



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Tecnológico Nacional de México

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE GUASAVE

TESIS

Optimización de métodos de inoculación de clones
infectivos derivados de begomovirus recalcitrantes

Presentada por:

Juan Manuel Valle Vázquez

Como requisito para la obtención del grado de
Ingeniero en Innovación Agrícola Sustentable

Director(a) de Tesis

MC. Arikani Soberanes Félix

Codirector(a) de Tesis

Dra. Ángela Paulina Arce Leal



Guasave, Sinaloa, México; junio de 2026.

	LIBERACIÓN DE PROYECTO PARA TITULACIÓN INTEGRAL PLAN 2015	Responsable: Jefatura de División de Ciencias
	Referencia a la Norma: ISO 9001:2015 8.1;8.2.1;8.2.2;8.2.3;8.5.1;8.5.2;8.6;8.7.2	Código: ITSG-SIG-AO-PO-19-03
	Referencia a la Norma: ISO 21001:2018 8.1;8.1.1;8.1.2;8.2.1;8.2.2;8.2.3;8.3.3;8.3.4;8.6;8.7;9.1.2	Revisión: 5
		Fecha de Emisión: Julio 2025
		Página 1 de 1

Guasave, Sinaloa, Fecha: 14 de julio de 2026

ASUNTO: Liberación de proyecto para titulación integral

ING. LAURA BEATRÍZ INZUNZA RAMÍREZ
COORDINACIÓN DE TITULACIÓN
PRESENTE

Por este medio informo que ha sido liberado el siguiente proyecto para la titulación integral:

Nombre del estudiante y/o egresado(a):	Juan Manuel Valle Vazquez
Carrera:	Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable
Número de control:	2125010160
Nombre del proyecto:	Optimización de métodos de inoculación de clones infectivos derivados de begomovirus recalcitrantes
Producto:	Tesis

Solo para la Opción de tesis:

Estudiante y/o egresado(a):

CURP	VAVJ030111HSL LZNA5
------	---------------------

Asesor(a):

Nombre completo	Arikani Soberanes Félix
CVU	415257

Agradezco de antemano su valioso apoyo en esta importante actividad para la formación profesional de nuestros(as) egresados(as).

ATENTAMENTE

M.C. HÉCTOR RAMIRO MENDÍVIL TRUJILLO

Nombre y firma del (de la) Jefe(a) de División de Ciencias Agronomicas

<u>M.C. Arikani Soberanes Félix</u>	<u>Dra. Flor María Ruelas González</u>	<u>Dra. Angela Paulina Arce Leal</u>
Nombre y firma del Asesor(a)	Nombre y firma del Revisor(a)	Nombre y firma del Revisor(a)

* solo aplica para el caso de tesis y tesina

C. c. p. Expediente

C. c. p. Departamento de Centro de Recurso para el Aprendizaje e Innovación.

DEDICATORIA

Dedicado a...

A mi madre y a mi padre, por su amor, apoyo incondicional y confianza, por acompañarme y ayudarme a llegar a donde estoy.

A mis Hermanas, por estar siempre a mi lado, por sus palabras de aliento y su ejemplo, que me inspiraron a seguir adelante y a convertirme en una mejor persona.

Y, de manera especial, a aquellos que hoy ya no están físicamente con nosotros, pero que su presencia, amor y enseñanzas fueron parte fundamental de este proceso. Hasta el cielo.

*Solo sé que nada se, y esa es
la mayor sabiduría del ser humano
-Sócrates*

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de lo que iban a ser 4 meses que se convirtieron a 9, conocí mucha persona, personas que jamás imaginaria conocer, sin querer o sin imaginarlo, cada una de esas personas han aportado a este proyecto, muy a la manera de cada una de ellas, pero lo hicieron, es por eso que me quiero tomar el tiempo para agradecerlos sin saber si leerán esto o no.

Gracia a Alexis, que fuiste la primera persona con la que empecé a trabajar en esto, me tuviste paciencia cuando no sabía nada de lo que estaba a punto de hacer, me enseñaste a tu modo y creo que si funciona, gracias por apoyarme en todo.

Gracia a Pahoran por haberme ayudado durante todo este proyecto, por siempre resolver dudas y darme consejos sobre lo que hacía o iba a hacer, gracias por compartir sabiduría conmigo y esa chispa que te caracteriza en todo.

Gracias a Lorenzo, que en tiempo que me toco compartir laboratorio contigo pude conocer que eras una gran persona, gracias por resolver algunas dudas de lo que desconocía por completo te extraña virología “San Lorenzo”.

Gracias a Roquito, Roque chiquito, M.C. Roque o solas llegan, gracias por darme tu apoyo cuando lo necesité, por ayudarme a entender las cosas que hacía y aconsejarme cómo hacerlo más eficiente, siempre comparte esa magia que tienes para trabajar.

Gracias a Rocote, Doc roque, el ING. Roque o el papá de Adán, gracias por dar apoyo y aliento para poder lograr las cosas, gracias por los consejos sobre lo que no sabía y trataba de hacer.

Gracias Adán, porque fuiste otro gran apoyo en todo lo realizado a lo largo de este proyecto, me enseñaste y orientaste a hacer muchas cosas dentro del laboratorio, gracias por estar a la par conmigo durante este proceso.

Gracias a Carlitos, por ayudarme y apoyarme a hacer parte de este proyecto, por siempre estar presente y cooperar en todo, gracias por eso y mucha suerte en tu nueva etapa.

Gracias al DR. Jesús, por ser un apoyo y una base para este proyecto, por respaldar siempre a todo su equipo de trabajo, que más que eso se siente como una segunda familia, gracias por el apoyo y el recibimiento.

Gracias al DR. Edgar, por apoyarme en mi proyecto, por compartir poca de su vasta sabiduría y no solo del conocimiento de la virología, gracia por ayudarme a comprender más fácil las cosas explicadas a su manera.

Gracias a la DRA. Paulina, por ser el pilar principal de todo esto, gracias por siempre apoyarme, ayudar, alentarme y orientar sobre todo el camino de este proyecto, gracias porque desde el primer día me recibió con una gran sonrisa y siempre me hizo sentirme cómodo en lo que hacía, gracias también por querer adoptarme para realizar una nueva etapa y ser parte aún más de la familia que es el laboratorio de virología de plantas.

A todos ellos muchas gracias por todo, pero, para llegar a conocer a todas estas personas, hubo alguien vital en esto, por eso también...

Gracias a la maestra Arikani o mamá kani, que gracias a ella paso toda esta aventura, gracias por tomarme en cuenta para realizar este trabajo aun cuando desconocía por completo de lo que estaba a punto de hacer, gracias por ser la maestra que fue con nosotros, gracias siempre por su apoyo, por siempre defender a sus niños y ver por nosotros, gracias porque a pesar de no siempre estar con ánimos, me pudo apoyar en lo que necesite, gracias por convertirse es esos maestros de los que nunca se pueden olvidar.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi familia, por ser parte de esto en siempre brindarme su apoyo incondicional durante este proceso, a madre y mi padre por todo, por su aliento siempre y comprensión en lo que hacía, a mis hermanas por su apoyo y siempre ver que estuviera bien, por ver siempre por mí y mis papás y por ser siempre un ejemplo para mí, y a mi novia por siempre apoyarme en mis decisiones.

A todos, GRACIAS!!

INDICE

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
INDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMEN.....	IX
ABSTRACT	X
GLOSARIO.....	XI
INTRODUCCIÓN	1
I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	2
1.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	2
II. JUSTIFICACIÓN.....	3
III. HIPÓTESIS.....	4
IV. OBJETIVOS.....	5
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	5
V. ALCANCES Y LIMITACIONES.....	6
5.1 ALCANCES	6
5.2 LIMITACIONES.....	6
VI. MARCO TEÓRICO.....	7
6.1 GEMINIVIRUS.....	7
6.2 BEGOMOVIRUS	8
6.3 SINTOMATOLOGÍA ASOCIADA A BEGOMOVIRUS	9
6.4 BEGOMOVIRUS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE TOMATE (<i>SOLANUM LYCOPERSICUM</i>) EN EL CONTINENTE AMERICANO.....	9
6.5 MÉTODOS DE TRANSMISIÓN DE LOS BEGOMOVIRUS Y APLICACIONES EXPERIMENTALES	13
6.5.1 Transmisión por insectos vectores	13
6.5.2 Generación de clones infectivos.....	14
6.5.3 Limitaciones de inoculación en especies recalcitrantes.....	17
6.5.4 Optimización de métodos de agroinoculación de especies virales recalcitrantes....	18
6.6 BIOBALÍSTICA COMO ALTERNATIVA DE INOCULACIÓN DE BEGOMOVIRUS	20
6.7 MECANISMOS DE TRANSMISIÓN VIRAL EN PLANTAS Y ESTRATEGIAS PARA SU MANEJO INTEGRADO	22
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	25
7.1 EVALUACIÓN DE LA INFECCIÓN POR BEGOMOVIRUS RECALCITRANTE (ToMHAV Y ToGMOV EN EL HOSPEDANTE EXPERIMENTAL <i>NICOTIANA BENTHAMIANA</i>	25
7.1.1.....	25

<i>Evaluación de la eficiencia de variantes de agroinoculación de ToMHaV y ToGMoV</i>	<i>25</i>
7.2.....	28
<i>Evaluación de la eficiencia de inoculación de virus recalcitrantes mediante biobalística</i>	28
7.2.1 Preparación de microcarriers y cartuchos con DNA viral.....	28
7.3.....	30
DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ToMHAV Y ToGMoV INOCULADOS DE MANERA ARTIFICIAL	30
7.3.1 Extracción de DNA.....	30
7.4 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA LA DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE VIRUS	32
7.4.1 Detección de DNA viral mediante PCR punto final empleando primers específicos	32
7.4.2 Cuantificación de DNA viral mediante PCR en tiempo real	33
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
8.1.....	35
EVALUACIÓN DE LA CALIDAD, INTEGRIDAD Y RENDIMIENTO DEL DNA A PARTIR DE <i>Nicotiana benthamiana</i> MEDIANTE CTAB.....	35
8.2.....	37
EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE INOCULACIÓN DEL VIRUS RECALCITRANTE ToMHAV.....	37
8.2.1.....	37
<i>Evaluación de métodos de agroinoculación utilizando diferentes buffers de infiltración para ToMHVA</i>.....	37
8.2.2. Evaluación de biobalística como método alternativo para la inoculación de ToMHaV	40
8.2.3.....	41
<i>Efecto de la coinfección con satélites y supresores de silenciamiento en la eficiencia de infección del ToMHaV</i>.....	41
8.3.....	43
EVALUACIÓN DE MÉTODOS DE INOCULACIÓN DEL VIRUS ToGMoV	43
8.3.1.....	43
<i>Detección molecular de ToGMoV en plantas de Nicotiana benthamiana agroinoculadas con diferentes buffers de infiltración</i>	43
8.3.2.....	44
<i>Efecto de diferentes buffers de infiltración en la carga viral de ToGMoV en Nicotiana benthamiana cuantificado por qPCR</i>.....	44
IX. CONCLUSIONES.....	47
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
XI. ANEXOS.....	58
11.2 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN Y PUREZA DE EXTRACCIONES DE DNA TOTAL DE N. BENTHAMIANA.	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia experimental para la agroinoculación de ToMHV y ToGMOV en <i>Nicotiana benthamiana</i>	26
Figura 2. Aplicación de la suspensión en las plantas modelo:	27
Figura 3: Integridad del DNA extraído en plantas de <i>N. benthamiana</i> en los distintos tratamientos.....	37
Figura 4: Evaluación de métodos de agroinoculación utilizando diferentes buffers de infiltración para ToMHaV	38
Figura 5: Evaluación de métodos de agroinoculación utilizando diferentes buffers de infiltración para ToMHaV	40
Figura 6. Evaluación de métodos de agroinoculación en coinfección con ToBRFV y un supresor de silenciamiento	42
Figura 7: Evaluación de métodos de agroinoculación utilizando diferentes buffers de infiltración para ToGMOV	44
Figura 8: Cuantificación de DNA viral de ToGMOV en planta de <i>N. benthamiana</i> ...	46

RESUMEN

Los virus vegetales constituyen una seria amenaza para los cultivos de interés agrícola a nivel mundial, siendo los virus de DNA de cadena sencilla pertenecientes al género Begomovirus (familia *Geminiviridae*), los virus fitopatógenos causantes de las enfermedades emergentes más devastadoras en la actualidad. En la naturaleza, el éxito de la transmisión de los virus vegetales radica principalmente en su capacidad de movilización horizontal por medio de insectos vectores o bien de modo vertical por medio de semillas. A nivel experimental, el estudio de la interacción planta-virus es fundamental para poder entender los mecanismos de defensa de las plantas, así como los de patogénesis por parte de los virus, para lo cual es primordial contar con métodos de inoculación artificial que permitan realizar tales estudios. Por una parte, el método de agroinoculación permite la inoculación de virus en forma de clones infectivos insertados en vectores binarios empleando a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como acarreador, y por otro lado, la técnica de biobalística basada en el bombardeo de micropartículas de oro o tungsteno recubiertas con el DNA plasmídico de los clones infectivos virales usando equipos de disparo de baja presión, constituye una metodología alternativa.

Mientras la agroinoculación constituye la mejor alternativa como método de inoculación de clones infectivos virales debido a su alta eficiencia y bajo costo, existen especies virales que resultan recalcitrantes a dicho método, mostrando bajas tasas o nula infectividad, por lo cual es necesario implementar mejoras a las condiciones de inoculación, incluyendo componentes y concentraciones de buffers empleados, inducción de virulencia de *A. tumefaciens* y uso de supresores de silenciamiento génico.

De acuerdo con lo anterior, en el presente estudio se emplearon como modelos de estudio al virus recalcitrante Tomato mosaic Havana virus (ToMHaV) y el virus Tomato golden mottle virus (ToGMoV) y como modelo vegetal *Nicotiana benthamiana*. Empleando clones infectivos de ToMHaV y de ToGMoV se llevaron a cabo protocolos alternativos de agroinoculación así como de biobalística de modo comparativo. Los resultados obtenidos muestran que mientras todos los métodos probados para la inoculación del ToGMoV resultaron exitosos, en el caso del ToMHaV la recalcitrancia de infección se mantuvo sin lograrse infecciones sistémicas exitosas. Las posibles explicaciones biológicas y/o metodológicas de tales resultados, así como posibles mejoras futuras al proceso de inoculación son discutidas.

Palabras claves:

Begomovirus, métodos de inoculación artificial, Agroinoculación, Biobalística, virus recalcitrantes.

ABSTRACT

Plant viruses pose a serious global threat to agriculturally important crops; specifically, single-stranded DNA viruses belonging to Begomovirus genus (Geminiviridae family) are currently responsible for some of the most devastating emerging plant diseases. In nature, the successful transmission of plant viruses relies primarily on horizontal movement via insect vectors or vertical transmission through seeds. Experimentally, studying plant-virus interactions is crucial for understanding both plant defense mechanisms and viral pathogenesis; consequently, reliable artificial inoculation methods are essential for such research. Agroinoculation, which involves inoculating viruses as infectious clones inserted into binary vectors using the bacterium *Agrobacterium tumefaciens* as a carrier, is one such method, while biolistics serves as an alternative approach, utilizing low-pressure delivery systems to bombard targets with gold or tungsten microparticles coated with plasmid DNA containing the infectious viral clones.

Although agroinoculation is the preferred method for inoculating infectious viral clones due to its high efficiency and low cost, certain viral species prove recalcitrant to this technique, exhibiting low or nonexistent infectivity rates. This necessitates the optimization of inoculation conditions, including the composition and concentration of buffers, the induction of *A. tumefaciens* virulence, and the use of gene silencing suppressors.

Given this, the present study used the recalcitrant Tomato mosaic Havana virus (ToMHaV) and Tomato golden mottle virus (ToGMoV) as viral models, alongside *Nicotiana benthamiana* as a plant model. Using infectious clones of ToMHaV and ToGMoV, the study conducted a comparative analysis of alternative agroinoculation and bioballistics protocols. The results show that all methods tested for ToGMoV inoculation were successful, whereas ToMHaV remained recalcitrant to infection, with no successful systemic infections achieved. Possible biological and/or methodological explanations for these results, as well as potential future improvements to the inoculation process, are discussed.

Keywords:

Begomovirus, artificial inoculation methods, agroinoculation, biolistics, recalcitrant viruses

GLOSARIO

Agrobacterium: Género de bacterias del suelo (como *Agrobacterium tumefaciens*) ampliamente utilizado en biotecnología vegetal como vector para transferir fragmentos de DNA específicos al núcleo de las células de las plantas, facilitando procesos como la agroinfiltración o agroinoculación de clones virales.

Agroinoculación: Método que utiliza bacterias del género *Agrobacterium* modificadas genéticamente para introducir un virus funcional dentro de una planta hospedera. La bacteria actúa como el vehículo que transfiere el DNA viral al núcleo de las células vegetales para iniciar la infección de manera artificial.

Biobalística: Técnica de transferencia directa de genes (o inoculación viral) que consiste en bombardear tejidos vegetales con micropartículas de metal (generalmente tungsteno u oro) recubiertas con el DNA de los clones moleculares del virus, utilizando alta presión de gas (como nitrógeno) para penetrar las paredes celulares.

Buffer (amortiguador o tampón): Solución química acuosa diseñada para mantener estables el pH y las condiciones iónicas de una mezcla. En virología y biología molecular, se utiliza para proteger el DNA, mantener viables las suspensiones bacterianas antes de infiltrarlas o asegurar que las reacciones enzimáticas (como la PCR o la electroforesis) ocurran sin contratiempos.

