

Universidad de Costa Rica
Escuela de Biología

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Biología para optar por el título de
Licenciatura en Biología con énfasis en Biología Molecular y Biotecnología

Detección de begomovirus (Fam. *Geminiviridae*) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR)

Tesis de Graduación para optar por el grado de Licenciado en Biología con énfasis en
Biología Molecular y Biotecnología

Elaborado por:

Mario Josué Ulate Solano

Carné: A55735

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

Marzo, 2017

TRIBUNAL EXAMINADOR

Proyecto de graduación presentado a la Escuela de Biología como requisito para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Biología Molecular y Biotecnología

Elaborado por:

Mario Ulate Solano

Aprobado por:

Ph.D. Gabriela Chavarría Soley
Presidente del Tribunal Examinador

M.Sc. Natalia Barboza Vargas
Directora del Proyecto

Lic. Eduardo Hernández Jiménez
Asesor del Proyecto

Dr. Federico José Albertazzi Castro
Asesor del Proyecto

Ph.D. James Karkashian Córdoba
Profesor Designado

DEDICATORIA

Dedicado a cada una de las personas que colaboraron en este proyecto, en especial

- a mi padre por demostrarme que los sacrificios traen recompensas,
- a mi madre por enseñarme a ser creativo con cada acción que realice,
- a mi hermano y hermana por su apoyo incondicional y compañía incomparable.

a mis sobrinas y sobrinos quienes me recuerdan cada instante que tenemos que propiciar siempre un mejor futuro para todas las personas que nos rodean. Por último,

a mis amigas y amigos quienes siempre me acompañan y me brindan una mano durante este carrusel que llamamos vida.

RECONOCIMIENTOS

Agradezco a ese sentido, ser o energía que nos levanta cada día, nos impulsa a ser mejores y a dar el máximo de nuestro esfuerzo. Aquello que nos hace amar a diferentes personas y amar el trabajo que hacemos, y que al mismo tiempo nos llena la vida de cambios inesperados para evitar caer en la rutina.

Agradezco a cada persona que me ayudó durante este proceso, en especial:

A Natalia Barboza por guiarme por el camino de la ciencia y enseñarme a buscar soluciones a cada nuevo reto.

A Eduardo Hernández por cada enseñanza y ayuda a lo largo de estos años de trabajo.

A Federico Albertazzi por cada uno de sus consejos, los cuales seguiré utilizando a lo largo de mi vida.

Por último, a todas las personas de CIBCM que me brindaron una ayuda y amistad desinteresada.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
Tribunal Examinador	ii
Dedicatoria	iii
Reconocimientos	iv
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
Índice de abreviaturas	xiv
Resumen	xix
I. Estado actual del conocimiento	1
A. Begomovirus	1
B. Importancia económica	3
C. Métodos para detectar begomovirus	4
i. Técnicas serológicas	5
ii. Técnicas basadas en ADN genómico	6
1. Hibridaciones	7
2. Reacción en cadena de la polimerasa	8
II. Justificación	11
III. Objetivos	13
IV. Metodología	15
1. Extracción de ácidos nucleicos totales (ANT)	15
2. Hibridaciones por dot blot	15
3. Diseño de imprimadores para PCR tiempo real	17
4. PCR tiempo real (qPCR)	19
5. Análisis de resultados	20

