en: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD> [Citado: 3 Abr 2019].
- Gálvez G E, Castaño M, Belalcázar Silvio. Presencia de los virus del mosaico dorado y del moteado clorótico del frijol en Colombia. *ASCOLFI Informa (Colombia)*. 1975;1(2):3-4.
- Hernández-Espinal LA, Enríquez-Verdugo I, Melgoza-Villagómez CM, Retes-Manjarrez JE, Velarde-Félix S, Linares-Flores PJ, Garzón-Tiznado JA. Análisis filogenético y distribución de Begomovirus en el cultivo del Chile (*Capsicum annuum* L.) en Sinaloa, México. *Rev Fitotec Mex*. 2018;41(2):149-157.
- Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F. Viral and Cellular Factors Involved in Phloem Transport of Plant Viruses. *Front Plant Sci*. 2013;4(154):1-24. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00154>.
- Kenyon L, Kumar S, Tsai WS, Hughes J. Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Adv. Virus Res*. 2014;90:297-354. Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8>
- Kumar S, Stecher G, Tamura K, Dudley J. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets Downloaded from. *Mol. Biol. Evol*. 2016;33(7):1870-1874. Doi: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan P A, McWilliam H, Higgins D G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. 2007;23(21):2947-2948. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- López-López K, Otavo-Fiscal D, Vaca-Vaca JC. Búsqueda de hospederos alternativos del virus del mosaico amarillo de la papa, un begomovirus que afecta cultivos de tomate en el Valle del Cauca. *Acta Agron*. 2012;61(5):24-25.
- López-López K, Jara-Tejada F, Vaca-Vaca JC. Nuevos hospederos alternativos de Begomovirus identificados en Valle del Cauca. *Fitopatol Colomb*. 2014;38(1):19-23.
- Lotrakul P, Valverde RA, De La Torre R, Sim J, Gomez A. Occurrence of a Strain of Texas pepper virus in Tabasco and Habanero Pepper in Costa Rica. *Plant Dis*. 2000;84(2):168-172. Doi: <https://doi.org/10.1094/pdis.2000.84.2.168>
- Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR). Agronet, producción y agronegocios, producción nacional por producto, ají. [online]. 2017. Disponible en: https://www.agronet.gov.co/Documents/21-AJ%C3%8D_2017.pdf [Citado: 16 Abr 2019].
- Martínez Y, Quiñones M, Fonseca D, Potter JL, Maxwell, DP. First Report of Tomato yellow leaf curl virus Associated with Beans, *Phaseolus vulgaris*, in Cuba. *Plant Dis*. 2002;86(7):814-814. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.7.814D>
- Martínez A, Sánchez S, Cáceres F, Aragón L, Navas J, Moriones E. Characterization and genetic diversity of pepper leafroll virus, a new bipartite begomovirus infecting pepper, bean and tomato in Peru. *Ann Appl Biol*. 2013;164(1):62-72. Doi: <https://doi.org/10.1111/aab.12074>
- Martínez Y, Marrero Y, Pupo C, Miranda I, Galindo, I. Caracterización molecular de la especie invasiva Middle East-Asia minor one (MEAM1) de Bemisia tabaci (Gennadius), presente en Cuba. *Rev Prot Veg*. 2016;31(2):81-86.
- Mauricio-Castillo JA, Arguello-Astorga GR, Ambriz-Granados S, Alpuche-Solis AG, Monreal-Vargas C. First Report of Tomato golden mottle virus on *Lycopersicon esculentum* and *Solanum rostratum* in Mexico. *Plant Dis*. 2007;91(11):1513. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1513B>
- Morales FJ, Niessen A, Ramirez B, Castaño M. Isolation and Partial Characterization of a Geminivirus Causing Bean Dwarf Mosaic. *Phytopathology*. 1990;80(1):96-101. Doi: <https://dx.doi.org/10.1094/Phyto-80-96>
- Morales FJ, Muñoz C, Castaño M, Velazco AC. Geminivirus transmitidos por mosca blanca en Colombia. *Fitopatol Colomb*. 2000;24(2):95-98.