Cebadores (*primers*): Secuencias cortas de nucleótidos (DNA de cadena sencilla) diseñadas específicamente para unirse de forma complementaria a una región exacta del genoma que se desea estudiar. Son indispensables en técnicas como la PCR para indicar a la enzima polimerasa dónde debe iniciar la copia y amplificación del material genético.

Clon infectivo: Copia exacta del genoma de un virus (o de sus componentes esenciales) construida en un laboratorio y ensamblada dentro de un vector de ADN (plásmido). Se le llama "infectivo" porque tiene la capacidad biológica completa de

replicarse, moverse y causar los síntomas típicos de la enfermedad una vez que se introduce en la planta diana.

DNA: Ácido desoxirribonucleico. Es la molécula que contiene las instrucciones genéticas esenciales para el desarrollo y funcionamiento de un organismo o virus. En los begomovirus, por ejemplo, este genoma es de DNA de cadena sencilla y puede estar dividido en uno (monopartita) o dos componentes moleculares llamados DNA-A y DNA-B.

Electroforesis: Técnica de laboratorio utilizada para separar, identificar y analizar fragmentos de ADN, ARN o proteínas en función de su tamaño molecular y su carga eléctrica. Se hace pasar una corriente eléctrica a través de un gel (generalmente de agarosa), forzando a las moléculas de DNA a migrar; las más pequeñas se moverán más rápido y llegarán más lejos que las grandes, permitiendo verificar si la amplificación o clonación fue exitosa.

Hospedero: Organismo vivo (como una planta de tomate o *Nicotiana benthamiana*) que provee las condiciones, nutrientes y la maquinaria celular necesarios para que un parásito o patógeno, como un virus, pueda alojarse, replicarse y sobrevivir.

Patógeno: Cualquier agente biológico (como virus, bacterias, hongos o nematodos) capaz de producir una enfermedad o daño alterando la fisiología normal de un organismo hospedero (en este caso, las plantas).

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Es una técnica de biología molecular que permite amplificar y hacer millones de copias exactas de un fragmento específico de DNA en el laboratorio a partir de una cantidad mínima de muestra.

ToGMoV: Acrónimo de *Tomato golden mottle virus* (Virus del moteado dorado del tomate). Es un begomovirus bipartita transmitido por mosca blanca que afecta a las solanáceas, caracterizado por generar un moteado amarillo o dorado intenso en el follaje.

ToMHaV: Acrónimo de *Tomato mosaic Havana virus* (Virus del mosaico de La Habana del tomate). Es un begomovirus bipartita (con componentes genómicos A y B) que infecta principalmente al cultivo de tomate, provocando síntomas severos como mosaicos y deformaciones en las hojas.

Virus: Un virus es un agente infeccioso microscópico compuesto principalmente por material genético (DNA o RNA) protegido por una cubierta de proteínas llamada cápside. Son parásitos obligados que carecen de metabolismo propio, por lo que dependen estrictamente de la maquinaria celular del hospedero (la planta) para replicarse.

INTRODUCCIÓN

La familia *Geminiviridae* está conformada por virus vegetales con genomas circulares de cadena sencilla (ssDNA) que oscilan entre 2.5 y 5.2 kb de tamaño, los cuales se encuentran encapsidados en partículas geminadas icosaédricas. La familia *Geminiviridae* está dividida en 15 géneros en función de su rango de hospederos, tipo de insecto vector, organización genómica y relaciones filogenéticas. (Fiallo-Olivé et al. 2021). Los miembros del género *Begomovirus* transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), con más de 440 especies reportadas, son el grupo de geminivirus causantes de las enfermedades emergentes más devastadoras en cultivos de interés agrícola en las regiones productoras localizadas en las zonas tropicales y subtropicales a nivel mundial (Rojas et al. 2018).

Con la finalidad de estudiar la interacción planta-begomovirus en detalle, se han realizado esfuerzos considerables en la construcción de clones infectivos adaptados al sistema de inoculación artificial asistido por *Agrobacterium tumefaciens*. Sin embargo, ha sido documentado que existen begomovirus cuya inoculación resulta recalcitrante empleando el sistema clásico de agroinoculación, resultando en bajas tasas de infección o bien ausencia de esta. En este sentido, recientemente ha sido reportado un protocolo mejorado de agroinoculación de clones infectivos de begomovirus que anteriormente habían mostrado recalcitrancia a la infección, estableciéndose así una importante mejora técnica en tales modelos de interacción planta-virus.

De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se empleó como modelo el begomovirus Tomato mosaic La Habana virus (ToMHaV), cuyo clon agroinfectivo ha mostrado resistencia a la infección. Adicionalmente, de modo paralelo se empleó la técnica de biobalística como una alternativa de inoculación artificial. Empleando como modelo experimental la planta *Nicotiana benthamiana*, se pretende estandarizar las condiciones necesarias para lograr una infección sistémica que pueda ser observable a nivel fenotípico y/o por detección molecular.

I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La agroinoculación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* así como la biobalística, constituyen las técnicas estándar de inoculación artificial para el estudio de la infectividad de los begomovirus. No obstante, diversas especies virales y cultivares específicas presentan una marcada recalcitrancia frente a los métodos de inoculación tradicionales. Si bien se ha documentado que, en el caso de la agroinoculación, la optimización de variables químicas y fisiológicas —tales como la composición de las soluciones de suspensión y el uso de inductores de virulencia— puede mitigar esta barrera, actualmente no existe un protocolo estandarizado que asegure una eficiencia de infección reproducible en sistemas planta-patógeno severamente recalcitrantes. Esta limitación metodológica es particularmente evidente en el estudio del Tomato mosaic Havana virus (ToMHaV), donde la baja tasa de éxito de infección induce inconsistencias experimentales y restringe significativamente el avance de la investigación fitopatológica de esta especie.

1.1 Pregunta de investigación

¿Es posible establecer un protocolo de agroinoculación y biobalística estandarizado y reproducible que garantice la infección de sistemas vegetales con begomovirus recalcitrantes como modelo de interacción planta-virus?

II. JUSTIFICACIÓN

Los virus de DNA del género *Begomovirus*, transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), representan uno de los grupos de fitopatógenos emergentes con mayor impacto económico y social a nivel global. La expansión de su vector hacia nuevos nichos ecológicos, impulsada por el cambio climático y la globalización, ha exacerbado la incidencia de brotes epidémicos que comprometen la seguridad alimentaria. En este contexto, resulta imperativo profundizar en el estudio de la interacción planta-virus para desarrollar herramientas de diagnóstico y estrategias de control más eficientes.

A pesar de su importancia, la generación de clones infecciosos y el diseño de métodos de inoculación eficaces constituyen actualmente un cuello de botella en la virología vegetal. Si bien la agroinoculación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es la técnica predominante, diversos begomovirus muestran una marcada resistencia o recalcitrancia a los protocolos convencionales. Sin embargo, avances recientes en la optimización de estos métodos sugieren la posibilidad de infectar sistemas anteriormente considerados inviables. El presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar protocolos de agroinoculación así como biobalísticos para begomovirus recalcitrantes, con la finalidad de establecer una base metodológica robusta tanto para la investigación básica como para el fortalecimiento de programas de mejoramiento genético.

III. HIPÓTESIS

La estandarización de protocolos de agroinoculación y biobalística específicos para begomovirus recalcitrantes permitirá establecer una metodología reproducible para evaluar la infectividad y patogenicidad de estos virus.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Optimizar métodos de inoculación de clones infectivos derivados de begomovirus recalcitrantes.

4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar y estandarizar protocolos de agroinoculación alternativos para superar la barrera de infección en begomovirus recalcitrantes.
2. Evaluar el método de inoculación por biobalística como alternativa para realizar la infección de begomovirus recalcitrantes.
3. Determinar la eficiencia de los protocolos optimizados mediante el análisis del desarrollo de síntomas y la detección de la carga viral por técnicas moleculares

V. ALCANCES Y LIMITACIONES

5.1 Alcances

El presente proyecto se limita al desarrollo y la optimización de un protocolo de agroinoculación, así como de biobalística que emplean clones infectivos de begomovirus recalcitrantes. Se busca generar infecciones sistémicas eficaces que sirvan como plataforma metodológica para la caracterización biológica de estas especies, cuya manipulación experimental presenta actualmente severas restricciones.

5.2 Limitaciones

La principal limitación técnico-biológica radica en la resistencia intrínseca de los virus de estudio. A pesar de la evaluación sistemática de distintas variables en el protocolo de agroinoculación, así como de biobalística, existe el riesgo de no lograr la consolidación de la infección sistémica en los hospederos modelo.

VI. MARCO TEÓRICO

6.1 Geminivirus

Los geminivirus son un grupo de virus vegetales que pueden infectar y causar enfermedades en una amplia gama de especies dicotiledóneas y monocotiledóneas en los trópicos, causando grandes pérdidas económicas, a veces de hasta el 100%, al menos desde la década de 1970, en varios cultivos alimentarios, de fibra, frutales e industriales como frijoles, yuca, algodón, maíz, tabaco, cucurbitáceas y muchas hortalizas (Rojas et al. 2018).

Los miembros de la familia Geminiviridae son diversos en cuanto a su organización genómica, secuencia, origen geográfico, gama de hospedantes, síntomas que producen y tipos de insectos vectores (Brown et al., 2015; Varsani et al., 2014). Actualmente, los geminivirus se clasifican en 15 géneros de acuerdo con el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2026). El género principal, Begomovirus, de la familia Geminiviridae, contiene al menos 445 especies distintas, mientras que el segundo género más grande, Mastrevirus, contiene alrededor de 45 especies. Las 30 especies restantes se distribuyen entre los otros géneros con solo unos pocos virus en cada uno (Fiallo-Olivé et al. 2021; Roumagnac et al. 2022).

Los geminivirus se describieron por primera vez en 1977 (Harrison et al., 1977); su nombre proviene de la morfología característica de su cápside (CP), que se asemeja a dos partículas icosaédricas gemelas. Cada partícula contiene una sola copia de una molécula de DNA circular monocatenario de aproximadamente 2600 a 3200 pares de bases de longitud (Hesketh et al. 2018). La mayoría de los geminivirus son monopartitos con un único genoma de DNA-A que contiene de 4 a 8 marcos de lectura abiertos (ORF) o genes superpuestos. Sin embargo, algunos begomovirus son bipartitos y presentan un componente adicional de DNA-B, que codifica dos ORF. Además, se encuentran DNA satélites más pequeños asociados con algunos geminivirus (Zhou 2013; Briddon et al. 2018).

6.2 Begomovirus

Los *Begomovirus* constituyen el género más estudiado, debido a los daños que han ocasionado en diversos cultivos agrícolas, lo que los convierte en un problema emergente por su gran capacidad de mutación y recombinación, lo que da como resultado un gran número de cepas y aislados (Brown *et al.*, 2015). Actualmente se conocen 445 especies de begomovirus, según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, 2026).

El nombre de este género proviene de Bean Golden Mosaic Virus (virus del mosaico dorado del frijol, BGMV), que fue la primera especie de virus identificada en este género en 1981 (Haber *et al.*, 1981). Son transmitidos a través de su insecto vector, la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae), la cual posee un amplio rango de hospederos. Los begomovirus se clasifican globalmente en dos grupos, con base en el estudio filogenético de la secuencia nucleotídica de la proteína de la cápside (Padidam *et al.*, 1995); tales grupos son: "Viejo Mundo", que incluye especies procedentes de la Cuenca Mediterránea, África, Oriente Medio, Asia y Australia; y "Nuevo Mundo", con especies procedentes del continente americano.

Dentro del ámbito del Nuevo Mundo (NW), los begomovirus exhiben una particularidad genómica que los distingue: los genomas de estos virus suelen ser bipartitas, compuestos por dos segmentos que se identifican como DNA-A y DNA-B. (Briddon *et al.*, 2010) Sin embargo, en el Viejo Mundo (OW), la mayoría de los begomovirus poseen genomas monopartitas, los cuales están constituidos por moléculas de DNA que son homólogas al componente DNA-A del begomovirus bipartita. En términos funcionales, el componente DNA-A se encarga de codificar las funciones virales esenciales para la replicación, la transcripción y la transmisión asistida por vectores tanto del DNA-A como del DNA-B virales (Briddon *et al.*, 2010).

Por otro lado, en lo que respecta al componente DNA-B, este se encarga de codificar proteínas vitales para el movimiento de las partículas virales, facilitando su transporte de célula a célula y permitiendo también su propagación a larga distancia en el tejido de las plantas hospederas. Este sistema de división genómica en

begomovirus del Nuevo Mundo y del Viejo Mundo desempeña un papel crucial en la adaptación y la interacción de estos virus con sus hospederos y vectores, influyendo en la transmisión, la patogenicidad y la evolución viral en ambos entornos geográficos (Briddon et al., 2010; Rojas et al., 2005).

6.3 Sintomatología asociada a Begomovirus

La sintomatología general causada por los begomovirus puede variar según la especie del virus y la del hospedero. Sin embargo, aquí hay algunos síntomas comunes que suelen estar asociados con las infecciones por begomovirus en las plantas: (Davis & Thompson, 2024).

Estos síntomas incluyen clorosis, caracterizada por un amarillamiento o una palidez inusual de las hojas, que suele comenzar en las hojas jóvenes. Las plantas afectadas también tienden a presentar enanismo, es decir, son más pequeñas que las plantas sanas de la misma variedad y edad (Brown et al., 2001) .

Además, las hojas pueden presentar deformidades como el enrollamiento, la torsión, el arrugamiento o incluso la formación de rosetas. Estas hojas a menudo presentan un moteado con manchas de color claro o amarillo. Los frutos producidos por plantas infectadas pueden ser más pequeños de lo normal y, a veces, presentar deformidades, lo que afecta negativamente su calidad y su valor comercial. La infección por begomovirus también puede reducir significativamente el rendimiento de los cultivos, con implicaciones económicas negativas para la agricultura (EPPO, 2022). En casos más graves, pueden observarse áreas de tejido muerto o necrosis en las hojas y los frutos.

6.4 Begomovirus que afectan el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) en el continente americano

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una de las hortalizas más importantes del mundo por su consumo y su valor comercial. Sin embargo, su producción se ve limitada por varios factores bióticos, entre ellos las enfermedades virales, que constituyen una de las principales amenazas. Actualmente, de los principales virus que infectan al tomate, la mayoría pertenecen al género Begomovirus (Hogenhout et al., 2008). Estos patógenos causan grandes pérdidas económicas en diversas agroregiones de todo el mundo, y México y Centroamérica no son la excepción.

El aumento en la incidencia y presencia de los begomovirus, observado en las últimas décadas, se debe principalmente a poblaciones inusuales de mosca blanca, a la movilización de material vegetal y a la capacidad de estos virus de generar nuevas variantes mediante mutaciones y recombinación genética (Morales & Anderson, 2001). Como resultado, las enfermedades causadas por begomovirus están entre las más devastadoras en el cultivo del tomate, reduciendo el rendimiento y afectando la calidad del cultivo, donde las pérdidas pueden ir de moderadas a totales si la infección ocurre en las primeras fases del desarrollo de la planta (Mauricio-Castillo et al., 2006). Así como aumentar los costos de producción del fruto debido a las medidas necesarias para controlar el insecto vector, lo que agrava los problemas para los productores (Ruiz-Sánchez et al., 2024).

En ese sentido, los begomovirus nativos de México pertenecen predominantemente al linaje del Nuevo Mundo (clado nativo americano), aunque la globalización y el movimiento de material vegetal han introducido linajes sumamente agresivos del Viejo Mundo. Nuestro país alberga una gran variedad de begomovirus; principalmente, las regiones productoras del noroeste de México presentan condiciones favorables para la coexistencia de múltiples begomovirus, en plantas cultivadas y no cultivadas, aumentando la probabilidad de recombinación y emergencia de nuevas variantes. (Rodríguez-Negrete et al., 2019; Ruiz-Sánchez et al., 2024). Dentro de estos virus se encuentran que afectan el cultivo de tomate en Centroamérica y México se encuentran:

- *Begomovirus capsicumhuastecoense* (PHYVV, pepper huasteco yellow vein virus): Uno de los begomovirus nativos más importantes en cultivos de interés

agrícola, principalmente en tomate y chile, donde ha causado daños virales de 40 a 60% (Garzón-Tiznado, 1995). El begomovirus PHYVV fue aislado por primera vez en 1993, en la zona de Las Huastecas, al sur de Tamaulipas, México, y se caracterizó molecularmente ese mismo año (Garzón-Tiznado et al., 1993; Torres-Pacheco et al., 1993). Actualmente, es uno de los begomovirus más diseminados en México, ya que se ha detectado en la mayor parte de los estados de la República (Torres-Pacheco et al., 1996; Rodelo-Urrego et al., 2015).