V.	Resultados	23
	1. Características de las muestras analizadas	23
	2. Frecuencia de virus presente en las muestras de estudio	23
	3. Detección de virus mediante PCR tiempo real	24
VI	Discusión	31
VII.	Literatura citada	37
VII.	Anexos	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
Cuadro I.	Nombre del begomovirus y número de accesoión de las secuencias (www.ncbi.com) utilizadas en el estudio para el diseño de los imprimadores.	17
Cuadro II.	Condiciones de PCR para la detección de begomovirus y del gen Citocromo oxigenasa 1 (<i>Cox1</i>)	20
Cuadro III.	Fecha de recolección, procedencia, hospedero, concentración de ácidos nucleicos, calidad 260/280 y calidad 260/230 según muestra utilizada en el estudio	54 Anexo 1
Cuadro IV.	Comparación de resultados entre Dot blot y qPCR según el hospedero, ciclo umbral (por sus siglas en inglés “C _T ”) y temperatura de disociación (por sus siglas en inglés “T _m ”) para la detección de begomovirus y el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen <i>Cox1</i>)	25
Cuadro V.	Valores de ciclo umbral (por sus siglas en inglés “C _T ”) y temperaturas de disociación (por sus siglas en inglés “T _m ”) de tres muestras evaluadas, su promedio y desviación estándar (\pm sd; por sus siglas en inglés).	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Fig. S1	Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el <i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i> (ToLCSiV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) Control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.	59 Anexo II
Fig. S2	Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el <i>Tomato yellow mottle virus</i> (ToYMV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.	60 Anexo II
Fig. S3	Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.	61 Anexo II
Fig. S4	Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el <i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV): a) control positivo, b) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). c) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.	61 Anexo II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Fig. S5	Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el <i>Squash yellow mild mottle virus</i> (SYMMoV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés "NTC"). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.	62 Anexo II
Fig. S6	Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el <i>Pepper golden mosaic virus</i> (PepGMV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés "NTC"). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.	62 Anexo II
Fig. S7	Curva de amplificación y análisis de fusión del control negativo (ADN de una planta sana) y del control sin molde (por sus siglas en inglés "NTC") utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	63 Anexo II
Fig. S8	Curva de amplificación y análisis de fusión de la muestra No. 2, muestra negativa utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	63 Anexo II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Fig. S9	Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para <i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i> (ToLCSiV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	64 Anexo II
Fig. S10	Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para <i>Tomato yellow mottle virus</i> (ToYMV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	65 Anexo II
Fig. S11	Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> (TYLCV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	65 Anexo II
Fig. S12	Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas coinfectadas con <i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i> (ToLCSiV) y <i>Tomato yellow mottle virus</i> (ToYMV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	66 Anexo II
Fig. S13	Curva de amplificación y análisis de fusión de la única muestra positiva para <i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	66 Anexo II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Fig. S14	Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para <i>Squash yellow mild mottle virus</i> (SYMMoV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	67 Anexo II
Fig. S15	Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para <i>Pepper golden mosaic virus</i> (PepGMV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	67 Anexo II
Fig. S16	Curva de amplificación y análisis de fusión de todas las muestras positivas utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen <i>Cox1</i>). a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	68 Anexo II
Fig. S17	Curva de amplificación y análisis de fusión del control negativo y la muestra negativa para begomovirus utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen <i>Cox1</i>). a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.	68 Anexo II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Fig. S18	Ciclo umbral (por sus siglas en inglés “C _T ”) según virus utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. El punto azul representa el promedio y los puntos rojos representan los intervalos de confianza. BGYMV = 17,95±6,18; PepGMV = 17,15 ± 4,61; SYMMoV = 12,21±4,67; TYLCV = 22,36 ± 5,05; ToLCSiV = 19,46 ± 4,89; ToLCSiV y ToYMV = 18,23 ± 5,35; ToYMV = 19,94 ± 4,58.	69 Anexo II
Fig. S19	Temperatura de disociación (por sus siglas en inglés “T _m ”) según virus utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. El punto azul representa el promedio y los puntos rojos representan los intervalos de confianza. BGYMV = 77,45 ± 0,94; PepGMV = 80,54 ± 0,70; SYMMoV = 78,12 ± 0,71; TYLCV = 77,63 ± 0,77; ToLCSiV = 80,56 ± 0,74; ToLCSiV y ToYMV = 79,48 ± 0,81; ToYMV = 79,99 ± 0,70.	70 Anexo II
Fig. S20	Ciclo umbral (por sus siglas en inglés “C _T ”) según hospedero utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen Cox1). El punto azul representa el promedio y los puntos rojos representan los intervalos de confianza. Arvenses = 20,69 ± 4,17; Ayote = 20,07 ± 4,17; Chile dulce = 18,21 ± 4,01; Tomate = 20,59 ± 3,91.	71 Anexo II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
Fig. S21	Temperatura de disociación (por sus siglas en inglés “Tm”) según hospedero utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen Cox1). El punto azul representa el promedio y los puntos rojos representan los intervalos de confianza. Arvense = $75,15 \pm 0,59$; Ayote = $75,17 \pm 0,59$; Chile dulce = $75,12 \pm 0,57$; Tomate = $75,09 \pm 0,55$.	72 Anexo II
Fig. S22	Curvas de amplificación y análisis de fusión de la muestra No. 15 en tres diferentes momentos utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a-b) Ensayo 1. c-d) Ensayo 2. e-f) Ensayo 3.	73 Anexo II
Fig. S23	Curvas de amplificación y análisis de fusión de la muestra No. 19 en tres diferentes momentos utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a-b) Ensayo 1. c-d) Ensayo 2. e-f) Ensayo 3.	74 Anexo II
Fig. S24	Curvas de amplificación y análisis de fusión de la muestra No. 23 en tres diferentes momentos utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a-b) Ensayo 1. c-d) Ensayo 2. e-f) Ensayo 3.	75 Anexo II

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNsb	ADN simple banda
ANt	Ácidos nucleicos totales
AREV	<i>Althea rosea enation virus</i>
BCaMV	<i>Bean calico mosaic virus</i>
BGMV	<i>Bean golden mosaic virus</i>
BGYMV	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>
BoYSV	<i>Boerhavia yellow spot virus</i>
CabLCV	<i>Cabbage leaf curl virus</i>
CLCuMuV	<i>Cotton leaf curl Multan virus</i>
CoGMV	<i>Corchorus golden mosaic virus</i>
Cox1	Citocromo oxigenasa 1
CoYSV	<i>Corchorus yellow spot virus</i>
CP	Proteína de cubierta

C_T	Ciclo umbral
CuLCuV	<i>Cucurbit leaf curl virus</i>
CYVMV	<i>Croton yellow vein mosaic virus</i>
DoYMV	<i>Dolichos yellow mosaic virus</i>
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EuMV	<i>Euphorbia mosaic virus</i>
FRET	Sistema de transferencia de energía de resonancia
g	Gramos
ha	Hectáreas
HgYMV	<i>Horsegram yellow mosaic virus</i>
ICMV	<i>Indian cassava mosaic virus</i>
ISEM	Microscopia Electrónica Inmunosorbente
KuMV	<i>Kudzu mosaic virus</i>
M	Molar
MacGMV	<i>Macroptilium golden mosaic virus</i>
MaYMJV	<i>Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus</i>
mJ	Mili julios
ng	Nanogramos
NTC	Control sin molde

OLCV	<i>Okra leaf curl virus</i>
OMoV	<i>Okra mottle virus</i>
ORF	Marcos abiertos de lectura
ORI	Región origen de la replicación
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PepGMV	<i>Pepper golden mosaic virus</i>
PepYLCIV	<i>Pepper yellow leaf curl Indonesia virus</i>
PYMV	<i>Potato yellow mosaic Panama virus</i>
REn	Proteína potenciadora de la replicación
Rep	Proteína asociada a la replicación
RhGMV	<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i>
RhGMV-MX	<i>Rhynchosia golden mosaic virus - Mexico</i>
RhYMV	<i>Rhynchosia yellow mosaic virus</i>
sd	Desviación estándar
SiGMV	<i>Sida golden mosaic virus</i>
SLCV	<i>Squash leaf curl virus</i>
SPLCUV	<i>Sweet potato leaf curl Uganda virus</i>
SPLCV	<i>Sweet potato leaf curl virus</i>