- Muhire BM, Varsani A, Martin DP. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *Plos One*. 2014;9(9):e108277. Doi: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0108277>
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, Santiago-Valentin E, Garcia VF, Collier SM. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon*. 2008;57(4):1159-1181.
- Quiñones M, Fonseca D, Accotto G, Martínez Y. Viral infection associated with the presence of begomovirus in pepper plants in Cuba. *Rev Prot Veg*. 2001;16(2/3):147-151.
- Quintero C, Rendon F, Garcia J, Cardona C, Lopez A, Hernandez P. Especies y biotipos de moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en cultivos semestrales de Colombia y Ecuador. *Rev Colomb Entomol*. 2001;23(1):148-156. Doi: <https://doi.org/10.1057/9780230248359>
- Roberts PD, Adkins S, Pernezny K, Jones JB. Diseases of Pepper and their Management (Vol. II). Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 2004. p. 375.
- Rodríguez I, Morales H, Bueno JM, Cardona C. El biotipo B de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) adquiere mayor importancia en el Valle del Cauca. *Rev Colomb Entomol*. 2005;31(1):21-28.
- Rodríguez IV, Bueno JM, Cardona C, Morales H. Biotipo b de *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae): Plaga de pimentón en el Valle del Cauca, Colombia. *Rev Colomb Entomol*. 2012;38(1):14-22.

- Roye ME, Wernecke ME, McLaughlin WA, Nakhla MK, Maxwell DP. Tomato dwarf leaf curl virus, a new bipartite geminivirus associated with tomatoes and peppers in Jamaica and mixed infection with tomato yellow leaf curl virus. *Plant Pathol.* 1999;48(3):370-378. Doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1999.00355.x>
- Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 1987;4(4):406-425. Doi: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sambrook J, Russell D. *Molecular cloning: A laboratory manual* (3rd edn). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001; 2343 pp.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *PNAS.* 2004;101(30):11030-11035. Doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101>
- Torres I, Tiznado JA, Herrera L, Rivera RF. Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: Analysis and comparison with bipartite geminiviruses. *J Gen Virol.* 1993;74(10):2225-2231. Doi: <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-10-2225>
- Umaharan P, Padidam M, Phelps RH, Beachy RN, Fauquet CM. Distribution and Diversity of Geminiviruses in Trinidad and Tobago. *Phytopathology.* 1998;88(12):1262-1268. Doi: <https://doi.org/10.1094/phyto.1998.88.12.1262>
- Urbino C, Polston JE, Patte CP, Caruana M. Characterization and genetic diversity of Potato yellow mosaic virus from the Caribbean. *Arch Virol.* 2004;149:417-424. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0220-8>
- Vaca-Vaca JC, Betancur JF, López-López K. Distribución y diversidad genética de Begomovirus que infectan tomate (*Solanum lycopersicum* L) en Colombia. *Rev Colomb Biotecnol.* 2012;14(1):1-17. Doi: <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote>
- Vaca-Vaca JC, Carrasco EC, Lopez-Lopez K. Molecular identification of a new begomovirus infecting yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) in Colombia. *Arch Virol.* 2017;162(2):573-576. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3098-y>
- Vaca-Vaca JC, Jara F, López-López K. Croton golden mosaic virus: a new bipartite begomovirus isolated from *Croton hirtus* in Colombia. *Arch Virol.* 2018; 163(11):3199-3202. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3989-1>
- Yoon JB, Do JW, Park HG, Yang DC, Park HG. Interspecific cross compatibility among five domesticated species of *Capsicum* Genus. *J Kor Soc Hort Sci.* 2004;45(6):324-329.
- Zambrano K, Geraud F, Chirinos D, Romay G, Marys E. Tomato chlorotic leaf distortion virus, a new bipartite begomovirus infecting *Solanum lycopersicum* and *Capsicum chinense* in Venezuela. *Arch Virol.* 2011;156(12):2263-2266. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1093-x>
- Zambrano K, Fernández-Rodríguez T, Marys E. Molecular characterization of a new begomovirus that infects *Euphorbia heterophylla* and *Solanum lycopersicum* in Venezuela. *Arch Virol.* 2012;157(2):379-382. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1157-y>