- *Begomovirus solanumseveri* (ToSLCV, tomato severe leaf curl virus): Reportado con altas incidencias tanto en campo abierto como en sistemas de invernadero (San Luis Potosí y Morelos), causando retraso en el crecimiento y enrollamiento/arrugado de las hojas en varios campos de tomate (Mauricio-Castillo et al., 2007; Bañuelos-Hernández et al., 2012).
- *Begomovirus capsicummusivi* (PepGMV, pepper golden mosaic virus): Históricamente conocido como el virus del mosaico dorado del chile. Es un virus bipartito nativo, ampliamente distribuido en México (desde el norte, en Sinaloa, hasta el sur, en Tabasco y en la Península de Yucatán). (Gracia-Medrano et al., 2022) Provoca mosaicos severos, deformación foliar y enanismo. (Carrillo-Tripp et al., 2007).
- *Begomovirus solanumlapazense* (ToChLPV, tomato chino La Paz virus): Begomovirus bipartito nativo identificado inicialmente en Baja California Sur, causante del síntoma popularmente denominado "chino del tomate", causa síntomas de clorosis, arrugamientos foliares, mosaicos y enanismo. (Holguín-Peña et al., 2010).
- *Begomovirus coheni* (TYLCV, tomato yellow leaf curl virus): Introducido del Viejo Mundo, a diferencia de los anteriores, el TYLCV es un begomovirus monopartita originario del Medio Oriente, reportado en la península de Yucatán y posteriormente en 2005 y 2006, el virus se reportó en el norte de México (estados de Sinaloa y Tamaulipas) y posteriormente se extendió al resto del país. Es altamente destructivo, capaz de provocar pérdidas del

100% si la infección ocurre en etapas tempranas (Ascencio-Ibáñez et al., 1999; Brown et al., 2006).

- *Begomovirus solanumaureivariati* (ToGMoV, tomato golden mottle virus): Identificado originalmente en Centroamérica (Guatemala), su presencia en México se confirmó de manera oficial mediante un reporte fitopatológico en el Valle de Rioverde, San Luis Potosí. En cultivos de tomate (*Solanum lycopersicum*), el ToGMoV induce síntomas severos de moteado dorado (mosaico amarillo brillante), rizado de hojas y retraso severo en el crecimiento (enanismo). Lo más destacado de la descripción de ToGMoV en México es que el virus se aisló simultáneamente de plantas de tomate y de la maleza duraznillo o antorcha (*Solanum rostratum*). Esta maleza silvestre, que crece de forma abundante en los márgenes de las zonas agrícolas del norte y centro del país, actúa como un reservorio natural crítico y reservorio invernal tanto para el virus como para el vector *Bemisia tabaci*, facilitando infecciones mixtas recurrentes en campo abierto (Mauricio-Castillo et al., 2007).
- *Begomovirus solanumhavanaense* (ToMHaV, tomato mosaic Habana virus): Fue descrito inicialmente en la región del Caribe (Cuba) y posteriormente se estableció en Jamaica, Honduras y Nicaragua (Martínez et al., 1998; Monger et al., 2008). Este begomovirus bipartita pertenece al linaje de virus americanos que afectan solanáceas y recientemente se identificó en el grupo de trabajo de virología IPN-CIIDIR Sinaloa en Oaxaca, México. En cuanto a su sintomatología, esta se confunde fácilmente con el mosaico dorado tradicional provocado por PepGMV. No obstante, los estudios moleculares han confirmado su identidad como una entidad genómica independiente. Por último, suele formar parte de la enfermedad del rizado de la hoja del tomate, en la que la recombinación genética con otros virus nativos (como el PHYVV o el ToChLPV).

Las especies descritas anteriormente son las especies de mayor impacto económico por las pérdidas económicas y la prevalencia en campo abierto e invernadero. El manejo exitoso de estas enfermedades requiere la integración de

resistencia genética, monitoreo epidemiológico, diagnóstico molecular y estrategias efectivas de control del vector.

6.5 Métodos de transmisión de los begomovirus y aplicaciones experimentales

6.5.1 Transmisión por insectos vectores

Los virus vegetales generalmente requieren un vector biológico. Es decir, necesitan un organismo que transmita el virus para la transmisión horizontal en la naturaleza (propagación de planta a planta). Entre los vectores biológicos más comunes se encuentran los insectos hemípteros, incluidos pulgones que se alimentan del floema, moscas blancas, cochinillas, saltamontes y cicadélidos. Hoy en día, la mayoría de las enfermedades emergentes que afectan a la agricultura mundial son transmitidas por insectos, y las transmitidas por moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) encabezan la lista. Los begomovirus son virus persistentes, transmitidos por moscas blancas del complejo *Bemisia tabaci* (Navas-Castillo et al., 2011).

Las moscas blancas son pequeños insectos; miden entre 1 y 3 mm de largo y deben su nombre a la cobertura de cera blanca o polvillo en sus alas y en su cuerpo. Son principalmente insectos tropicales, pero también se encuentran en todas las zonas cálidas del mundo y en los invernaderos de regiones templadas. El daño directo se debe a su alimentación del floema, lo que reduce el vigor de las plantas. Sin embargo, desde una perspectiva fitopatológica, lo más relevante es su capacidad para transmitir virus. Su transmisión puede ser circulativa no propagativa (el virus no se replica en el insecto) o propagativa (el virus sí se replica), lo cual ha sido objeto de debate. Algunas investigaciones no han hallado replicación viral en el insecto (Becker et al., 2015; Sánchez-Campos et al., 2016). No obstante, existe

evidencia de que el begomovirus TYLCV puede replicarse en *B. tabaci* (Pakkianathan et al., 2015; Wang et al., 2016).

Es importante mencionar que la transmisión por insectos depende de factores como la cantidad de virus en el insecto y la cantidad de alimento que consume (Wang et al. 2022; Janssen et al. 2022). Una sola mosca blanca al alimentarse de la planta puede dejar pequeñas cantidades de DNA viral en la hoja (Roy et al., 2021), Además, aporta efectores, moléculas producidas por el insecto que alteran los procesos de la planta. Estos efectores facilitan la alimentación y modifican las señales inmunitarias de la planta. (Xu et al., 2018; Du et al., 2022 Morin et al., 2024).

Asimismo, la proteína de la cápside (CP) desempeña un papel fundamental. Diversas investigaciones, incluidos trabajos en Geminiviridae, han demostrado que la CP no solo protege el material genético, sino que también facilita la entrada, el transporte nucleocitoplasmático y la diseminación sistémica del DNA monocatenario dentro de la planta hospedante. (Krichevsky et al. 2006).

En ese sentido, las moscas blancas representan la vía de transmisión más confiable de los begomovirus. Por ejemplo, el virus del rizado de la hoja del malvastrum de Guangdong (MLCuGdV) no pudo infectar a su hospedero natural, *Malvastrum coromandelianum*, mediante agroinfección, pero sí mediante moscas blancas (Wu et al. 2007; Guo et al. 2008). Sin embargo, mantener y manejar insectos en el laboratorio es difícil. Esto implica problemas de contención y riesgo de contaminación; además, en algunos países no se permite por normas de cuarentena. Por eso, usar métodos alternativos, como la inducción de heridas con *Agrobacterium* o el bombardeo de partículas, es la forma más simple de estudiar la interacción planta-virus y de diseñar estrategias de manejo.

6.5.2 Generación de clones infectivos

La inoculación de begomovirus en plantas mediante clones infectivos a través de *Agrobacterium tumefaciens* (un proceso conocido como agroinfiltración o

agroinoculación) es una de las técnicas más eficientes y utilizadas, ya que permite la introducción eficiente y homogénea de genomas virales clonados en vectores binarios en plantas hospederas. Esta metodología supera las limitaciones del uso de insectos vectores o de la inoculación mecánica por fricción de viriones purificados (partículas virales completas) o de DNA genómico libre (DNA viral no encapsidado), que es sumamente ineficiente o nula en la naturaleza en este género. Los clones infectivos constituyen una de las herramientas más importantes en la biología molecular de los virus de plantas (Stenger et al., 1991), ya que permiten reproducir experimentalmente ciclos completos de infección en condiciones controladas.

Asimismo, su desarrollo ha facilitado el estudio de la patogenicidad viral, la interacción virus-hospedante, la función de los genes virales, la evaluación de la resistencia genética en plantas y la validación de los postulados de Koch a nivel molecular. En particular, para los begomovirus, los clones infectivos han sido ampliamente utilizados para confirmar la etiología de enfermedades emergentes y caracterizar los mecanismos asociados con la infección, replicación y movimiento sistémico del virus.

De manera general, el vector del material genético viral, *A. tumefaciens* (actualmente denominado *Rhizobium radiobacter*), es una bacteria que causa tumores o agallas en el cuello de la raíz de las plantas dicotiledóneas. Esta bacteria, de manera natural vive en el suelo y penetra en el hospedero guiado por sustancias que la planta expulsa (fenoles; entre los más conocidos se encuentran la acetosiringona, la vainillina y el ácido p-hidroxibenzoico) a través de heridas pequeñas, ubicándose en los espacios intracelulares, desde allí transfiere parte de su material genético a la célula hospedera, un plásmido (DNA circular extracromosómico bacteriano) para transferir un segmento de DNA conocido como DNA-T que se integra en alguna zona del genoma de la planta. Este DNA-T inyectado por el *A. tumefaciens* contiene genes que inducen la producción de reguladores del crecimiento vegetal, lo que favorece el desarrollo de tumores. Asimismo, induce la síntesis de compuestos denominados opinas a partir

de metabolitos vegetales, que solo el propio patógeno puede utilizar como fuente de nutrientes (Meyer et al., 2019).

Por otro lado, los genes de virulencia (*vir*) activados por heridas de la planta hospedera codifican la maquinaria requerida (proteínas efectoras VirD1 y VirD2) que procesa el DNA-T, lo que permite que la endonucleasa VirD2 guíe el complejo nucleoproteico a través de un sistema de secreción tipo IV (complejo VirB/VirD4) hacia el núcleo de la célula vegetal, donde los genes tumorigénicos pueden integrarse en el cromosoma o expresarse de manera transitoria (Nester et al., 2014).

En este contexto, la agroinoculación con clones infectivos constituye una estrategia eficiente para introducir genomas virales en células vegetales mediante *A. tumefaciens* como vector de transferencia. Un clon infectivo es una construcción quimérica contenida en el DNA de transferencia (DNA-T) de un plásmido binario de *A. tumefaciens*. A nivel molecular, estas construcciones no pueden limitarse a un monómero lineal del genoma viral, ya que carecen de señales estructurales complejas que permitan iniciar la replicación autónoma una vez transferidas. Por ello, la literatura científica estandarizó el uso de clones multiméricos parciales (generalmente de 1.4-mer a 2.0-mer), que contienen duplicaciones consecutivas del origen de replicación viral (región intergénica) y de la horquilla conservada (stem-loop) que alberga la secuencia nonanucleotídica TAATATTAC (Lazarowitz et al., 1992). Un ejemplo es que informes detallan que una región de tallo-bucle conservada de 41 nucleótidos es esencial y suficiente para la generación del clon infeccioso del TYLCV (Urbino et al., 2008).

En los últimos años, la síntesis y validación de estos clones han pasado a metodologías de alta fidelidad. La estrategia más empleada para asegurar la integridad de virus bipartitas o monopartitas difíciles de clonar implica la amplificación por círculo rodante (RCA) con la polimerasa Phi29, seguida de una digestión y ligación dirigidas en vectores binarios estables (Review, 2021). Tras la agroinfiltración, la maquinaria de transcripción de la planta procesa el DNA-T multimérico, lo que permite que la proteína iniciadora de la replicación (Rep) del

virus reconozca los sitios repetidos y libere el genoma, simulando una infección natural en el núcleo vegetal.

6.5.3 Limitaciones de inoculación en especies recalcitrantes

A pesar de la robustez teórica de los clones infectivos, múltiples especies de begomovirus que afectan a cultivos de alto valor económico (como *solanáceas* y *cucurbitáceas*) resultan recalcitrantes frente a los métodos tradicionales de agroinfiltración; es decir, su agroinoculación es extremadamente difícil o imposible de realizar en una planta hospedera utilizando *A. tumefaciens* como vector.

Esto no responde a un evento aislado, sino a una compleja interacción de factores técnicos, biológicos y moleculares compartidos entre el patógeno viral, la bacteria vectora (*Agrobacterium spp.*) y la planta hospedera. En primer lugar, biológicamente, los begomovirus son patógenos estrictamente restringidos al tejido vascular (floema). No obstante, la agroinfiltración foliar convencional introduce la suspensión bacteriana predominantemente en las células del mesófilo y en los espacios intercelulares del parénquima esponjoso. En estas zonas, el virus a menudo es incapaz de iniciar un movimiento sistémico eficiente, particularmente si la planta activa respuestas defensivas locales, como la deposición de calosa y la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Del Toro *et al.*, 2014; Atabekova *et al.*, 2024). Esta limitación se agrava cuando existe incompatibilidad con *A. tumefaciens*, debido a la alta resistencia natural de algunas especies vegetales a la transformación bacteriana, lo que impide la liberación eficaz del genoma viral.

Por otra parte, la respuesta inmunitaria del hospedero y la arquitectura genómica del virus condicionan de forma drástica el establecimiento eficiente utilizando *A. tumefaciens* como vector. Al emplear promotores constitutivos fuertes, como el CaMV 35S, la planta puede desencadenar un mecanismo de silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) tan acelerado que, al detectar niveles elevados de RNA viral, es capaz de “abortar” la infección antes de que el virus se establezca. (Escobar *et al.*, 2013).

También se ha documentado que los hospederos con mayor complejidad genética, tales como las variedades silvestres de *Capsicum annuum* y *Solanum lycopersicum*, desencadenan una respuesta inmune innata inmediata tras el reconocimiento de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de *A. tumefaciens*. Esta vía de defensa se caracteriza por una acumulación masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la consecuente inducción de la respuesta de hipersensibilidad (HR) o de necrosis local. Este fenómeno fisiológico provoca la lisis del tejido celular infiltrado en un periodo de 24 a 48 horas, lo que interrumpe prematuramente la transferencia del DNA-T al núcleo celular. Como consecuencia, se impide la transcripción y replicación del clon viral, lo que disminuye drásticamente las tasas de incidencia sistémica a valores inferiores al 30-40% (Dabauza & Peña, 2003; García-Neria *et al.*, 2011; Veena *et al.*, 2003).

Asimismo, el éxito infectivo de ciertos begomovirus depende de factores del insecto vector, la mosca blanca, cuyos componentes salivales, como los efectores y la precisión de la punción en el tejido vascular, no pueden replicarse mediante agroinoculación (Wu *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008).

Finalmente, la complejidad del genoma de los virus bipartitas y aquellos que interactúan con DNA satélites (alfa o betasatélites) añade un nivel de dificultad técnico-biológica (Kanika *et al.*, 2022), dado que, si el clon molecular administrado carece de estos elementos o no se encuentra perfectamente balanceado, el virus se vuelve metabólicamente incompetente para desarrollar una infección sistémica.

6.5.4 Optimización de métodos de agroinoculación de especies virales recalcitrantes

De acuerdo con la reciente revisión de Möller y Maruthi (2025), los factores críticos para la agroinoculación exitosa de begomovirus, incluyen la construcción molecular del clon infectivo (como la longitud del tándem repetido o la retención de mutaciones atenuantes durante la clonación), factores fisiológicos del hospedero y parámetros metodológicos del buffer de suspensión (o de inoculación). Los autores mencionan que la interacción entre la cepa de *Agrobacterium*, la densidad óptica (DO600) de

la suspensión y las condiciones fisicoquímicas de inoculación determina si la bacteria es capaz de evadir la inmunidad innata de la planta y establecer una infección sistémica.

Sin embargo, a pesar de la estandarización de los buffers de inoculación en plantas modelo y en virus de RNA, el estudio del género Begomovirus enfrenta severas limitaciones metodológicas. De acuerdo con lo reportado por Rojas et al. (2005), estos virus poseen genomas de DNA monocatenario y un estricto tropismo tisular, restringiéndose casi exclusivamente al floema. Al no transmitirse de manera eficiente mediante inoculación mecánica (frotado de savia), la agroinoculación de clones infecciosos resulta obligatoria; sin embargo, muchas de sus plantas hospederas muestran un comportamiento recalcitrante a la infección en condiciones de laboratorio.

El éxito en la transferencia del DNA-T desde *A. tumefaciens* hacia las células del hospedero y la optimización de la agroinoculación en begomovirus recalcitrantes están estrechamente ligados a la correcta formulación del buffer de suspensión, que debe modular la respuesta inmunitaria de la planta. Debido a que el sistema de virulencia bacteriano (VirA/VirG) se activa ante estímulos que simulan una herida tisular (Stachel et al., 1985), mantener un pH ácido de 5.6 con buffer de ácido 2-(N-morfolino) etanolsulfónico, MES (Vernadé et al., 1988; Ranf et al., 2011; Wang et al., 2018; Wu y Lai, 2022) en combinación con cloruro de magnesio ($MgCl_2$) para el equilibrio osmótico, sacarosa como fuente de carbono y concentraciones elevadas de acetosiringona entre 100 y 200 μM (Kapila et al., 1997) para inducir los genes vir, incrementa significativamente la eficiencia de transferencia al suprimir parcialmente las respuestas tempranas de estrés (Liu et al., 2002). Asimismo, al inhibir la apoptosis prematura derivada de la respuesta hipersensible, se prolonga la viabilidad celular en el apoplasto durante la interacción planta-Agrobacterium (Garabagi et al., 2012). Esto genera un microambiente celular que estabiliza el tejido y optimiza la evasión y la replicación de los clones infectivos (Gelvin, 2003; Inoue-Nagata et al., 2016).