SYMMoV	<i>Squash yellow mild mottle virus</i>
TbLCV	<i>Tobacco leaf curl virus</i>
TbYCV	<i>Tobacco yellow crinkle virus</i>
TGMV	<i>Tomato golden mosaic virus</i>
Tm	Temperatura de disociación
ToLCNDV	<i>Tomato leaf curl New Delhi Virus</i>
ToLCSiV	<i>Tomato leaf curl Sinaloa virus</i>
ToMoTaV	<i>Tomato mottle Taino virus</i>
ToMoV	<i>Tomato mottle virus</i>
ToRMV	<i>Tomato rugose mosaic virus</i>
ToSLCV	<i>Tomato severe leaf curl virus</i>
ToYLDV	<i>Tomato yellow leaf distortion virus</i>
ToYMV	<i>Tomato yellow mottle virus</i>
ToYSV	<i>Tomato yellow spot virus</i>
ToYVSV	<i>Tomato yellow vein streak virus</i>
TYLCIDV	<i>Tomato yellow leaf curl Indonesia virus</i>
TYLCSV	<i>Tomato yellow leaf curl Sardinia virus</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>
TYLCV-IL	<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel</i>

TOYMLCV *Tomato yellow margin leaf curl virus*

UV Ultravioleta

VBSMV *Velvet bean severe mosaic virus*

x² Prueba chi cuadrado

RESUMEN

El género *Begomovirus* es el más diverso de la familia *Geminiviridae* y se encuentra en los cinco continentes infectando plantas dicotiledóneas. Los problemas económicos asociados al género han ido en aumento, así como el número de especies virales encontradas. Se han desarrollado diversas técnicas moleculares para la detección de los mismos, unas se basan en detección de las proteínas virales (técnicas serológicas) mientras que otras utilizan los ácidos nucleicos (ADN genómico). La presente investigación desarrolló un protocolo de detección para begomovirus utilizando imprimadores degenerados y la técnica PCR Tiempo Real (qPCR). Su funcionalidad se comprobó utilizando muestras infectadas con diferentes especies de begomovirus denotadas como plantas positivas, y plantas no infectadas denotadas como negativas. Tanto las muestras positivas como negativas se diagnosticaron por hibridación tipo "Dot blot". Todas las muestras encontradas positivas por Dot blot amplificaron por PCR tiempo real utilizando imprimadores degenerados para bemovirus. Dos de las tres muestras negativas reportadas por Dot blot fueron reportadas negativas con PCR tiempo real y la única discordancia se dio en una muestra la cual fue detectada negativa por Dot blot y positiva por PCR tiempo real. El qPCR permitió corroborar los resultados obtenidos en el ensayo por Dot blot, con la ventaja que fue capaz de detectar en un solo ensayo diferentes especies de begomovirus. La reacción de control interno utilizando el gen la subunidad 1 de la citocromo oxigenasa (gen *Cox1*) permitió corroborar la calidad del ADN y la capacidad de amplificar en un ensayo de PCR tiempo real. El ensayo begomovirus utilizando los imprimadores degenerados para qPCR desarrollados en este estudio mostró un alto desempeño y una alta reproducibilidad. A futuro, diferentes proyectos pueden utilizar esta técnica para diagnóstico inicial de begomovirus. También se podría estandarizar esta técnica para un diagnóstico parcial de begomovirus por secuenciación, identificar la especie de begomovirus mediante análisis de disociación o realizar cargas virales de begomovirus en diferentes hospederos o tejidos.

I. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

A. Begomovirus

El género *Begomovirus* es el más diverso de la familia *Geminiviridae*, se encuentra distribuido en los cinco continentes infectando plantas dicotiledóneas. La transmisión se da por la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius), reconocida como un complejo de especies todavía en estudio, ya que no se pueden distinguir morfológicamente (Boykin 2014; Firdaus et al., 2012; Shu-sheng, Colvin, & De-Barro, 2012). Los síntomas causados por los begomovirus son diversos e incluyen: enanismo, mosaicos amarillo brillante, moteados cloróticos, clorosis foliar marginal, enrollamiento foliar, deformaciones foliares y arrugamientos de las hojas (Polston & Anderson, 1997; Nava, Patte, Hiebert & Polston, 2006)

A nivel molecular, los begomovirus se caracterizan por un genoma de ADN simple banda, que se conforma de dos componentes genómicos nombrados A y B, con un tamaño aproximado de 2.5 a 3.0 kb cada uno; sin embargo, existen algunas especies que carecen del componente B. El genoma de los begomovirus no codifica para una ADN polimerasa, por lo que es alta su dependencia hacia el huésped para poder replicarse (King, Adams, Carstens & Lefkowitz, 2012; Rojas, Hagen, Lucas & Gilbertson, 2005; Yadava, Suyal & Mukherjee, 2010). Poseen una orientación bidireccional de los marcos abiertos de lectura ("ORF", Open Reading Frame), la presencia de una región intergénica que contiene promotores de la transcripción en ambas direcciones y el origen de la replicación (ORI), son también característicos del grupo (Jeske, 2009; Lazarowitz & Shepherd, 1992; Prajapat, Gaur, Raizada & Gupta, 2010; Rojas, Kvarnheden, Marcenaro & Valkonen, 2005a; Yadava et al., 2010).