Para superar las limitaciones presentes en el tejido de difícil acceso vascular, investigaciones previas han modificado las propiedades del buffer. La incorporación de surfactantes no iónicos, como el Silwet L-77, permitió reducir la tensión superficial celular y facilitar una penetración bacteriana más profunda. Además, debido a que los hospederos recalcitrantes desencadenan un intenso estallido oxidativo frente a *Agrobacterium*, la inclusión de agentes antioxidantes, como ditioneitol (DTT) o ascorbato de sodio, en el buffer se ha convertido en una estrategia recurrente para mitigar la necrosis tisular temprana y prolongar la viabilidad celular, condición indispensable para que el clon viral inicie su replicación mediante el mecanismo de círculo rodante (Möller & Maruthi, 2025; Rojas et al., 2005).

Zhang et al. (2024) desarrollaron un sistema de agroinoculación altamente eficiente, diseñado para el virus del rizado de la hoja de la batata (sweet potato leaf curl virus, SPLCV), un begomovirus con bajas tasas de infectividad. Metodológicamente, los autores rompieron el paradigma de la suspensión bacteriana inmediata al implementar una fase de incubación prolongada (overnight) de *Agrobacterium* en un buffer potenciador de la virulencia. Este procedimiento aseguró que la maquinaria de transferencia del T-DNA estuviera completamente activa antes de la infiltración tisular. Los resultados demostraron títulos virales significativamente superiores mediante qPCR, homogeneidad en los síntomas severos y una eficiencia cercana al 100% en la coinfección de sistemas moleculares complejos (VIGS basado en deltasatélites). Este estudio aporta a la presente tesis evidencia de que el tiempo de residencia y la activación metabólica en el buffer son parámetros críticos e indispensables para superar la resistencia de los virus recalcitrantes.

6.6 Biobalística como alternativa de inoculación de begomovirus

El método de inoculación de begomovirus mediante biobalística (o bombardeo de micropartículas) es una herramienta en la virología vegetal para el estudio de este grupo de virus. Al permitir la transferencia directa de genomas virales sin necesidad

de vectores biológicos. Debido a que los begomovirus se restringen estrictamente al tejido del floema y dependen del insecto vector (*Bemisia tabaci*) para su transmisión natural, la biobalística supera la barrera mecánica celular y deposita el inóculo directamente en los sitios celulares donde el virus puede replicarse e iniciar una infección sistémica.

En términos generales, esta técnica consiste en recubrir micropartículas de alta densidad, comúnmente de oro o tungsteno, con DNA de interés para su posterior propulsión física hacia el tejido vegetal mediante el uso de gas helio a alta presión. Este método demuestra una eficiencia considerablemente mayor que la inoculación mecánica tradicional, ya que el complejo partícula-DNA se deposita directamente en el núcleo celular o en los orgánulos diana, protegiendo el material genético de la degradación por nucleasas citoplasmáticas (Levy y Czosnek, 2003; Altpeter et al., 2005). La capacidad de la biobalística para superar las restricciones de rango de hospedante impuestas por otros métodos de inoculación ha sido ampliamente documentada. Por ejemplo, el virus del mosaico de la yuca india (*Indian cassava mosaic virus*, ICMV) puede ser inoculado por vía mecánica en plantas de *Nicotiana benthamiana*, pero no es viable en *Nicotiana tabacum*. Sin embargo, el uso de la herramienta de biobalística supera esta limitación, lo que permite la transmisión y la replicación exitosas del ICMV en *N. tabacum* (Rothenstein et al., 2005).

A diferencia de la agroinoculación, la biobalística introduce DNA “desnudo”, exento de factores de virulencia bacteriana. Sin embargo, las plantas poseen sistemas de vigilancia capaces de detectar DNA exógeno en la superficie celular. La evidencia actual sugiere que el hospedero discrimina entre el DNA autólogo y el proveniente de organismos heterólogos; este último actúa como un patrón molecular que desencadena respuestas hipersensibles (HR) e inicia cascadas de resistencia sistémica adquirida (SAR) (Bhat y Ryu, 2016; Chiusano et al., 2021).

Los estudios comparativos entre las técnicas de inoculación mediante agroinfección y la herramienta de biobalística son escasos, y sus resultados varían considerablemente según el sistema y modelo utilizados. Ramos et al., (2003)

reportaron que un clon infectivo del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate de Cerdeña (tomato yellow leaf curl Sardinia virus, TYLCSV) y una variante de TYLCV fueron viables mediante *A. tumefaciens*, pero no resultaron infecciosos por la vía biolística en tomate.

En contraste, Morilla et al. (2005) demostraron que la agroinfección con una variante distinta de TYLCV no indujo síntomas en plantas de pimiento (*Capsicum annuum*). Sin embargo, el uso del bombardeo balístico permitió establecer la infección, aunque con baja incidencia.

Gasca-González et al. (2008) emplearon biobalística para inocular el virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV) en plantas de *Capsicum chinense*, logrando una eficiencia de infección del 100%. Además, detectaron el movimiento sistémico del virus tan solo cinco días después del bombardeo.

6.7 Mecanismos de transmisión viral en plantas y estrategias para su manejo integrado

Curiosamente, aunque las plantas están expuestas a muchos virus en su entorno, el desarrollo de enfermedades es una excepción en lugar de un resultado común, lo que indica un mecanismo de defensa innato de la planta contra la mayoría de los virus (A. Wang, X. Zhou, 2016).

Las enfermedades víricas en las plantas pueden propagarse a través de insectos y ácaros, actuando como intermediarios en la transmisión de los patógenos, como lo son la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*), pulgones (*Melanaphis sacchari*) y trips (*Frankliniella occidentalis*); también pueden ser dispersados mecánicamente, al estar en contacto con plantas contaminadas y manipular una planta sana o bien con el uso de una herramienta contaminada.

La lucha contra la infección viral es complicada debido a la rápida evolución de los virus y la naturaleza parasitaria obligada de los virus. Penetran en el núcleo de las

células, donde los virus utilizan las reservas internas de la planta para su reproducción (Tian y Valkonen, 2013; Jones y Naidu, 2019). Las medidas prometedoras contra los virus de las plantas incluyen programas de mejoramiento con respecto a la creación de formas resistentes a los virus, que se basan en particular en el método de selección asistida por marcadores para evaluar las defensas genéticas de una variedad, así como la creación de variedades transgénicas con alta resistencia a las enfermedades virales (Klimenko et al., 2019; Akhter et al., 2021).

Estrategias de manejo, como el uso adecuado de insecticidas y la protección de las plantas, son clave para reducir el riesgo de infección.

Para controlar las enfermedades víricas en las plantas, se pueden emplear diversas estrategias:

- Control de vectores: Muchos virus vegetales son transmitidos por insectos vectores, como áfidos, trips y moscas blancas. Controlar estos insectos mediante el uso de insecticidas, el control biológico o la eliminación de malezas hospedantes puede ayudar a reducir la propagación de los virus.
- Control de malezas y hospederos alternativos: Algunas malas hierbas pueden actuar como reservorios de virus y servir como fuente de infección para los cultivos. Mantener limpio el entorno de cultivo puede ayudar a reducir la presencia de vectores y la propagación de enfermedades virales.
- Uso de material de siembra sano: Utilizar semillas y plántulas libres de virus puede ayudar a prevenir la introducción y propagación de enfermedades virales en los cultivos.
- Resistencia genética: Desarrollar variedades de cultivos resistentes a enfermedades virales mediante la selección y mejoramiento genético puede ser una estrategia efectiva para reducir el impacto de los virus en los cultivos.
- Prácticas culturales adecuadas: Mantener un buen manejo agronómico, como la rotación de cultivos, la desinfección de herramientas agrícolas y la eliminación

de plantas infectadas, puede ayudar a reducir la propagación de enfermedades virales en los campos de cultivo

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Evaluación de la infección por begomovirus recalcitrante (ToMHaV y ToGMoV en el hospedante experimental *Nicotiana benthamiana*

El presente estudio se realizó en el laboratorio e invernaderos del grupo de virología vegetal del CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa. Se utilizaron como modelos de estudio dos virus del género Begomovirus, previamente descritos por el grupo de trabajo: tomato mosaic Habana virus (ToMHaV) de naturaleza recalcitrante a la inoculación artificial, y tomato golden mottle virus (ToGMoV). Para los ensayos de infección, se emplearon plantas de *Nicotiana benthamiana* como hospedero experimental. Las semillas correspondientes fueron germinadas y mantenidas en macetas con una mezcla de sustrato y vermiculita en proporción 3:1

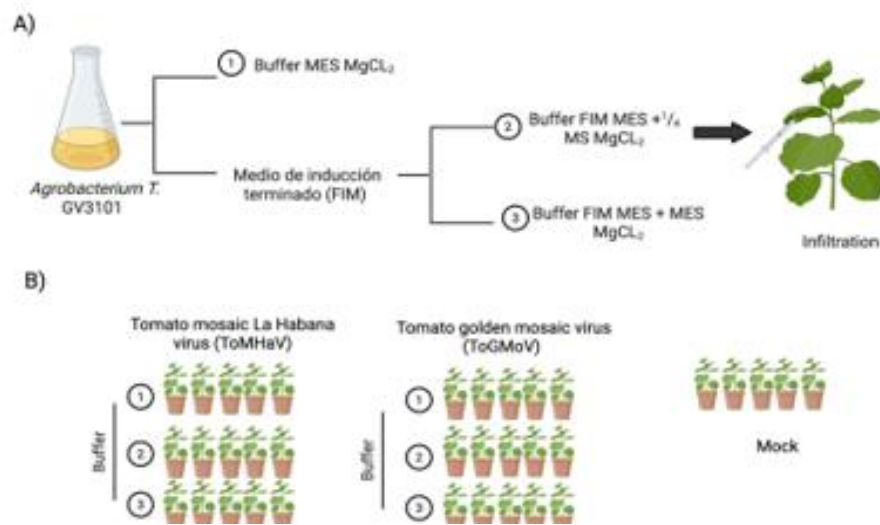
Para evaluar la eficiencia de transmisión, se emplearon dos métodos: el protocolo de agroinoculación descrito por Zhang et al. (2024) y la inoculación por biobalística (o bombardeo de partículas). Este último es un método directo para introducir material genético en células o tejidos, utilizado con frecuencia para la transformación de plantas recalcitrantes o resistentes a métodos biológicos, como el de *Agrobacterium tumefaciens*.

7.1.1 Evaluación de la eficiencia de variantes de agroinoculación de ToMHaV y ToGMoV

Para la ejecución de los ensayos de agroinoculación, se empleó el protocolo descrito por Zhang et al. (2024), como se muestra en la figura 1. En dicho estudio, se evaluaron tres variantes de buffers de infiltración:

1. Buffer MES MgCl₂
2. Buffer Medio de inducción, FIM MES + Buffer ¼ MS MgCl₂
3. Buffer Medio de inducción, FIM MES + Buffer MES MgCl₂

Figura 1. Estrategia experimental para la agroinoculación de ToMHV y ToGMoV en *Nicotiana benthamiana*



En los protocolos 2 y 3, las células de *A. tumefaciens* se centrifugaron a $2500 \times g$ durante 10 min y el sedimento resultante se resuspendió en el medio de inducción (Figura 1 A), las plantas de *Nicotiana benthamiana* se dividieron en 3 grupos, el primer grupo fue el de ToGMoV con 3 repeticiones (1 por cada buffer) de 5 plantas cada una, el segundo grupo fue el de ToMHaV con 3 repeticiones (1 por cada buffer) de 5 plantas cada una y el tercer grupo fueron las plantas MOCK como control (Figura 2 B).

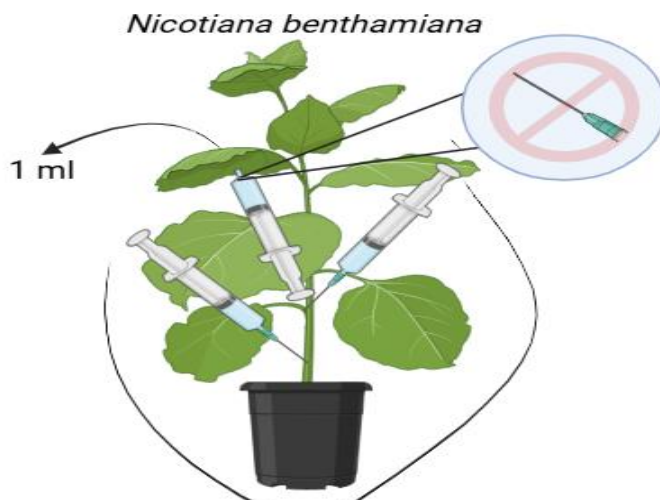
Cada clon (ToMHaV y ToGMoV, componentes A y B), previamente transformado en *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101), se cultivó en 30 ml de medio LB suplementado con rifampicina, tetraciclina y kanamicina (50, 5 y 50 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente). El cultivo se llevó a cabo en matraces estériles de 250 ml para garantizar una aireación óptima, incubando a 28 °C durante 24 h bajo agitación constante (225 rpm) hasta alcanzar la fase de saturación. Posteriormente, las células se recuperaron mediante centrifugación a 4000 rpm y 4 °C durante 15 min, ajustando el sedimento a una densidad óptica (DO600) de 1. Para el tratamiento con el buffer 1, el sedimento se resuspendió en un volumen equivalente de buffer

MES MgCl₂ y se incubó a temperatura ambiente en la oscuridad durante 12 h adicionales.

Las suspensiones se incubaron a 28 °C y 200 rpm durante toda la noche. Tras este periodo, las células se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones (2500 × g, 10 min); finalmente, el precipitado se resuspendió en buffer MES MgCl₂ para el protocolo 2 y en buffer de infiltración ¼ MS MgCl₂ para el protocolo 3.

La agroinoculación se realizó de manera uniforme en los tres protocolos, aplicando 1 ml de la suspensión en las yemas axilares, en el tallo de la planta y en el envés foliar (sin la aguja en la jeringa) de cinco plantas de *Nicotiana benthamiana* (en estadio de 8 hojas verdaderas) por cada tratamiento y virus (Figura 2). Las plantas se mantuvieron en cámaras de crecimiento BINDER® a 24 °C durante los primeros 5 días postinoculación (dpi). Posteriormente, las plantas se trasladaron a condiciones de invernadero para el monitoreo y registro del progreso de la infección. El régimen de fertilización consistió en aplicar semanalmente una solución enriquecida con micronutrientes.

Figura 3. Aplicación de la suspensión en las plantas modelo:



1 ml de la suspensión en las yemas axilares, en el tallo de la planta y 1 ml en el envés foliar sin la aguja en la jeringa

7.2 Evaluación de la eficiencia de inoculación de virus recalcitrantes mediante biobalística

7.2.1 Preparación de microcarriers y cartuchos con DNA viral

La preparación de los microcarriers y cartuchos se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del sistema de biobalística Helios® Gene Gun (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), con modificaciones menores.

Inicialmente, se pesaron 10 mg de micropartículas de tungsteno (0.6 o 1.6 μm de diámetro; Bio-Rad) en un microtubo, a las cuales se adicionaron 150 μL de espermidina 0.05 M y se sonicaron brevemente. Posteriormente, se incorporaron 50 μg de ADN plasmídico (una mezcla equimolar de 50 μL del componente genómico DNA-A y 50 μL del componente genómico DNA-B) y la suspensión se homogeneizó en un vórtex. Para inducir la precipitación del DNA sobre el metal, se agregaron 100 μL de cloruro de calcio (CaCl_2) 1 M; la mezcla se agitó en vórtex, se sonicó y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.

El complejo DNA-microcarrier se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 s para descartar el sobrenadante. El pellet resultante se lavó con 1 mL de etanol absoluto (grado de biología molecular), repitiendo este ciclo de centrifugación y lavado en dos ocasiones más. Finalmente, las partículas se resuspendieron en 3 mL de una solución de polivinilpirrolidona (PVP) al 5% en etanol absoluto y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso posterior.

Para la elaboración de los cartuchos, se introdujo un segmento de 75 cm de tubería Tefzel® (Bio-Rad) en la estación de preparación de cartuchos (*Tubing Prep Station*; Bio-Rad). El sistema se purgó con un flujo constante de nitrógeno gaseoso durante 30 min para eliminar los residuos de humedad de la pared interna. Tras el secado, al tubo se le cargaron 3 mL de la suspensión de microcarriers previamente homogeneizada, empleando una jeringa de 10 mL, evitando la introducción de burbujas.

La manguera de Tefzel® se mantuvo en reposo durante 5 min para permitir la sedimentación de las partículas. Transcurrido este tiempo, el etanol se extrajo a una velocidad controlada de 4 a 5 mL/min mediante jeringa. Una vez desconectada, se procedió a la distribución homogénea del tungsteno mediante una serie de giros manuales controlados: una rotación inicial de 90° durante 2 s, seguida de un giro de 180° durante 2 s, una vuelta adicional de 90° durante 2 s y, finalmente, una rotación concéntrica completa automatizada durante 5 s.

Inmediatamente después, se restableció el flujo de nitrógeno gaseoso y se mantuvo la rotación continua durante 5 min para consolidar el secado del recubrimiento interno. Concluido el proceso, la tubería se extrajo y se seccionó en cartuchos de medida uniforme mediante el cortador especializado del fabricante. Los cartuchos terminados se resguardaron a 4 °C en viales herméticos provistos de desecante de sílice hasta el momento de la inoculación.

7.2.1.1 Inoculación de ToMHaV mediante biobalística

Para los ensayos de infectividad con el DNA plasmídico de los clones infectivos de los virus ToMHaV, se emplearon 10 réplicas biológicas, las cuales consistían en plantas jóvenes de *N. benthamiana*. El tejido foliar fue bombardeado con el sistema Helios® Gene Gun. Las descargas se efectuaron siguiendo el protocolo general del fabricante, aplicando dos disparos con presiones de helio (220 libras por pulgada cuadrada; Pounds per-Square Inch - psi).