Los genes descritos codifican para diferentes proteínas entre las que se encuentran: proteína precubierta (PCP, V2/AV2), la proteína de cubierta (CP, V1/AV1), proteína potenciadora de la replicación (REn, C3/AC3), proteína asociada a la replicación (Rep, C1/AC1) y proteína C4 o AC4 relacionada con la supresión del silenciamiento. El componente B codifica para proteínas del movimiento de célula a célula (MP, BC1) y del movimiento hacia fuera del núcleo (NSP, BV1) (Gutiérrez, 2002; Hanley-Bowdoin, Settlage, Orozco, Nagar & Robertson, 1999; King et al., 2012; Prajapat et al., 2010; Rojas et al., 2005; Sunitha, Shanmugapriya, Balamani & Veluthambi, 2013; Yadava et al., 2010).

Cabe resaltar que estos virus se dividen a su vez en dos grandes subgrupos: begomovirus de viejo mundo que corresponden a los que se localizan en África, Asia, Australia y Europa, y los begomovirus de nuevo mundo que son los encontrados en América. Esta diferencia se basa sobre todo en sus similitudes a nivel de la secuencia genómica, las cuales coinciden con un arreglo diferente entre los genes, además, se consideran los virus con genomas bipartitas como endémicos del nuevo mundo (Fauquet et al., 2003; King et al., 2012).

Entre las zonas más conservadas del genoma se encuentra la secuencia que codifica para CP. La misma le permite proteger el genoma y favorecer la interacción con el vector para que el mismo pueda realizar la transmisión de planta a planta (Harrison, Swanson & Fargette, 2002; Stanley, Boulton & Davies, 2005). Es por esto que la cápside presenta una composición de nucleótidos muy específica y conservada a nivel evolutivo, ya que tiene que ser muy estable para mantener su conformación en el ambiente extracelular, tanto del vector como de la planta huésped, cubriendo el ácido nucleico viral, además de mantener la capacidad de poder interactuar con el vector. Cabe resaltar que estos diferentes ambientes en los que se desenvuelve esta proteína y la capacidad de interactuar con el vector, ejercen probablemente la mayor fuerza

selectiva sobre la misma (Carter & Saunders, 2007; Rojas et al., 2005), y por ende, es una de las regiones del ADN más utilizadas para realizar diferentes estudios de diagnóstico en el género (Bela-ong & Bajet, 2007; Khan, 2000; Wyatt & Brown, 1996).

B. Importancia económica

Durante las últimas cuatro décadas, los begomovirus han ocasionado severos problemas económicos en Latinoamérica y el mundo en diferentes cultivos (Morales, 2011). La migración del vector, su alta tasa de mutación (entre 10^{-3} y 10^{-4} sustitución/sitio/año) y su capacidad de recombinación, favorecen el incremento de su diversidad y adaptabilidad a los hospederos en comparación a otros virus de plantas (Duffy & Holmes, 2008; Duffy & Holmes, 2009; Lozano, Trenado, Valverde & Navas-Castillo, 2009; Navas-Castillo, Fiallo-Olivé & Sanchez-Campos, 2011; Seal, vandenBosch & Jeger, 2006).

Su ámbito de hospederos varía de acuerdo a la especie viral, se sabe que pueden encontrarse en diversas especies de plantas, tales como cultivos de importancia económica y malezas asociadas a los mismos, estas últimas podrían funcionar como reservorio viral (Chen et al., 2013; Mouhanna, Langen & Schlösser, 2008). Su sintomatología y severidad varían según cultivo, localidad, especie de begomovirus, entre otros (Agrios, 2005; Varma & Malathi, 2003). Este daño sobre el hospedero evita la correcta comercialización de los cultivos y puede producir pérdidas millonarias (Jones, 2009; Morales & Anderson, 2001; Nawaz-ul-Rehman & Fauquet, 2009). Entre las plantas cultivadas donde se ha reportado infecciones severas de este grupo de virus está: el tomate (*Solanum lycopersicum*), yuca (*Manihot esculenta*), soja (*Glycine max*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), calabazas (*Cucurbita pepo*), algodón (*Gossypium barbadense*),

sandía (*Citrullus lanatus*), pepino (*Cucumis sativus*), camote (*Ipomoea batatas*) (Agris, 2005; Varma & Malathi, 2003).

Un ejemplo de la problemática económica que pueden producir estos virus son los daños reportados en Centroamérica. En 1975 se destruyeron 7000 hectáreas (ha) de algodón, siendo la producción de Nicaragua la más afectada (Morales & Anderson, 2001). Para 1990 el área de cultivo del algodón en Centro América se había reducido a un 10 % del total plantado en 1975, dado los altos costos que presentaba la producción de algodón debido a la presencia de begomovirus. Además, la enfermedad del moteado amarillo en frijol, ocasionada por varios begomovirus no identificados causó la pérdida total de cultivos de frijol en El Salvador, Guatemala y Nicaragua en la década de 1960. Para el 2001 se estimó que un poco más de 5 millones de hectáreas destinadas a agricultura primaria en Latinoamérica estaban bajo el ataque de 30 begomovirus distintos. (Morales & Anderson, 2001; Polston & Anderson, 1997; Quiros, Calvo & Ramírez, 1995; Varma & Malathi, 2003).

En la última década, no se han cuantificado las pérdidas económicas que ha ocasionado la presencia de estos patógenos en la región. Sin embargo, Hilje (2001) reportó que las medidas fitosanitarias y los diferentes plaguicidas no permiten el control real del problema generado por la mosca blanca, ya que se sigue encontrando infecciones virales. Por lo cual, las pérdidas económica se siguen dando en algún porcentaje sobre los cultivos y consecuentemente afectando a los productores.