Tras el bombardeo, las plantas inoculadas se mantuvieron en cámaras de crecimiento BINDER® a 28 °C durante los primeros 5 días post inoculación (dpi). Posteriormente, las plantas se trasladaron a condiciones de invernadero para el monitoreo y registro del progreso de la infección. El régimen de fertilización consistió en aplicar semanalmente una solución enriquecida con micronutrientes.

Finalmente, se realizó un monitoreo diario de las plantas experimentales para registrar cronológicamente la aparición de los primeros síntomas fitopatológicos.

7.3 Detección y cuantificación de ToMHaV y ToGMoV inoculados de manera artificial

7.3.1 Extracción de DNA

La obtención de DNA total se realizó mediante el método de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) al 3% (Zhang *et al.*, 1998) previamente descrito. Aproximadamente 100 mg de tejido liofilizado y pulverizado se homogeneizó en 200 μ L de Buffer CTAB (NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8, mercaptoetanol 0.2%) con la ayuda de un pistilo miniatura de plástico. Posteriormente, se adicionaron 600 μ L de Buffer y se incubaron las muestras a 60 °C durante 30 minutos, agitando por inversión cada 5 min para lograr una mejor homogeneización. Después, se adicionaron 600 μ L de una solución cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v); las muestras se mezclaron vigorosamente con un agitador de vórtice, se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min, y la fase acuosa se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 mL. A la fase recuperada se añadieron 20 μ L de RNAsa (1 μ g/ml) y las muestras se incubaron a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se realizó una segunda extracción orgánica, adicionando 600 μ L de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1, v/v); las muestras se agitaron en un agitador tipo vórtex y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y, para obtener la precipitación del DNA, se adicionó un volumen de isopropanol al 100%. Las muestras se agitaron suavemente por inversión y se centrifugaron durante 8 min a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante por decantación; la pastilla que contenía el DNA se lavó con 1 ml de etanol al 70% (previamente enfriado a -20 °C) y se centrifugó a 13000 rpm durante 3 min. Finalmente, se retiró el sobrenadante, conservando la pastilla, y se dejó secar sobre papel a temperatura ambiente hasta la eliminación de los restos de etanol (aproximadamente 2 h). Al estar completamente seca la pastilla de DNA, esta se resuspendió cuidadosamente en 30 μ L de agua bidestilada estéril y se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

7.3.1.1 Determinación de concentración y pureza del DNA total.

La cuantificación del DNA se realizó en un espectrofotómetro de microvolumen (NanoDrop 2000, Thermo Scientific™). Esta práctica de laboratorio utiliza la Ley de Lambert-Beer para determinar la concentración de ácidos nucleicos. La cual calcula la concentración, ya que el coeficiente de extinción estándar para el DNA {de doble cadena asume que una unidad de absorbancia A_{260} nm equivale a una concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$. La relación de absorbancias (A_{260}/A_{280}) nm sirve como indicador principal de la pureza. Un valor cercano a 1.8–2.0 en la relación A_{260}/A_{280} se consideró indicativo de una muestra libre de proteínas y compuestos fenólicos. Asimismo, un cociente A_{260}/A_{230} cercano a 2.0 se empleó como criterio para asegurar la ausencia de contaminantes como carbohidratos, EDTA o tiocianato de guanidina, que podrían interferir en las aplicaciones moleculares posteriores.

Para la lectura, se calibró el equipo (blanco) con 1 μL de agua bidestilada estéril y luego se midió 1 μL de cada muestra para obtener la concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$. Finalmente, la integridad del DNA se corroboró mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta

7.3.1.2 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon al 1 % en peso sobre volumen (w/v). La cantidad correspondiente de agarosa se disolvió en 100 ml de una solución buffer TAE 1X (Tris–acetato 40 mM, pH 8.0, EDTA 1 mM) aplicando calor en un horno de microondas hasta fundirse, se dejó enfriar aproximadamente 3 min y se le agregó 1 μL de bromuro de etidio (10 mg/ml) como agente intercalante y de tinción del DNA. La mezcla se vertió sobre una base de geles y se eliminaron las burbujas. Posteriormente, se colocó un peine para formar los pozos y se dejó enfriar. Una vez gelificada la agarosa, se retiró el peine con cuidado y se colocó el gel en una cámara de electroforesis con TAE al 1X. El DNA se cargó en los pozos, mezclando las muestras con buffer de carga 2X (azul de bromofenol al 0.25 %, xilencianol al 0.25

%, glicerol al 30 %) en una proporción 1:5 (DNA: buffer de carga). La separación electroforética se llevó a cabo a 90 V, 300 mA y el tiempo varió de 30 a 50 min para DNA total y productos de PCR. Las imágenes se digitalizaron y editaron con el software Image-Lab (Bio-Rad, USA).

7.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección y cuantificación de virus

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de los métodos de inoculación empleados, se llevó a cabo un diagnóstico molecular por medio de PCR punto final para la detección de ToMHaV y ToGMoV. Además, la carga viral de ToGMoV se cuantificó mediante PCR en tiempo real (qPCR) en las distintas plantas analizadas.

7.4.1 Detección de DNA viral mediante PCR punto final empleando primers específicos

Para corroborar la infección viral en las plantas agroinoculadas en el bioensayo de, se tomó tejido apical a los 14 y 35 días después de la inoculación, a partir del DNA previamente obtenido se realizó una PCR punto final con primers específicos (Tabla 1). Para la detección de ToMHaV y ToGMoV se emplearon los primers que generan un amplicón de 1151 y 1209 pb, respectivamente, previamente reportados (Guevara-Rivera in press).

Tabla 1. Primers utilizados en la detección de ToMHaV y ToGMoV:

Virus	Primers	Secuencia	pb	cita
ToMHaV	ToMHV-A seq-F	CCTAAGCGTGATTTGCCATGG	1151	Guevara- Rivera in press
	ToMHV-A seq-R	GGCATGGATTACGCACAGG		
ToGMoV	ToGMoV-A-F	GTGAGCGAGCATAGTGGG	1209	
	ToGMoV-A-R	AAACCATATGTAAATCACG		

Los productos de PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1%, a 90 V, 300 mA durante 1 hora, y finalmente se digitalizaron y editaron con el equipo y software previamente descritos.

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador (Veriti® Thermal Cycler, Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 1 ciclo "hot start" a 95 °C durante 4 min, 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. Finalmente, 1 ciclo adicional de 720 °C durante 5 min.

7.4.2 Cuantificación de DNA viral mediante PCR en tiempo real

La cuantificación de la carga viral se realizó mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). El ensayo se llevó a cabo mediante cuantificación absoluta, empleando diluciones seriadas en un rango de 1×10^7 a 1×10^3 moléculas virales (contenidas en constructos monoméricos del componente DNA-A de ToGMoV clonados en el vector pGreen 0029) para obtener una curva estándar para cada virus. La curva estándar se obtuvo mediante análisis de regresión lineal de los valores del ciclo de cuantificación (Cq) frente al logaritmo base 10 (Log10) de las distintas concentraciones. La eficiencia de la PCR se calculó mediante la siguiente fórmula: $E = 10^{-1/m}$, donde E es la eficiencia y m es la pendiente de la curva estándar. El porcentaje de eficiencia se obtiene mediante la fórmula: $\%E = (E-1) \times 100$. Una pendiente (m) ideal de -3.3 indica una eficiencia del 100%. La cuantificación de la carga viral se obtuvo mediante la extrapolación de los valores Cq de las muestras analizadas a la curva estándar correspondiente.

Para la cuantificación de ToGMoV se usaron los conjuntos de *primers* para qPCR ToGMoV-F (GCAGTCTGCTGGCCTCC) y ToGMoV-R (GAACGAACGACAGTTTCGACC), que generan un amplicón de 177 pb.

Para normalizar los valores obtenidos, se empleó el gen de referencia EF1- α con los *primers* EF α 1-F (5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTCTGTC-3') y EF α 1-R (5'-AGCTTCGTGGTGCATCTC-3'), previamente reportados (Rotenberg *et al.*, 2006).

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 20 µl, empleando el reactivo Ssofast™ EvaGreen Supermix (Bio-Rad®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada reacción se preparó con 10 µl de EvaGreen Supermix, 1 µl de cada uno de los primers a 10 pmol/µl, 6 µl de H₂O ultrapura y 2 µl de DNA (100 ng). Se emplearon las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo a 95 °C durante 30 segundos, y 40 ciclos de 95 °C durante 10 segundos y 58 °C durante 30 segundos. Para corroborar la obtención de un solo producto de amplificación, se realizó una curva de melting mediante un paso final posterior a la PCR de 60 ciclos, con incrementos de 0,5 °C cada uno, en un rango de 60 a 90 °C. Los resultados obtenidos se expresaron como moléculas virales por cada 100 ng de DNA total de la planta infectada.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En ensayos previos realizados por el grupo de trabajo del Laboratorio de Virología CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa mediante la metodología tradicional de agroinoculación, el virus ToMHaV resultó recalcitrante. Con la finalidad de generar infecciones sistémicas exitosas en esta especie viral, el presente estudio evaluó variantes de la metodología basadas en protocolos descritos en la literatura. Como control paralelo, se empleó el virus ToGMoV, que previamente ha demostrado su infectividad sistémica en distintos modelos vegetales mediante agroinoculación convencional.

Se evaluaron tres métodos experimentales para determinar cuál de ellos propiciaba la mayor acumulación viral en el hospedero *Nicotiana benthamiana*, un modelo altamente susceptible a diversos patógenos debido a las características de su sistema inmune. Para ello, se emplearon tres buffers de infiltración (Figura 1 A), descritos por Zhang et al. (2024), para la introducción de ToGMoV y ToMHaV mediante la cepa GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*.

8.1 Evaluación de la calidad, integridad y rendimiento del DNA a partir de *Nicotiana benthamiana* mediante CTAB

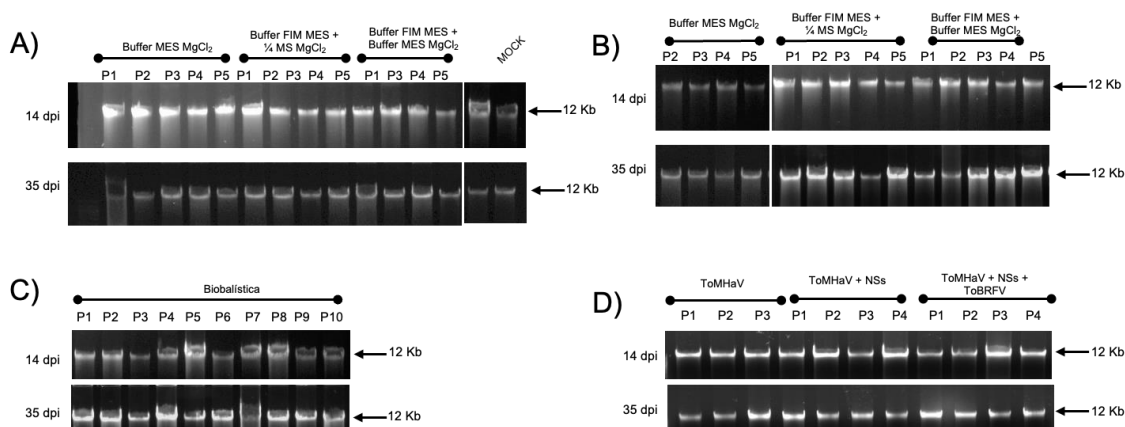
La obtención de ácidos nucleicos de alta calidad a partir de *Nicotiana benthamiana* constituye el primer paso para poder contar con el material biológico necesario para realizar los posteriores análisis moleculares de forma exitosa. Si bien *N. benthamiana* es reconocida como la planta modelo por excelencia debido a su alta susceptibilidad a la infección por virus fitopatógenos (Goodin et al., 2008), sus tejidos foliares, especialmente bajo estrés por infección viral, acumulan cantidades significativas de carbohidratos solubles, mucílagos y compuestos polifenólicos que coprecipitan y degradan el material genético (Arismendi et al., 2014). En el presente estudio, el método de extracción basado en un protocolo de CTAB al 3% modificado resultó ser una estrategia eficiente para superar esta limitante a partir del tejido vegetal utilizado para los ensayos de inoculación de virus recalcitrantes.

Las relaciones de absorbancia espectrofotométrica evidenciaron perfiles de pureza del DNA obtenido. El índice A_{260}/A_{280} promedio fue de 1.8-2.0 (Anexo 1), lo que indica una remoción efectiva de las proteínas estructurales de *N. benthamiana* y de las proteínas de la cápside viral. Esta remoción se logró mediante disrupción térmica a 65 °C en presencia de una alta concentración de sal (1.4 M NaCl₂), condición en la que el CTAB se une selectivamente a los ácidos nucleicos y permite que las proteínas y detritos celulares se separen eficientemente hacia la fase orgánica durante la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (Doyle y Doyle, 1987).

Por otra parte, la relación A_{260}/A_{230} presentó valores de 1.5-2.0. Este parámetro es fundamental al trabajar con el género *Nicotiana*, ya que la senescencia o el daño tisular inducido por la replicación sistémica viral incrementa la síntesis de metabolitos secundarios y compuestos fenólicos. La adición de β-mercaptoetanol al buffer de extracción desempeñó un papel clave como antioxidante, previniendo la oxidación de los fenoles a quinonas, compuestos que se unen covalentemente al DNA, le confieren una coloración oscura y, además, inactivan irreversiblemente la enzima *Taq* polimerasa (Porebski *et al.*, 1997), enzima clave para la detección viral mediante PCR.

Posteriormente, la integridad del DNA total se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa, que evidenció una banda compacta de alto peso molecular (~ 12 kb) y una mínima degradación enzimática (*smear*) (Figura 3). En el caso de los *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*), este aspecto es fundamental, ya que su genoma consiste en DNA circular de cadena sencilla (ssDNA) y en formas replicativas intermedias de doble cadena (dsDNA) de ≈2.7 kb (Zerbini *et al.*, 2017). A pesar de la vulnerabilidad estructural del ssDNA viral al estrés mecánico durante la homogeneización del tejido de *N. benthamiana*, el protocolo de CTAB al 3% utilizado en el presente proyecto permite el mantenimiento de la integridad del material genético frente a la acción de nucleasas endógenas reactivadas durante la lisis celular (Marwal *et al.*, 2012).

Figura 4: Integridad del DNA extraído en plantas de *N. bethamiana* en los distintos tratamientos.



A) y C) DNA total de plantas de *N. bethamiana* inoculadas con ToMHaV: B) DNA total de plantas de *N. bethamiana* inoculadas con ToMGoV D) DNA total de plantas de *Solanum lycopersicum* inoculadas con ToMHaV en coinfección con ToBRFV y/o un supresor de silenciamiento.

8.2 Evaluación de métodos de inoculación del virus recalcitrante ToMHaV

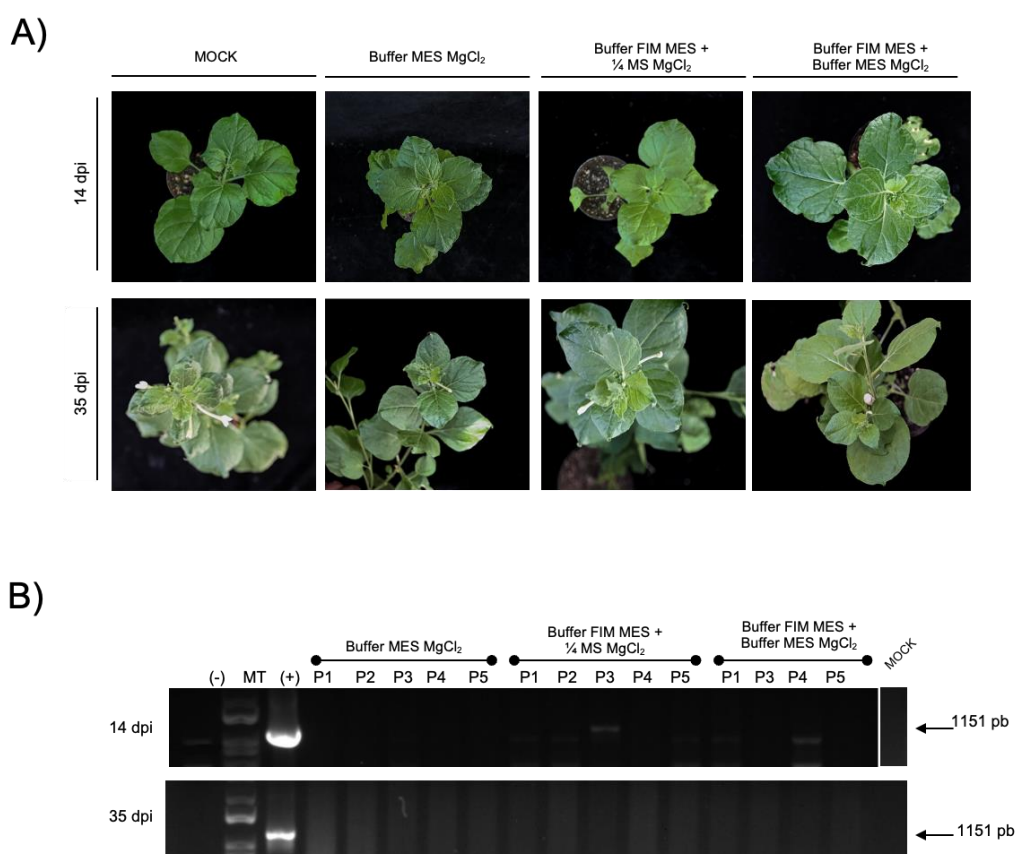
8.2.1. Evaluación de métodos de agroinoculación utilizando diferentes buffers de infiltración para ToMHVA

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la agroinoculación utilizando distintos buffers de infiltración y caracterizar el fenotipo de la infección en el hospedero *N. bethamiana*, se realizó el registro fenotípico y se llevó a cabo la detección molecular del virus mediante PCR usando primers específicos. Para ello, se recolectaron muestras de tejido foliar en dos puntos temporales críticos del desarrollo de la infección viral: 14 y 35 días post-inoculación (dpi), abarcando los diferentes tratamientos evaluados. En estos puntos de colecta ha sido evidenciado en nuestro grupo de investigación en distintos modelos planta-begomovirus, que a los 14 dpi se presentan los síntomas iniciales de las infecciones considerándose

una etapa temprana, mientras que a los 35dpi en una etapa tardía de infección las plantas han alcanzado un punto máximo de síntomas.