C. Métodos para detectar begomovirus:

Existen diferentes técnicas para detectar virus en plantas, algunas se basan en la identificación de proteínas virales (técnicas serológicas), como las pruebas de ELISA y sus variantes. Mientras otras detectan sus ácidos nucleicos (técnicas basadas en ADN

genómico o ARN), que incluyen los diferentes tipos de hibridación, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (qPCR) (Viet, 2007).

i. Técnicas serológicas

El Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (por sus siglas en inglés “ELISA”) detecta mediante una acción enzimática la unión de un antígeno a un anticuerpo específico. En el caso de la detección viral se utilizan las propiedades antigénicas de la proteína de la cubierta del virus como antígeno (Kumari, Makkouk & Attar, 2006; Peterschmitt, Reynaud, Sommermeyer & Baudin, 1991; Pinner, Markham, Rybicki & Greber, 1992). En relación a los begomovirus, esta técnica no ha sido muy utilizada, ya que sus partículas virales son muy poco inmunogénicas, la purificación de las mismas a partir de plantas es muy difícil y puede suceder que la infección se presente en un grado moderado a leve en un tejido en específico (Harrison & Robinson, 1999; Harrison et al., 2002). Algunos de los resultados no deseados se han solucionado produciendo anticuerpos monoclonales, los cuales permitieron detectar diferentes begomovirus como lo fueron el *Indian cassava mosaic virus* (ICMV) y el *Okra leaf curl virus* (OLCV) (Harrison et al., 2002; Swanson & Harrison, 1993; Thomas, Massalski & Harrison, 1986).

Otra variante de esta técnica que también ha dado buenos resultados es la Microscopia Electrónica Inmunoabsorbente o ISEM (en inglés: “Immunosorbent Electron Microscopy”), que detecta un antisuero viral en la muestra. Se ha utilizado para el rastreo del *African cassava mosaic virus* (ACMV), *Bean golden mosaic virus* (BGMV), *Euphorbia mosaic virus* (EuMV), *Squash leaf curl virus* (SLCV) y el *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) (Harrison et al., 2002; Picó, Díez & Nuez, 1996; Roberts, Robinson & Harrison, 1984). Por otro lado, el doble sándwich-anticuerpo y el triple

sándwich-anticuerpo son tipos de ELISA y también se han utilizado con éxito para la detección de virus como lo es el SLCV, ACMV, *Tobacco leaf curl virus* (TbLCV), *Croton yellow vein mosaic virus* (CYVMV) y *Macrotium golden mosaic virus* (MacGMV) (Araujo, Queiroz, Oliveira, Radaelli & Torres, 2012; Cohen, Duffus, Larsen, Liu & Flock, 1983; Swanson, Valand, Muniyappa & Harrison, 1998; Thomas et al., 1986). También se han desarrollado antígenos recombinantes utilizando *Escherichia coli* para la detección de BGMV-Brazil, *Cabbage leaf curl virus* (CabLCV), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y *Tomato mottle virus* (ToMoV). En este caso, una vez obtenido los antígenos, la técnica se hace económica y simple para detectar los virus (Abouzid et al., 2002).

Las técnicas serológicas presentan una gran especificidad en los pocos casos que se han podido desarrollar, lo cual le permite distinguir entre diferentes virus que presentan la misma sintomatología. A su vez, se puede cuantificar la multiplicación viral en un organismo durante diferentes lapsos. Sin embargo, también presentan varios inconvenientes. El principal problema es que no es útil para todos los begomovirus, como anteriormente se mencionó. Por otro lado, también necesita de un conocimiento previo del virus o que este tenga una similitud con virus previamente descritos (Abouzid et al., 2002; Harrison et al., 2002; Viet, 2007).

ii. Técnicas basadas en ADN genómico

Es necesario realizar una extracción de ácidos nucleicos totales (ANT) para poder corroborar la presencia del ADN viral. Varios métodos de extracción de ANT se han desarrollado entre los que se destaca el CTAB de Doyle y Doyle (1990), la extracción según Dellaporta, Wood, y Hicks (1983). Es necesario un buen rendimiento del ANT en esta etapa, ya que esto determinará el éxito durante la técnica que detecta el ácido nucleico viral (Rouhibakhsh, Priya, Periasamy, Haq & Malathi, 2008; Viet, 2007).

1. Hibridaciones

El Southern Blot es una técnica donde el ADN es separado por electroforesis y luego es transferido a una membrana de nylon cargada positivamente, posteriormente se hibrida con una secuencia complementaria al ADN viral que se encuentra marcado para la detección. Esta técnica se ha utilizado para detectar virus como el *Sweet potato leaf curl virus* (SPLCV) (SPLCV-US) o *Althea rosea enation virus* (AREV). Así mismo, también se utiliza para investigar la presencia del virus en el vector y estudiar las funciones específicas de ciertos genes, entre otras más (Bigarre'l et al., 2001; Lotrakul, Valverde, Clark, Sim & De La Torr, 1998).

La hibridación al estilo Dot Blot es una variante de la hibridación molecular, donde el ADN extraído se coloca directamente sobre una membrana de nylon o nitrocelulosa. Se ha utilizado con anterioridad para detectar BGMV, *Bean calico mosaic virus* (BCaMV), *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), TYLCV y SLCV (Gilbertson, Hidayat & Martinez, 1991; Harper & Creamer, 1995; Potter, Nakhla, Mejía & Maxwell, 2003; Stonor, Hart, Grunther, DeBarro & Rezaian, 2003).

Otra variante es el Squash Blot, donde el tejido es macerado directamente sobre la membrana de nylon para hibridarse, por lo que no se necesita una extracción de ADN previa. Esta técnica se ha utilizado para detectar el BGMV, TYLCV, y otros más (Dalmon, Cailly & David, 2000; King et al., 2012; Picó et al., 1996). También se puede colocar la savia directamente, lo cual se conoce como Sap Blot o Tissue Print, y se ha utilizado para detectar el *Tomato leaf curl New Delhi Virus* (ToLCNDV), entre otras funciones (Sohrab, Mandal & Varma, 2006).

Entre las ventajas que presentan estas técnicas están: la detección inmediata de una hebra de ADN simple banda (ADNsb) y de varias muestras a la vez, la posibilidad de identificar especies y que económicamente no son muy costosas (Dalmon et al., 2000; King et al., 2012; Picó et al., 1996). Por otro lado, el Squash blot y el Sap blot son muy

rápidos, eficientes y confiables de trabajar; sin embargo, son susceptibles a generar falsos positivos y pueden requerir una gran cantidad de muestra. Lo anterior es una limitante para especies que se caracterizan por tener poca savia (Czosnek & Laterrot, 1997; Gilbertson et al., 1991; Sohrab et al., 2006). Otra desventaja de estos análisis es la preparación, la cual es más laboriosa que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se debe esperar más de un día para obtener el resultado (Dalmon et al., 2000; Sohrab et al., 2006).

2. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) fue diseñada por Mullis et al. (1986) y amplifica una secuencia específica de ácidos nucleicos a partir de unas secuencias cortas, conocidas como imprimadores y la acción de una polimerasa. Esta técnica se utiliza por su rapidez, sensibilidad, especificidad y certeza, teniendo como única desventaja la gran sensibilidad a contaminantes (Henson & French, 1993; Martin, James & Levesque, 2000). También ha permitido la detección de grupos de virus en un solo muestreo a partir del uso de imprimadores degenerados, es decir que poseen variantes en pocos nucleótidos, lo cual permite amplificar el mismo sitio genómico en diferentes organismos que presentan una diferencia de reducida nucleótidos (Dalmon et al., 2000; Viet, 2007; Rojas, Gilbertson & Maxwell, 1993). El uso de imprimadores degenerados para la detección de begomovirus es bastante común entre los diferentes grupos de investigación de todo el mundo (Lugo, Uriarte, García & León, 2011; Nakhla, Sorensen, Mejía, Ramírez, Karkashian, & Maxwell, 2004; Ramírez, Chicas, Salas, Maxwell & Karkashian, 2004; Rojas et al., 1993; Van, Persley, Geering, Campbell & Thomas, 2010).

El PCR tiempo real (qPCR) es una variación del PCR convencional, el cual es muy utilizado debido a su rapidez, certeza y sensibilidad en comparación de las pruebas

serológicas, hibridaciones y el PCR convencional (Pérefarres et al., 2011). Permite la cuantificación de la carga viral, lo cual es sumamente importante, ya que dependiendo del virus puede ser que una infección más severa esté asociada a una mayor concentración y distribución del virus en la planta (Alves-Júnior et al., 2009). La técnica fue introducida por Higuchi, Dollinger, Walsh y Griffith (1992), y su fundamento sigue los principios del PCR convencional, sin embargo se le agrega un factor de fluorescencia para la detección. La fluorescencia emite la señal en cada ciclo, lo cual es detectado por un sensor, utilizando un equipo para qPCR. Esto permite tener un resultado sobre la amplificación en tiempo real y la cuantificación bajo condiciones estandarizadas (Fraga, Meulia & Fenster, 2014).

Los tipos de detección más utilizados en PCR tiempo real son SYBR Green y TaqMan®. SYBR Green se considera una fluorescencia no específica que se intercala entre la doble hebra de ADN. SYBR es el más utilizado en las investigaciones, debido a que es barato, accesible y fácil de optimizar inclusive para cuantificación (Fraga et al., 2014; Ponchel et al., 2003; Ramakers, Ruijter, Lekanne & Moorman, 2003). La principal desventaja que presenta es su sensibilidad a contaminantes. Por otro lado, la sonda TaqMan utiliza un sistema de transferencia de energía de resonancia (FRET), el cual se alinea a un sitio específico dentro del amplicón y libera la señal cada ciclo (Fraga et al., 2014; Heid, Stevens, Livak & Williams, 1996).

El PCR tiempo real también tiene la gran ventaja de eliminar la visualización del resultado mediante electroforesis y tinción, aparte de brindar una cuantificación fiable de la carga viral (Pérefarres et al., 2011; Mason, Caciagli, Accotto & Noris, 2008; Papayiannis, Iacovides, Katis & Brown, 2010). En la actualidad, el PCR se ha utilizado para detectar begomovirus utilizando imprimadores específicos que permiten discriminar entre otros miembros del género. Algunas de las especies para las que se han desarrollado imprimadores específicos se encuentran: *Tomato yellow leaf curl*

Sardinia virus (TYLCSV), TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-IL), *Tomato rugose mosaic virus* (ToRMV), *Tomato yellow spot virus* (ToYSV), *Cotton leaf curl Multan virus* (CLCuMuV), SLCV, *Sweet potato leaf curl Uganda virus* (SPLCUV), entre otros (Abrahamian & Abou-Jawdah, 2013; Alves-Júnior et al., 2009; Azhar et al., 2010; Mason et al., 2008; Papayiannis et al., 2010; van-Brunschot et al., 2013; Wasswa et al., 2011). También se ha utilizado esta técnica por su alta sensibilidad para detectar los viriones en extractos de mosca blanca (Abrahamian & Abou-Jawdah, 2013; Mason et al., 2008; van-Brunschot, 2013). Sin embargo, no se han desarrollado imprimadores que permitan realizar una detección de las distintas especies del género en un solo ensayo.

II. JUSTIFICACIÓN

Poco después del año 1960, se realizaron las primeras observaciones de begomovirus en Centroamérica. Fue hasta después de 1987 que los geminivirus tomaron importancia económica por los daños ocasionados a cultivos de arroz, tomate, papa, melón, entre otros (Morales & Anderson, 2001).