En lo que respecta a la infección por ToMHaV no se observaron síntomas característicos de una infección viral a los 14 y 35 dpi en los distintos métodos de agroinoculación (Figura 4).

Figura 5: Evaluación de métodos de agroinoculación utilizando diferentes buffers de infiltración para ToMHaV



A) Efecto fenotípico observado a los 14 y 35 dpi en plantas representativas del total de plantas analizadas (n5). B) Detección molecular de ToMHaV mediante PCR punto final. Muestras de P1-P10, (-), control negativo de PCR sin molde, MT, marcador de peso molecular, (+), control positivo de planta infectada con DNA plasmídico de un fragmento de ToMHaV. El tamaño de los amplicones esperados es indicado.

Al realizar la detección molecular se descartó la presencia de ToMHaV en todas las muestras analizadas de los tres distintos tratamientos en ambos tiempos de evaluación. La ausencia de síntomas fenotípicos y la falta de detección de ToMHaV a los 14 y 35 días dpi indican que el begomovirus evaluado exhibe una marcada recalcitrancia a la infección artificial por agroinoculación, incluso cuando se aplicaron modificaciones en los buffers de inoculación según los protocolos optimizados de Zhang et al. (2024).

La recalcitrancia de ciertos begomovirus frente a la agroinoculación es un fenómeno ampliamente documentado y se atribuye a una combinación de incompatibilidad celular, ineficiencia en la transferencia del DNA-T y barreras moleculares intrínsecas del hospedero (Sahu et al., 2022).

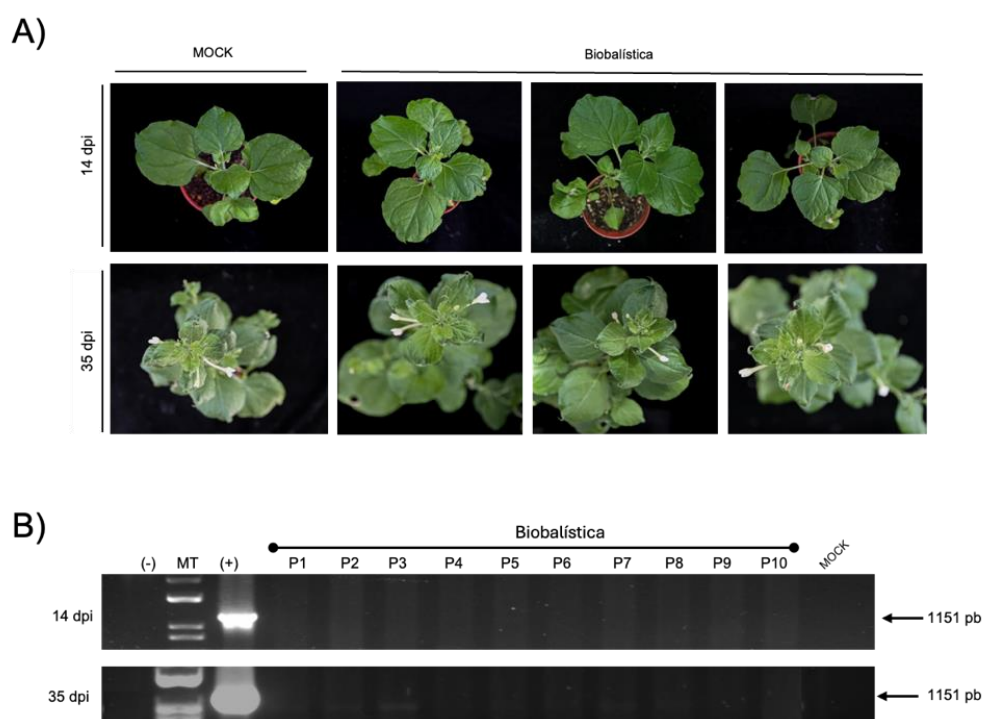
Los begomovirus generalmente presentan una estricta limitación al floema; un obstáculo de inoculación podría ser asumido por la deposición mecánica de *A. tumefaciens* en el espacio apoplástico del mesófilo, siendo este una barrera anatómica insuperable. Se ha documentado que la falta de plasticidad molecular en las proteínas de movimiento viral, en algunos casos, impide el transporte celular hacia el complejo estomático-células acompañantes, lo que resulta en la degradación del genoma viral (Prasanna y Rai, 2023). Por otro lado, la modificación del buffer de infiltración según el protocolo de Zhang et al. (2024) y la ineficiencia de la agroinoculación podrían estar asociadas al incremento de la virulencia bacteriana, induciendo una respuesta de defensa de la planta (PTI, PAMP-Triggered Immunity), y una respuesta hipersensible (HR) o muerte celular (Balint-Kurti, 2019). Este proceso necrótico puede actuar como una barrera que limita la colonización bacteriana y compromete la viabilidad celular antes de la transferencia y la circularización del DNA-T (Nguyen et al., 2026).

8.2.2. Evaluación de biobalística como método alternativo para la inoculación de ToMHaV

Debido a la ineficacia observada en la agroinoculación, la biobalística se identifica como la alternativa metodológica más apropiada para superar la recalcitrancia de este begomovirus específico. A diferencia de la agroinoculación, que depende de la viabilidad de *A. tumefaciens*, de la correcta escisión del T-DNA y de la evasión de las respuestas inmunitarias bacterianas (PTI), la biobalística representa un método de transferencia física directa que no requiere un vector biológico (Ramesh et al., 2019).

No obstante, los resultados demostraron que la inoculación mediante biobalística no resultó efectiva, debido a la ausencia de sintomatología característica asociada a la infección por begomovirus. Asimismo, mediante análisis por PCR se descartó la existencia de una infección asintomática latente, lo que confirma la ineficacia del método para este patógeno (Figura 5).

Figura 6: Evaluación de métodos de agroinoculación utilizando diferentes buffers de infiltración para ToMHaV



A) Efecto fenotípico observado a los 14 y 35 dpi. B) Detección molecular de ToMHaV mediante primers específicos. Muestras de P1-P10, (-), control negativo de PCR sin molde, MT, marcador de peso molecular, (+), control positivo de planta infectada con DNA plasmídico de un fragmento de ToMHaV. El tamaño de los amplicones esperados es indicado.

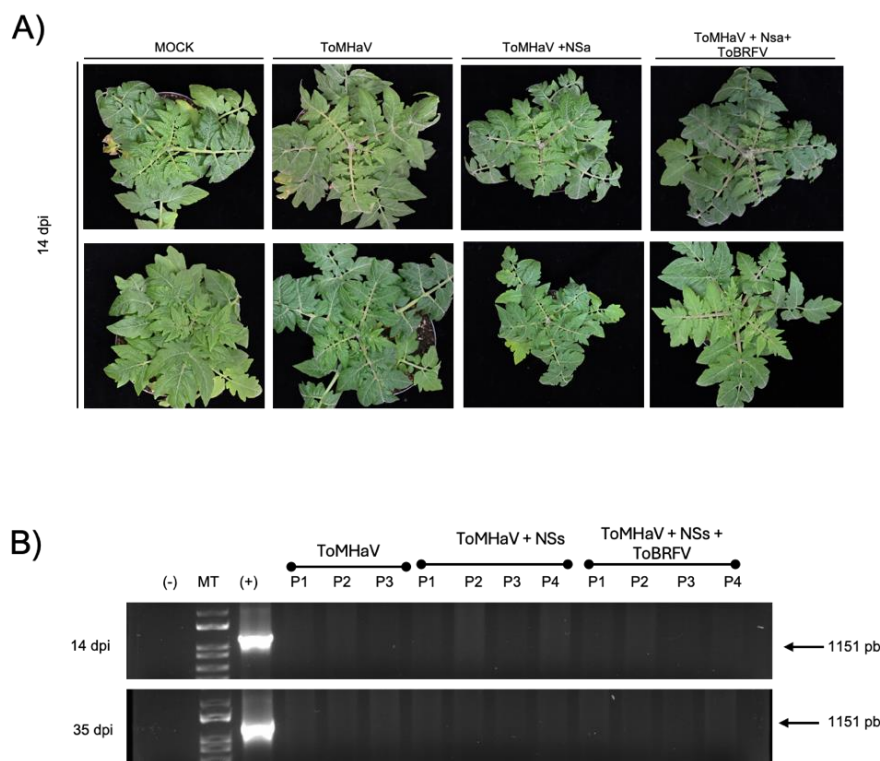
Debido a la eficiencia la imposibilidad de éxito de infección sistémica observada en los ensayos individuales de agroinoculación y biobalística para el ToMHaV, la evaluación de la coinoculación con un agente viral adicional que pudiese funcionar como agente sinérgico de infección y/o un supresor exógeno de silenciamiento génico podría representar una alternativa para tener una infección exitosa.

8.2.3 Efecto de la coinfección con satélites y supresores de silenciamiento en la eficiencia de infección del ToMHaV

Además de las restricciones anatómicas y las barreras mecánicas inherentes a la inoculación artificial, la recalcitrancia de ToMHaV de forma aislada pudiera atribuirse a que, a nivel de campo, éste begomovirus es encontrado en co-infección con otros agentes virales y/o subvirales. que estarían actuando como determinantes clave de la patogenicidad y la evasión inmunitaria en el hospedero. En este sentido el Tomato Brown rugose fruit virus (ToBRFV) un virus de RNA perteneciente al género tobamovirus, ha sido encontrado en co-infección en cultivos de tomate por nuestro grupo de trabajo. Por tal motivo, se evaluó la coinfección con el ToBRFV y ToMHaV en plantas modelo de *Solanum lycopersicum* variedad Lanai. Como estrategia complementaria para superar las restricciones de infectividad de este begomovirus recalcitrante, se implementó la co-agroinoculación con el supresor de silenciamiento NSs del *Tomato zonate spot virus* (TZSV). Esta proteína representa una alternativa biotecnológica prometedora por su capacidad para debilitar la inmunidad mediada por RNA interferente mediante la degradación dirigida del cofactor inmunológico NbSGS3 (Chen et al., 2022), lo que facilita el establecimiento exitoso del virus objetivo.

Los análisis moleculares descartaron la presencia de ToMHaV en todas las muestras, en los ensayos de coinfección con ToBRFV y en las evaluaciones con el supresor del silenciamiento NSs. La ausencia de síntomas fenotípicos y la falta de detección viral a los 14 y 35 días post-inoculación (dpi) confirman que este begomovirus muestra una marcada recalcitrancia a la infección por agroinoculación bajo las condiciones evaluadas (Figura 6).

Figura 7. Evaluación de métodos de agroinoculación en coinfección con ToBRFV y un supresor de silenciamiento



A) Efecto fenotípico observado a las 14 plantas de *Solanum lycopersicum* representativas del total de plantas analizadas (n4). B) Detección molecular de ToMHaV mediante primers específicos. Muestras de P1-P4, (-), control negativo de PCR sin molde, MT, marcador de peso molecular, (+), control positivo de planta infectada con DNA plasmídico de un fragmento de ToMHaV. El tamaño de los amplicones esperados es indicado.

La recalcitrancia observada en ToMHaV podría deberse a dos hipótesis principales. Por un lado, el virus podría requerir un factor biológico adicional, aún no identificado, para lograr una infección exitosa. Por otro lado, no se puede descartar una limitación técnica en el diseño o ensamblaje del clon infectivo utilizado. Aunque dicho clon infectivo ha sido completamente secuenciado y la integridad de su genoma (regiones integénicas y marcos de lectura abiertos) ha sido validado, no pueden descartarse posibles mutaciones silenciosas o bien mutaciones que cambien aminoácidos que repercutan en la estructura y/o actividad de las proteínas virales.

8.3 Evaluación de métodos de inoculación del virus ToGMoV

8.3.1 Detección molecular de ToGMoV en plantas de *Nicotiana benthamiana* agroinoculadas con diferentes buffers de infiltración

Como control positivo de infectividad y consistencia metodológica, se evaluó el comportamiento del Tomato golden mosaic virus (ToGMoV) mediante agroinoculación convencional empleando los tres distintos buffers de infiltración. El desarrollo de los síntomas típicos de begomovirus, caracterizado por un mosaico amarillo, distorsión foliar y deformación en los brotes apicales, se observó a partir de los 10 días postinoculación (dpi). A los 14 dpi, la presencia viral se confirmó mediante PCR de punto final en el 80% (4/5) de las plantas inoculadas con el buffer de infiltración MES-MgCl₂ y en el 100% (4/4) de las plantas tratadas con el buffer FIM-MES-MgCl₂; este último optimizado mediante una incubación prolongada (*overnight*) de *Agrobacterium tumefaciens* en dicho buffer potenciador de la virulencia.

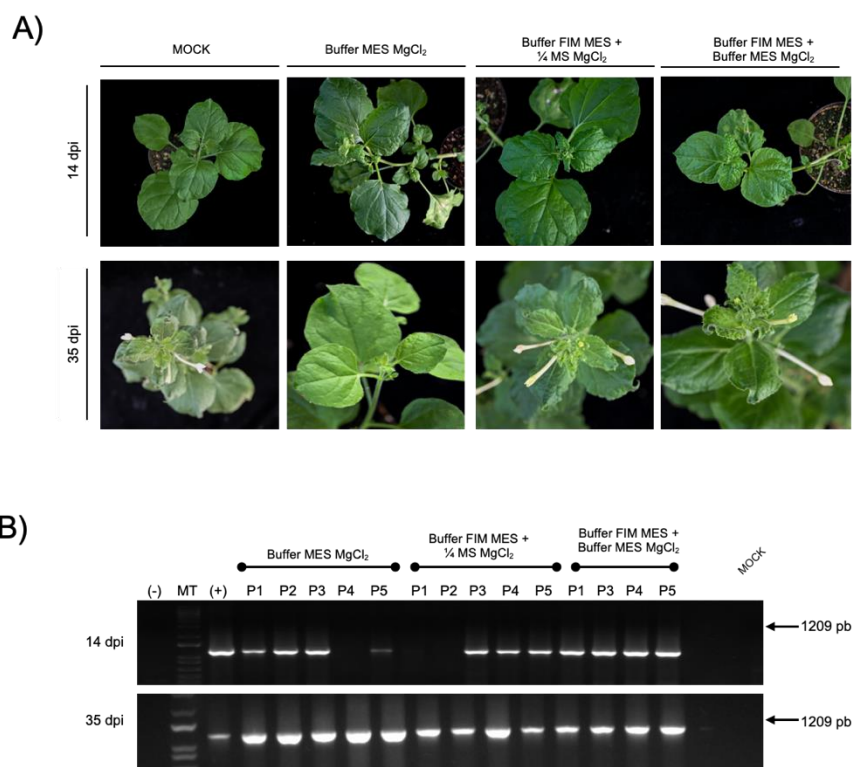
En contraste, el tratamiento que empleó el buffer FIM + ¼ MS-MgCl₂ exhibió la menor eficiencia inicial, registrando una tasa de infección de solo el 50% (2/4) a los 14 dpi. No obstante, a los 35 dpi se confirmó la presencia de ToGMoV en todas las plantas agroinoculadas por los tres tratamientos. Estos hallazgos demuestran de forma contundente la viabilidad biológica del clon infeccioso de ToGMoV, la

susceptibilidad del hospedero y la capacidad de los medios inductores (particularmente FIM-MES-MgCl₂ con incubación prolongada) para acelerar la cinética de acumulación y dispersión viral sistémica en etapas tempranas de la infección.

8.3.2. Efecto de diferentes buffers de infiltración en la carga viral de ToGMoV en *Nicotiana benthamiana* cuantificado por qPCR

El análisis de cuantificación del título viral reveló una cinética de acumulación diferencial, dependiente del tipo de buffer de infiltración empleado durante el periodo de evaluación. A los 14 días post-inoculación (dpi), no se detectaron diferencias en la carga viral en las plantas infectadas entre los distintos tratamientos (Figura 7). Sin embargo, a los 35 dpi se observó un incremento notable y superior en la acumulación de DNA viral en las plantas inoculadas con el buffer de infiltración MES-MgCl₂ en comparación con los demás medios evaluados.