Costa Rica no ha sido la excepción, el BGYMV en frijol se detectó en el Valle Central desde los años 60 (Gámez, 1970). Además, se ha identificado el *Melon chlorotic leaf curl virus* (MCLCuV) (anteriormente conocido en el país como Squash yellow mild mottle virus (SYMMoV) en papaya (*Carica papaya*), sandía y *Cucurbita moschata* (Karkashian, Maxwell & Ramírez, 2002). ToLCSiV, ToYMV y TYLCV infectando tomate (Barboza, Blanco-Meneses, Hallwass, Moriones & Inoue-Nagata, 2014; Idris, Rivas-Platero, Torres-Jerez & Brown, 1999; Nakhla et al., 1994), PepGMV en *Capsicum frutescens* y *Capsicum chinense* (Lotrakul, Valverde, De La Torre, Sim & Gomez, 2000), el *Sida golden mosaic virus* (SiGMV-Co) en *Sida rhombifolia* (Engel, Jeske & Frischmuth, 1997), entre otros.

Los virus citados, fueron detectados con diferentes técnicas moleculares; sin embargo, ninguna de ellas utilizó un único protocolo, con todas las ventajas anteriormente mencionadas del qPCR, como lo son una mayor rapidez, sensibilidad y especificidad. Esta investigación desarrolló y validó imprimadores degenerados para qPCR que permitieron la detección de diferentes especies de begomovirus en un sólo ensayo. La implementación de este protocolo no sólo podría beneficiar la detección de virus a partir de su alta sensibilidad, sino que también podría permitir posteriormente la cuantificación de la carga viral de una forma precisa.

Por otro lado, la implementación de esta técnica también trae consigo una ganancia económica. Actualmente, una detección robusta en Laboratorios del CIBCM implica una hibridación y un PCR, lo cual tiene un valor de \$47 por prueba y \$6.50 por

muestra extra (Datos sin publicar). En el caso de utilizar qPCR + Power SYBR[®] Green el costo de la prueba podría ser de \$40.85 por la primera muestra y \$2 por muestra adicional.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un protocolo de detección para begomovirus (Fam. *Geminiviridae*) utilizando la técnica PCR Tiempo Real (qPCR) que permita diagnosticar la presencia de las principales especies presentes en Costa Rica de estos virus de manera general, rápida y eficiente.

Objetivos específicos

Diseñar y evaluar imprimadores degenerados para PCR Tiempo Real que permitan detectar begomovirus.

Estandarizar el método de detección de begomovirus en PCR tiempo real utilizando los imprimadores degenerados

IV. METODOLOGÍA

1. **Extracción de los ácidos nucleicos totales (ANT):**

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio 6 del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM). Se realizaron extracciones de ANT a 37 plantas con sintomatología de virus, que fueron recolectadas previamente en diferentes lugares del país. Las mismas se encontraban liofilizadas y almacenadas a 4 °C (Anexo I). Seis de estas muestras ya contaban con un diagnóstico y se conocía la especie del begomovirus presente mediante secuenciación del componente A, por lo cual se utilizaron como controles positivos durante el Dot blot con imprimadores específicos (Barboza et al. datos sin publicar). Adicionalmente se incluyó una muestra de una planta arvense sin sintomatología y diagnosticada como negativa para begomovirus mediante varias técnicas, esta muestra fue el control negativo en los diferentes ensayos. Las 30 plantas restantes se utilizaron como muestras incógnitas para las hibridaciones por dot blot. Para realizar estas extracciones de ANT se utilizó el método de Dellaporta et al. (1983), con las modificaciones descritas por Hernández, Mora-Umaña, Albertazzi, Karkashian, y Ramírez (2012). Adicionalmente, se cuantificó la cantidad de ANT extraídos y se determinó la calidad de extracción a partir de las métricas 260/280 y 260/230 con una Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc, Delaware, Wilmington).

2. **Hibridaciones por dot blot:**

Las hibridaciones se realizaron mediante “dot blot”. Se colocaron 3 µl de ANT totales, que fueron previamente desnaturalizados (5 min a 95 °C). Los mismos fueron cargados en membranas de nylon Biotodyne A (Pall Corporation, Glen Cove, NY). Las muestras positivas, negativa e incógnitas se fijaron covalentemente a la membrana con

una fuente de luz ultravioleta (UV) por 1 min, calibrada a 50mJ y la señal se detectó con autoradiografías. El ADN de la sonda sin marcar se utilizó como control positivo de sensibilidad colocándose 1 μ l del mismo en la membrana a tres diferentes concentraciones: 10 nanogramos por microlitros (ng/ μ l), 1 ng/ μ l y 0,1 ng/ μ l; que corresponden a $2,28 \times 10^{10}$, $2,28 \times 10^9$ y $2,28 \times 10^8$ copias de ADN, respectivamente. Aparte del control negativo, también se incluyó un control sin molde (por siglas en inglés, NTC), el cual corresponde a agua desionizada.

Las sondas utilizadas son específicas para los virus: *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV), *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), *Squash yellow mild mottle virus* (SYMMoV), *Tomato yellow mottle virus* (ToYMV), *Tomato leaf curl Sinaloa virus* (ToLCSiV) y *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). Para el desarrollo de sondas se utilizaron los imprimadores descritos por Barboza et al. (datos sin publicar). El amplicón de la región hipervariable del componente A (aproximadamente 300 pb) se marcó e hibridó a alta astringencia (75 °C) de acuerdo a las especificaciones del proveedor del sistema de marcado y detección de genes: “Gene Imagen Alkphos Direct Labeling and Detection System” (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ). Adicionalmente, se estimó el límite de sensibilidad de la prueba por sonda específica en copias virales. Para ello se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de copias} = \frac{Xng * 6.0221 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{(N \times 660 \text{ g/mol}) * 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Donde “X” es la cantidad de ng del control de sensibilidad de más baja concentración que logró amplificar, “N” es el tamaño en pares de bases de la sonda, 660 g/mol es el promedio de masa de una base de ADN doble hebra, 6.022×10^{23} es el número de Avogadro y 1×10^9 convierte de ng a gramos (g) (Barczak, Suchorska, Rubiś & Kulcenty, 2015).