Figura 8: Evaluación de métodos de agroinoculación utilizando diferentes buffers de infiltración para ToGMoV



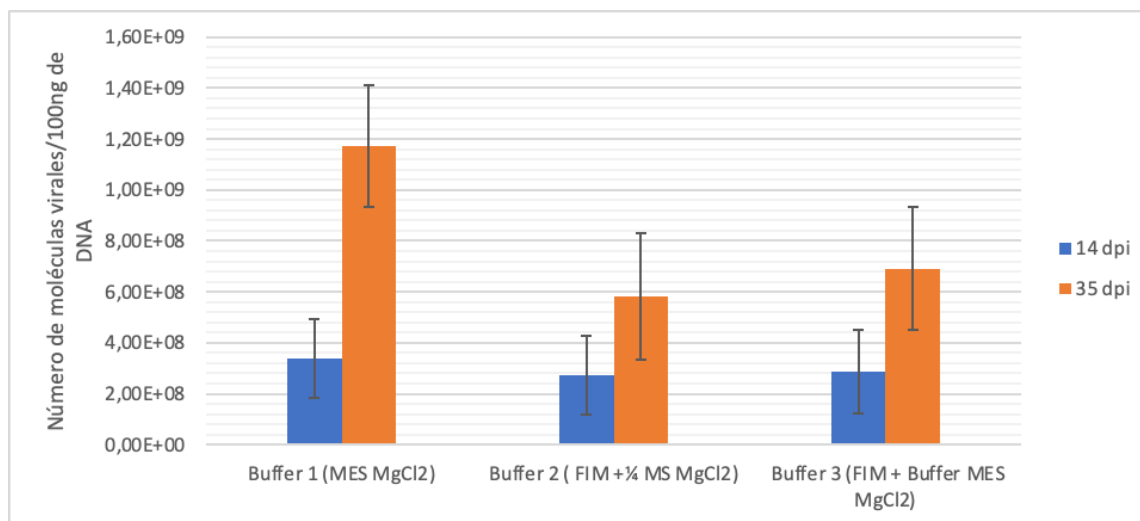
A) Efecto fenotípico observado a los 14 y 35 dpi en plantas representativas del total de plantas analizadas (n5). B) Detección molecular de **ToGMoV** mediante primers específicos. Muestras de P1-P5, (-), control negativo de PCR sin molde, MT, marcador de peso molecular, (+), control positivo de planta infectada con DNA plasmídico de un fragmento de ToGMoV. El tamaño de los amplicones esperados es indicado.

Esta disparidad tardía en la eficiencia de replicación y dispersión viral puede deberse, de acuerdo con lo reportado *por Zhang al. (2024)*, a un sistema basado estrictamente en MES-MgCl₂ (potenciado con acetosiringona) optimiza drásticamente la agroinoculación de begomovirus al incrementar la virulencia bacteriana. Se sugiere que, en las etapas tempranas de la infección (14 dpi), la maquinaria celular del hospedero aún esté procesando la transcripción inicial del DNA-T y que las defensas basales de la planta mantengan una tasa de replicación viral uniforme y baja en todos los tratamientos. No obstante, la superioridad del título viral a los 35 dpi sugiere que el buffer MES-MgCl₂ propició una transferencia inicial de DNA-T más eficiente y con menor daño por estrés osmótico o toxicidad iónica local en el mesófilo, condiciones que suelen observarse con buffers salinos más complejos. Limitar el daño celular local previene la activación temprana de las vías de señalización por heridas (ácido jasmónico y ácido salicílico), las cuales de otro modo acelerarían la maquinaria de silenciamiento génico post-traducciona (PTGS) de la planta antes de que el virus logre replicarse (Nawaz-ul-Rehman et al. 2024).

Al garantizar desde el inicio una mayor cantidad de genomas virales funcionales libres en el núcleo celular, el virus logra eventualmente superar el umbral del PTGS de la planta. Consecuentemente, esto acelera la movilización del virus hacia las células acompañantes del floema y su posterior translocación sistémica hacia los brotes apicales, lo que explica la alta acumulación de DNA viral observada a los 35 dpi. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Zhang *et al. (2024)* respecto

a que la estabilización del pH y el soporte iónico del magnesio en el buffer de infiltración son determinantes críticos para establecer infecciones estables y de alto título en begomovirus recalcitrante.

Figura 9: Cuantificación de DNA viral de ToGMoV en planta de N. bethamiana.



Las gráficas representan el promedio de los tres bioensayos independientes con cuatro réplicas técnicas cada uno. El valor obtenido se expresó en número de moléculas por cada 100ng de DNA total de planta infectada. Las barras de error representan la desviación estándar de la media.

IX. CONCLUSIONES

1. El protocolo CTAB al 3% para la extracción de DNA de tejido foliar de *Nicotiana benthamiana* permitió obtener DNA total de alta calidad. Esto, evidenciado por los índices de absorbancia A260/A280 entre 1.8 y 2.0, confirmó una remoción efectiva de proteínas, lo que aseguró un DNA de alta pureza, adecuado para análisis moleculares posteriores.
2. Basado en los protocolos de inoculación realizados en este proyecto, no se logró superar la barrera de la infección en el begomovirus recalcitrante Tomato mosaic La Havana Virus (ToMHaV), al no observarse síntomas asociados a la infección ni replicación viral sistémica evaluada por PCR de punto final empleando los tres distintos buffers de infiltración en el periodo de tiempo estudiado (14 y 35 dpi).
3. Con los resultados obtenidos en las pruebas de biobalística como alternativa a la inoculación de begomovirus recalcitrantes, de igual manera, no se logró identificar síntomas característicos de begomovirus ni presencia de progenie viral a nivel molecular.
4. Las estrategias de inoculación dirigidas a debilitar el sistema inmunológico del hospedero mediante el sinergismo con el tobamovirus ToBRFV y/o la coinfección con el supresor de silenciamiento heterólogo NSs del TZSV resultaron insuficientes para establecer una infección sistémica exitosa por ToMHaV, lo que confirma el carácter altamente recalcitrante de este begomovirus frente a los métodos de infección convencionales y sinérgicos probados.
5. El caso del ToGMoV, el empleo del buffer MES-MgCl₂ generó un aumento significativo en la carga viral a los 35 dpi comparado con los otros dos buffers evaluados. Esta observación destaca la importancia de establecer y validar métodos de inoculación artificial para realizar ensayos de interacción planta-virus de manera precisa y extrapolable.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akhter, M., Nakahara, K. S. y Masuta, C. (2021). Resistance induction based on the understanding of molecular interactions between plant viruses and host plants. *Virology Journal*, 18(1), Artículo 178. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01647-4>

Brown, J. K., Zerbini, F. M., Navas-Castillo, J., Moriones, E., Ramos-Sobrinho, R., Silva, J. C., Fiallo-Olivé, E., Briddon, R. W., Hernández-Zepeda, C., Idris, A., Malathi, V. G., Martin, D. P., Rivera-Bustamante, R., Rochelegans, F. X., & Varsani, A. (2015). Revision of *Begomovirus* taxonomy based on pairwise sequence identity filters. *Archives of Virology*, 160(6), 1593-1619. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2398-z>

Cambrón-Crisantos, J. M., Rodríguez-Mendoza, J., Valencia-Luna, J. B., Alcasio-Rangel, S., García-Ávila, C. J., López-Buenfil, J. A. y Ochoa-Martínez, D. L. (2019). First report of *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(1), 185-192. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-5>

Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E. y Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Symptom remission and specific resistance of pepper plants after infection by *Pepper golden mosaic virus*. *Phytopathology*, 97(1), 51–59. <https://doi.org/10.1094/phyto-97-0051>

De Barro, P. J., Liu, S.-S., Boykin, L. M. y Dinsdale, A. B. (2011). *Bemisia tabaci*: A statement of species status. *Annual Review of Entomology*, 56(1), 1-19. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085504>

Dinsdale, A. B., Cook, L., Riginos, C., Buckley, Y. M. y De Barro, P. J. (2010). Refined global analysis of mitochondrial cytochrome oxidase 1 of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aleyrodoidea: Aleyrodidae) to identify species-level genetic boundaries. *Annals of the Entomological Society of America*, 103(2), 196-208. <https://doi.org/10.1603/AN09061>

Fiallo-Olivé, E., Lett, J.-M., Martin, D. P., Roumagnac, P., Varsani, A., Zerbini, F. M. y Navas-Castillo, J. (2021). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Geminiviridae* 2021. *Journal of General Virology*, 102(10), Artículo 001696. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001696>

Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2023). *FAOSTAT statistical database: Crops and livestock products*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>

FuturCrop. (s. f.). *Prevención de las enfermedades víricas en los cultivos*. <https://futurcrop.com/prevencion-de-las-enfermedades-viricas-en-los-cultivos/>

Garcia-Estrada, R. S., Díaz-Lara, A., Aguilar-Molina, V. H. y Tovar-Pedraza, J. M. (2022). Viruses of economic impact on tomato crops in Mexico: From diagnosis to management—A review. *Viruses*, 14(6), Artículo 1251. <https://doi.org/10.3390/v14061251>

Hogenhout, S. A., Oshima, K., Ammar, E. D., Kakizawa, S., Kingdom, H. N., & Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology*, 9(4), 403-423. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00472.x>

International Committee on Taxonomy of Viruses. (2021). *International Committee on Taxonomy of Viruses*. <https://ictv.global>

Jones, R. A. y Naidu, R. A. (2019). Global dimensions of plant virus diseases: Current status and future perspectives. *Annual Review of Virology*, 6(1), 387–409. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818-015606>

Klimenko, N., Antonova, O. Y., Zheltova, V., Fomina, N., Kostina, L., Mamadbokirova, F., Shuvalov, O., Savenko, E., Shmyglya, I. y Gavrilenko, T. (2019). Screening of Russian potato cultivars (*Solanum tuberosum* L.) with DNA markers linked to the genes conferring extreme resistance to potato virus Y. *Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya*, 54(5), 958–969. <https://doi.org/10.15389/agrobiology.2019.5.958eng>

Koppert México. (s. f.). *Eretmoceris eremicus*. <https://www.koppert.mx/proteccion-de-cultivos/control-biologico-de-plagas/avispa-parasitoides/eretmoceris-eremicus/>

Lowy, D. R., Rands, E., Chattopadhyay, S. K., Garon, C. F. y Hager, G. L. (1980). Molecular cloning of infectious integrated murine leukemia virus DNA from infected mouse cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(1), 614–618. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.1.614>

Morales, F. J., & Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, 146(3), 415–441. <https://doi.org/10.1007/s007050170153>

Mugerwa, H., Seal, S., Wang, H.-L., Patel, M. V., Kabaalu, R., Omongo, C. A., Alicai, T., Tairo, F., Ndunguru, J., Sseruwagi, P. y Colvin, J. (2018). African ancestry of New World *Bemisia tabaci* whitefly species. *Scientific Reports*, 8, Artículo 2734. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20956-3>

Nakhla, M. K., Sorensen, A., Mejía, L., Ramírez, P., Karkashian, J., & Maxwell, D. (2005). Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. *Acta Horticulturae*, 695, 277–288. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2005.695.31>

Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Sánchez-Campos, S. (2011). Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 219–248. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095235>

Pallás, V., & García, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. **Journal of General Virology**, 92(12), 2691–2705. <https://doi.org/10.1099/vir.0.034603-0>

Racaniello, V. R. y Baltimore, D. (1981). Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*, 214(4523), 916–919. <https://doi.org/10.1126/science.6272391>

Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R. y Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal*, 8, Artículo 104. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-104>

Rentería-Canett, I., Xoconostle-Cázares, B., Ruiz-Medrano, R. y Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Geminivirus mixed infection on pepper plants: Synergistic interaction between PHYVV and PepGMV. *Virology Journal*, 8, Artículo 104. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-104>

Rojas, M. R., Macedo, M. A., Maliano, M. R., Soto-Aguilar, M., Souza, J. O., & Gilbertson, R. L. (2018). Infectious cloned DNA components of begomoviruses: A valuable tool for studying virus-host interactions and developing management strategies. *Methods in Molecular Biology*, 1656, 111-132. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7237-1_8

Sánchez-del Castillo, F. E., Moreno-Pérez, C., & Cruz-Arellanes, E. L. (2009). Producción de jitomate hidropónico bajo invernadero en un sistema de dosel en forma de escalera. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(1), 67–73.

Sastry, K. S. (2013). *Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics. Introduction of Plant Viruses and Sub-Viral Agents, Classification, Assessment of Loss, Transmission and Diagnosis* (Vol. 1). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-6524-5>

Scholthof, K. B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. y Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938-954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>

Tian, Y.-P. y Valkonen, J. P. (2013). Genetic determinants of *Potato virus Y* required to overcome or trigger hypersensitive resistance to PVY strain group O controlled by the gene *Ny* in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(3), 297–305. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0219-R>

Urbino, C., Thébaud, G., Granier, M., Blanc, S., & Peterschmitt, M. (2008). A novel cloning strategy for isolating, genotyping and phenotyping genetic variants of geminiviruses. **Virology Journal**, **5**, Artículo 135. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-135>

Zang, Y., Fang, X.-D., Qiao, J.-H., Gao, Q. y Wang, X.-B. (2020). Plant negative-strand RNA virus reverse genetics system is difficult to develop, but powerful for virus-host interaction studies and virus-based vector applications. *Phytopathology Research*, *2*, Artículo 31. <https://doi.org/10.1186/s42483-020-00072-w>

Zerbini, F. M., Briddon, R. W., Idris, A., Martin, D. P., Moriones, E., Navas-Castillo, J., Rivera-Bustamante, R., Roumagnac, P., Varsani, A., & ICTV Report Consortium. (2017). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Geminiviridae*. *Journal of General Virology*, *98*(2), 131–133. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000738>

Zhang, Y., Yang, X., Huang, L., & Deng, S. (2024). A highly efficient Agrobacterium-mediated infectious system for Sweet potato leaf curl virus and a deltasatellite-based VIGS vector. **Phytopathology Research**, **6**, Artículo 23. <https://doi.org/10.1186/s42483-024-00244-x>

Altpeter, F., Baisakh, N., Beachy, R., Bock, R., Capell, T., Christou, P., Daniell, H., Datta, K., Datta, S., Dix, P. J., Fauquet, C., Huang, N., Kohli, A., Mooibroek, H., Nicholson, L., Nguyen, T. T., Nugent, G., & Thangaraj, A. (2005). Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: Myths and realities. *Molecular Breeding*, *15*(3), 305–327. <https://doi.org/10.1007/s11032-004-8001-y>

Ascencio-Ibáñez, J. T., Diaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z. I., Argüello-Astorga, G. R., & Rivera-Bustamante, R. F. (1999). First Report of Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus in Yucatán, México. *Plant Disease*, *83*(12), 1178. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.12.1178A>

Atabekova, A. K., Lazareva, E. A., Lezzhov, A. A., Golyshev, S. A., Skulachev, B. I., Morozov, S. Y., & Solovyev, A. G. (2024). Defense Responses Induced by Viral Movement Protein and Its Nuclear Localization Modulate Virus Cell-to-Cell Transport. *Plants*, *13*(18), 2550. <https://doi.org/10.3390/plants13182550>

Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, *20*(8), 1163-1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>

Bañuelos-Hernández, B., Mauricio-Castillo, J. A., Cardenas-Conejo, Y., Guevara-González, R. G., & Arguello-Astorga, G. R. (2012). A new strain of tomato severe leaf curl virus and a unique variant of tomato yellow leaf curl virus from Mexico. *Archives of Virology*, *157*(9), 1835-41. <https://doi.org/10.1007/s00705-012-1358-z>

Bhat, A., & Ryu, C. M. (2016). Plant sensing of extracellular DNA: An emerging signaling paradigm in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1541. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01541>

Briddon, R. W., Patil, B. L., Bagewadi, B., Nawaz-ul-Rehman, M. S., & Fauquet, C. M. (2010). Distinct evolutionary histories of the DNA-A and DNA-B components of bipartite begomoviruses. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 97. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-97>

Brown, J. K., & Idris, A. M. (2006). Introduction of the Exotic Monopartite Tomato yellow leaf curl virus into West Coast Mexico. *Plant Disease*, 90(10), 1360. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1360A>

Brown, J., Idris, A., Rogan, D., Hussein, M., & Palmieri, M. (2001). Melon chlorotic leaf curl virus, a New Begomovirus Associated with Bemisia tabaci Infestations in Guatemala. *Plant Disease*, 85(9), 1027. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.9.1027C>

Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E., & Rivera-Bustamante, R. F. (2007). Symptom Remission and Specific Resistance of Pepper Plants After Infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology*, 97(1), 51-59. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0051>

Chen, J., Zheng, L., Shi, X., Zhang, S., Tan, X., Zhao, X., Lu, B., Ye, Q., Miao, S., Liu, Y., & Zhang, D. (2022). The nonstructural protein NSs encoded by tomato zonate spot virus suppresses RNA silencing by interacting with NbSGS3. *Molecular Plant Pathology*, 23(5), 707-719. <https://doi.org/10.1111/mpp.13192>

Chiusano, M. L., Incerti, G., Colantuono, C., Termolino, P., Palomba, E., Monticolo, F., Benvenuto, G., Foscari, A., Esposito, A., & Mazzoleni, S. (2021). Self-DNA signaling and plant autoimmune responses: Insights into mechanism and ecology. *Plants*, 10(11), 2390. <https://doi.org/10.3390/plants10112390>

Dabauza, M., & Peña, L. (2003). Response of sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) genotypes to *Agrobacterium tumefaciens* as a means of selecting proper vectors for genetic transformation. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 78(1), 39-45. <https://doi.org/10.1080/14620316.2003.11511589>

Davis, T. W., & Thompson, A. N. (2024). Begomoviruses associated with okra yellow vein mosaic disease (OYVMD): diversity, transmission mechanism, and management strategies. *Molecular Horticulture*, 4(1), 11. <https://doi.org/10.1186/s43897-024-00112-4>

Del Toro, F., Tenllado, F., Chung, B.-N., & Canto, T. (2014). Expresión por agroinfiltración a alta temperatura. *Molecular Plant Pathology*, 15(8), 848-857. <https://doi.org/10.1111/mpp.12136>

Du, H., Xu, H., & Wang, F. (2022). Armet from whitefly saliva acts as an effector to suppress plant defences by targeting tobacco cystatin. *New Phytologist*, 234(5), 1848-1862. <https://doi.org/10.1111/nph.18063>

Escobar, M. A., & Dandekar, A. M. (2013). Post-Transcriptional Gene Silencing in Plants. *Structural Biology*, 15-28.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO). (2022). PM 7/152 (1) Begomoviruses - 2022. *EPPO Bulletin*, 52(1), 1-28. <https://doi.org/10.1111/epp.12887>

Garabagi, F., Gilbert, S., Kim, S. I., & McLean, M. D. (2012). Reduction of host immune responses enhances transient gene expression in plants. *Plant Cell Reports*, 31(9), 1613-1621. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1274-1>

García-Neria, M. A., & Rivera-Bustamante, R. F. (2011). Characterization of the resistance to *Agrobacterium tumefaciens* in wild *Capsicum* accessions and its impact on agroinfection efficiency. *Phytopathology*, 101(6), 712–720. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-10-0245>

Gasca-González, J. J., Vega-Arreguín, J. C., Reynoso-Granados, T., Jiménez-Bremont, J. F., Ruiz-Salazar, R., & Herrera-Estrella, L. (2008). Inoculación biolística del virus huasteco vena amarilla del chile (PHYVV) y su uso en la evaluación de la resistencia en germoplasma de *Capsicum chinense*. *Agrociencia*, 42(2), 199–207.

Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the "gene-jockeying" tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16-37. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>

Gracia-Medrano, R. M., Maldonado-Borges, J. I., Sánchez-Cach, L. A., Minero-García, Y., Hernández-Zepeda, C., & Moreno-Valenzuela, O. A. (2022). Preliminary identification and phylogenetic relationships of begomoviruses associated with *Capsicum* spp. in the Yucatan peninsula, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(3), 360-377. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2206-5>

Guo, W., Jiang, T., Zhang, X., & Zhou, X. (2008). Variación molecular de las moléculas de ADN satélite β asociadas con el virus de la vena amarilla de *Malvastrum* y su papel en la patogenicidad. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(6), 1909–1913. <https://doi.org/10.1128/AEM.02461-07>

Gupta, K., Rishishwar, R., Khan, Z. A., & Dasgupta, I. (2022). *Agrobacterium*-mediated co-inoculation of okra plants with cloned okra enation leaf curl virus DNA and bhendi yellow vein mosaic beta-satellite DNA furthers Koch's postulates for enation leaf curl disease. *Journal of Virological Methods*, 300, 114413. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114413>

Holguín-Peña, R. J., Hernández-Montiel, L. G., & Latisnere-Barragán, H. (2010). Identificación y distribución geográfica de Bemisia tabaci Gennadius y su relación con enfermedades begomovirales en tomate (Solanum lycopersicum L.) en Baja California, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1), 58-60.

Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F., & Gilbertson, R. L. (2016). A review of begomovirus training and tools for agroinoculation. *Journal of Virological Methods*, 232, 41-53. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.02.001>

Lacroix, B., & Citovsky, V. (2019). Vías de transferencia de ADN a plantas desde Agrobacterium tumefaciens y especies bacterianas relacionadas. *Annual Review of Phytopathology*, 57(1), 231–251. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100227>

Levy, D., & Czosnek, H. (2003). Tomato yellow leaf curl virus: An emerging threat to tomato production worldwide. *Infection, Genetics and Evolution*, 3(2), 85–91. [https://doi.org/10.1016/S1567-1348\(03\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S1567-1348(03)00004-3)

López-López, K., Rodríguez-Mora, M., & Vaca-Vaca, J. C. (2013). Optimización de las condiciones de bombardeo por biobalística para la introducción de begomovirus en solanáceas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 42–51.

Martínez-Zubiaur, Y., de Blas, C., Quiñones, M., Castellanos, C., Peralta, E. L., & Romero, J. (1998). Havana tomato virus, a new bipartite geminivirus infecting tomatoes in Cuba. *Archives of Virology*, 143(9), 1757-72. <https://doi.org/10.1007/s007050050414>

Mauricio-Castillo, J. A., Argüello-Astorga, G. R., Alpuche-Solís, A. G., Monreal-Vargas, C. T., Díaz-Gómez, O., & Torre-Almaraz, R. D. (2006). First Report of Tomato severe leaf curl virus in México. *Plant Disease*, 90(8), 1116. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1116A>

Mauricio-Castillo, J. A., Argüello-Astorga, G. R., Ambriz-Granados, S., Alpuche-Solís, A. G., & Monreal-Vargas, C. T. (2007). First Report of Tomato golden mottle virus on Lycopersicon esculentum and Solanum rostratum in Mexico. *Plant Disease*, 91(11), 1513. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-11-1513B>

Meyer, T., Thiour-Mauprivez, C., Wisniewski-Dyé, F., Kerzaon, I., Comte, G., Vial, L., & Lavire, C. (2019). Condiciones ecológicas y determinantes moleculares implicados en el estilo de vida de Agrobacterium en tumores. *Frontiers in Plant Science*, 10, 978. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00978>

Monger, W. A., Mumford, R. A., García, E. A., & Boa, E. (2008). Occurrence of Tomato mosaic Havana virus in Nicaragua. *Plant Pathology*, 57(2), 387. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01762.x>

Morales, F. J., & Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. *Archives of Virology*, 146(3), 415-441. <https://doi.org/10.1007/s007050170153>

Morilla, G., Castillo, A. G., Preiss, W., Jeske, H., & Bejarano, E. R. (2005). Agroinoculation versus biolistic inoculation of Tomato yellow leaf curl virus clones in pepper (*Capsicum annuum*). *Phytopathology*, 95(9), 1089–1097. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1089>

Morin, S., Atkinson, P. W., & Walling, L. L. (2024). Whitefly–Plant Interactions: An Integrated Molecular Perspective. *Annual Review of Entomology*, 69, 503-525. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120120-093940>

Nawaz-ul-Rehman, M. S., Iqbal, Z., & Zamir, R. (2024). Molecular insights into begomovirus replication, movement, and evasion of host immunity. *Phytopathology Research*, 6(1), 12-28. <https://doi.org/10.1186/s42483-024-00215-y>

Nester, E. W. (2014). Agrobacterium: el ingeniero genético de la naturaleza. *Frontiers in Plant Science*, 5, 730. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00730>

Nguyen, H. N., Luong, Q. X. T., & Vo, T. T. B. (2026). Detection strategies for Begomoviruses and evaluation of pathogenicity barriers in artificial systems. *Archives of Virology*, 171(2), 245-258.

Prasanna, H. C., & Rai, M. (2023). Tissue tropism and movement barriers of geminiviruses in recalcitrant hosts. *Phytopathology*, 113(5), 812-824.

Ramos, P. L., Guerra, O., Peralta, H., Fuentes, A., Ramirez, N., Melgar, S., & Pujol, M. (2003). Infecciosidad de clones de Tomato yellow leaf curl Sardinia virus obtenidos mediante agroinfección y biobalística. *Biotecnología Aplicada*, 20(2), 94–98.

Rauf, M., Al-Sadi, A. M., Amin, I., & Mansoor, S. (2023). Rolling circle amplification (RCA) combined with biolistic inoculation: A robust tool for infectivity assays of cotton leaf curl disease associated begomoviruses. *Advancements in Life Sciences*, 10(2), 185–191.

Rodríguez-Negrete, E. A., Morales-Aguilar, J. J., Domínguez-Duran, G., Torres-Devia, N. P., & Leyva-López, N. E. (2019). High-Throughput Sequencing Reveals Differential Begomovirus Species Diversity in Non-Cultivated Plants in Northern-Pacific Mexico. *Viruses*, 11(7), 594. <https://doi.org/10.3390/v11070594>

Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2005). Exploiting chinks in the plant's armor: Evolution and emergence of geminiviruses. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 361-394. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.135939>

Rothenstein, D., Haible, D., Dasgupta, I., Dutt, N., Patil, B. L., & Jeske, H. (2005). Biolistic inoculation of cloned Indian cassava mosaic virus DNA to *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Archives of Virology*, 150(8), 1669–1675. <https://doi.org/10.1007/s00705-005-0536-1>

Ruiz-Sánchez, E., Latournerie-Moreno, L., Chan-Escalante, Z. F., Lara-Martín, A. R., Jiménez, A. L., & García-Ramírez, A. (2024). Comportamiento de tomates criollos (*Solanum lycopersicum* L.) del sureste de México al complejo *Bemisia tabaci* - Begomovirus. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 42(2), 225-235. <https://doi.org/10.18781/ramf.v42i2.225>

Saad, M., Kvarnheden, A., & Shamloul, M. (2021). Development of infectious clones of geminiviruses and their application in plant virology and biotechnology. *Biology*, 10(8), 754. <https://doi.org/10.3390/biology10080754>

Sahu, J., Mishra, G. P., Kumar, S., & Singh, A. (2022). Achieving maximum efficiency of Mungbean yellow mosaic India virus infection by optimizing agroinoculation microenvironments. *Functional & Integrative Genomics*, 22(1), 89-102.

Stenger, D. C., Revington, G. N., Stevenson, M. C., & Bisaro, D. M. (1991). Expression of the Tomato Golden Mosaic Virus AL1 Gene in Transgenic Tobacco Plants Is Sufficient to Support Replication of Virus DNA Component B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(6), 2402-2406.

Tapia, J. A., Román, M. A., & Díaz, F. (2019). Genome wide molecular evolution analysis of begomoviruses reveals unique diversification pattern in coat protein gene of Old World and New World viruses. *Virology Journal*, 16(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1180-0>

Veena, Jiang, H., Doerge, R., & Gelvin, S. B. (2003). Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *The Plant Journal*, 34(1), 29-41. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01796.x>

Wang, L., Zhang, T., & Liu, Y. (2022). Differential Transmission of Old and New World Begomoviruses by Middle East-Asia Minor 1 (MEAM1) and Mediterranean (MED) Cryptic Species of *Bemisia tabaci*. *Viruses*, 14(5), 1104. <https://doi.org/10.3390/v14051104>

Wu, J., Mugiira, R. B., & Zhou, X. (2007). El virus del rizado de la hoja de *Malvastrum* de Guangdong es un begomovirus monopartito distinto. *Plant Pathology*, 56(5), 771–776. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01682.x>

Xu, H., Qian, L., Wang, X., Shao, R., Zhang, J., Zhang, J., ... & Zhang, J. (2018). A salivary effector enables whitefly to feed on host plants by eliciting salicylic acid-signaling pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *116*(2), 201714990. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714990116>

XI. ANEXOS

11.2 Determinación de concentración y pureza de extracciones de DNA total de *N. benthamiana*.

ToGMoV 14 dpi

ToGMoV				
Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230
14 dpi p1 MES-MgCl ₂	219.7	ng/μl	1.92	1.75
14 dpi p3 MES-MgCl ₂	187.5	ng/μl	1.93	1.34
14 dpi p4 MES-MgCl ₂	241.9	ng/μl	1.92	1.6
14 dpi p5 MES-MgCl ₂	144.4	ng/μl	1.91	1.5
14 dpi p1 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	252.7	ng/μl	1.91	1.69
14 dpi p2 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	187.2	ng/μl	1.92	1.65
14 dpi p3 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	239.5	ng/μl	1.89	1.78
14 dpi p4 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	79.7	ng/μl	1.93	1.58
14 dpi p5 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	60.7	ng/μl	1.92	1.82
14 dpi p1 FIM-MES + MgCl ₂	230.4	ng/μl	1.89	1.65
14 dpi p2 FIM-MES + MgCl ₂	166.2	ng/μl	1.88	1.52
14 dpi p3 FIM-MES + MgCl ₂	174.8	ng/μl	1.94	2.12
14 dpi p4 FIM-MES + MgCl ₂	161.4	ng/μl	1.95	1.57
14 dpi p5 FIM-MES + MgCl ₂	212.7	ng/μl	1.94	1.99
14 dpi MOCK	435.2	ng/μl	1.9	1.91

ToGMoV 35 dpi

ToGMoV				
Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230
35 dpi p1 MES-MgCl ₂	345.6	ng/μl	1.9	2.1
35 dpi p3 MES-MgCl ₂	338	ng/μl	1.9	2.13
35 dpi p4 MES-MgCl ₂	380.1	ng/μl	1.89	2.02
35 dpi p5 MES-MgCl ₂	229.4	ng/μl	1.88	2.04
35 dpi p1 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	453.3	ng/μl	1.88	2.1
35 dpi p2 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	372	ng/μl	1.95	2.2
35 dpi p3 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	272.3	ng/μl	1.91	2.08
35 dpi p4 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	298.2	ng/μl	1.9	2.09
35 dpi p1 FIM-MES + MgCl ₂	448.9	ng/μl	1.92	2.03
35 dpi p2 FIM-MES + MgCl ₂	302	ng/μl	1.89	1.99
35 dpi p3 FIM-MES + MgCl ₂	342.8	ng/μl	1.94	2.18
35 dpi p4 FIM-MES + MgCl ₂	467.9	ng/μl	1.86	2.19
35 dpi p5 FIM-MES + MgCl ₂	353.9	ng/μl	1.9	2.25
35 dpi MOCK	344.1	ng/μl	1.89	2.22

ToMHaV 14 dpi

ToMHaV					
Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	
14 dpi p1 MES-MgCl ₂	385.5	ng/μl		1.95	2.16
14 dpi p2 MES-MgCl ₂	441.4	ng/μl		1.92	2.22
14 dpi p3 MES-MgCl ₂	394.8	ng/μl		1.93	2.13
14 dpi p4 MES-MgCl ₂	217	ng/μl		1.9	2.21
14 dpi p5 MES-MgCl ₂	426.8	ng/μl		1.97	2.25
14 dpi p1 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	426.9	ng/μl		1.96	2.15
14 dpi p2 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	222.7	ng/μl		1.85	1.75
14 dpi p3 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	149.6	ng/μl		1.97	1.82
14 dpi p4 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	295.1	ng/μl		1.98	1.96
14 dpi p5 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	330.2	ng/μl		1.94	2.11
14 dpi p1 FIM-MES + MgCl ₂	532.2	ng/μl		1.92	2.04
14 dpi p3 FIM-MES + MgCl ₂	320.4	ng/μl		1.93	1.89
14 dpi p4 FIM-MES + MgCl ₂	132.5	ng/μl		1.93	2.11
14 dpi p5 FIM-MES + MgCl ₂	281.6	ng/μl		1.94	1.85
14 dpi p1 Biobalística	189	ng/μl		1.91	1.4
14 dpi p2 Biobalística	292.4	ng/μl		1.92	1.64
14 dpi p3 Biobalística	180.7	ng/μl		1.89	1.35
14 dpi p4 Biobalística	301.1	ng/μl		1.89	1.56
14 dpi p5 Biobalística	514.9	ng/μl		1.89	1.83
14 dpi p6 Biobalística	483.3	ng/μl		1.88	1.55
14 dpi p7 Biobalística	326.4	ng/μl		1.87	1.79
14 dpi p8 Biobalística	373.2	ng/μl		1.9	1.74
14 dpi p9 Biobalística	320	ng/μl		1.92	1.55
14 dpi p10 Biobalística	274	ng/μl		1.92	1.57

ToMHaV 35 dpi

ToMHaV					
Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Unit	260/280	260/230	
35 dpi p1 MES-MgCl ₂	406.2	ng/μl		1.9	2.1
35 dpi p2 MES-MgCl ₂	427.5	ng/μl		1.91	2.08
35 dpi p3 MES-MgCl ₂	393.4	ng/μl		1.89	2.07
35 dpi p4 MES-MgCl ₂	436.3	ng/μl		1.86	2.06
35 dpi p4 MES-MgCl ₂	400.3	ng/μl		1.88	2.16
35 dpi p1 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	492.8	ng/μl		1.87	2.13
35 dpi p2 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	498.8	ng/μl		1.96	1.91
35 dpi p3 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	212.4	ng/μl		1.91	1.81
35 dpi p4 FIM-MES + 1/4 MS MgCl ₂	77.3	ng/μl		1.94	1.65
35 dpi p1 FIM-MES + MgCl ₂	371.1	ng/μl		1.88	2.18
35 dpi p3 FIM-MES + MgCl ₂	352.1	ng/μl		1.88	2.1
35 dpi p4 FIM-MES + MgCl ₂	533.7	ng/μl		1.87	2.14
35 dpi p5 FIM-MES + MgCl ₂	316.7	ng/μl		1.9	2.27
35 dpi p1 Biobalística	203.8	ng/μl		1.89	2.3
35 dpi p2 Biobalística	479.6	ng/μl		1.88	2.17
35 dpi p13 Biobalística	445.5	ng/μl		1.88	2.22
35 dpi p4 Biobalística	406.4	ng/μl		1.9	2.34
35 dpi p5 Biobalística	480.3	ng/μl		1.88	2.27
35 dpi p6 Biobalística	351.1	ng/μl		1.77	2.09
35 dpi p7 Biobalística	436.7	ng/μl		1.89	2.39
35 dpi p8 Biobalística	562.2	ng/μl		1.86	2.24
35 dpi p9 Biobalística	429.1	ng/μl		1.89	2.34
35 dpi p10 Biobalística	382.4	ng/μl		1.9	2.41