3. Diseño de imprimadores para PCR tiempo real:

Para diseñar los imprimadores se utilizaron secuencias de distintos begomovirus que se encontraron disponibles en la base de datos del GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) (Cuadro I). La elección de begomovirus para descargar su secuencia se realizó escogiendo aleatoriamente un representante por clado utilizando el árbol filogenético la familia Geminiviridae propuestos por King et al. (2012), esto con el fin de contar en el estudio con ejemplares de begomovirus que tuvieran diferentes niveles de tiempo de separación evolutiva.

Se alineó la secuencia que codifica para el gen de la proteína de la cubierta (CP) del BGMV con la secuencias completas del componente A de los demás begomovirus y se obtuvo una secuencia consenso utilizando el algoritmo Clustal W en BioEdit versión 7.2.5 (Hall, 1999). Se generó un contig y el mismo fue utilizado para el diseño de imprimadores degenerados utilizando la herramienta Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Se permitieron cinco nucleótidos inespecíficos y una temperatura de fusión de 55 °C (Versión: 2.3.6; Untergasser et al., 2012).

Cuadro I. Nombre del begomovirus y número de accesión de las secuencias (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) utilizadas en el estudio para el diseño de los imprimadores.

Nombre de Virus	Número de Accesión
<i>Bean golden mosaic virus coat protein</i> (BGMV)	AF068644
<i>Corchorus golden mosaic virus</i> (CoGMV)	FJ463902
<i>Rhynchosia golden mosaic virus</i> (RhGMV)	DQ347950
<i>Tobacco yellow crinkle virus</i> (TbYCV)	FJ213931

<i>Tomato severe leaf curl virus</i> (ToSLCV)	AF130415
<i>Rhynchosia mosaic Sinaloa virus</i> (RhGMV-MX)	DQ406672
<i>Bean calico mosaic virus</i> (BCaMV)	AF110189
<i>Euphorbia mosaic virus</i> (EuMV)	FJ807782
<i>Cucurbit leaf crumple virus</i> (CuLCuV)	AF256200
<i>Boerhavia yellow spot virus</i> (BoYSV)	EF121755
<i>Tomato yellow margin leaf curl virus</i> (TOYMLCV)	AY508993
<i>Bean golden yellow mosaic virus</i> (BGYMV)	L01635
<i>Tomato yellow vein streak virus</i> (ToYVSV)	EF417915
<i>Bean golden mosaic virus</i> (BGMV)	M88686
<i>Okra mottle virus</i> (OMoV)	EU914817
<i>Potato yellow mosaic Panama virus</i> (PYMV)	Y15034
<i>Malvastrum yellow mosaic Jamaica virus</i> (MaYMJV)	FJ601917
<i>Tomato mottle Taino virus</i> (ToMoTaV)	AF012300
<i>Tomato yellow leaf distortion virus</i> (ToYLDV)	FJ174698
<i>Corchorus yellow spot virus</i> (CoYSV)	DQ875868
<i>Dolichos yellow mosaic virus</i> (DoYMV)	KJ481204
<i>Kudzu mosaic virus</i> (KuMV)	FJ539014
<i>Rhynchosia yellow mosaic virus</i> (RhYMV)	AM999981
<i>Velvet bean severe mosaic virus</i> (VBSMV)	FN543425
<i>Horsegram yellow mosaic virus</i> (HgYMV)	AM932427
<i>Pepper yellow leaf curl Indonesia virus</i> (PepYLCIV)	AB267834
<i>Tomato yellow leaf curl Indonesia virus</i> (TYLCIDV)	AF189018

4. **PCR tiempo real (qPCR):**

Se utilizaron las muestras detectadas como positivas para begomovirus, así como algunas de donde no se obtuvo ninguna señal (negativas), de acuerdo a lo descrito en el apartado 2. Hibridación por dot blot. Las mismas fueron empleadas para evaluar la capacidad de detección de begomovirus utilizando los imprimadores diseñados en este trabajo. Adicionalmente, para eliminar la posibilidad de falsos negativos se amplificó el gen de la subunidad 1 de la citocromo oxigenasa o *Cox1* como control interno (Weller, Elphinstone, Smith, Boonham & Stead, 2000). Para los dos tipos de ensayos se utilizó el kit “Power SYBR[®] Green” (Applied Biosystems[®], California, Carlsbad) de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Se utilizaron para ambas reacciones un volumen total de 25 uL que contenían: 0,4 μM de los imprimadores, 30 ng de DNA y 1 μM de SYBR[®] Green PCR Master Mix. Las condiciones de termociclaje de ambos ensayos se resumen en el Cuadro II. Adicionalmente, se utilizó una NTC en cada corrida para descartar contaminaciones.

Además, se evaluaron tres muestras escogidas al azar en tres diferentes momentos con los imprimadores para begomovirus, esto con la finalidad de evaluar la respetabilidad del ensayo.

Cuadro II. Condiciones de PCR para la detección de begomovirus y del gen Citocromo oxigenasa 1 (Cox1)

Paso	Begomovirus			Gen COX1		
	Temperatura (°C)	Duración (min:seg)	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Duración (min:seg)	Número de ciclos
1. Activación de la polimerasa	94	10:00	1	95	10:00	1
2. Desnaturalización	94	1:00	30 ciclos	95	0:15	40 ciclos
3. Unión de imprimador	56,5	0:25		60	1:00	
4. Extensión	60	0:45		95	0:15	
5. Paso de disociación	95	0:15	1	95	0:15	1
	60	1:00		60	1:00	
	95	0:15		95	0:15	

5. Análisis de resultados

Las gráficas de qPCR se analizaron utilizando el programa 7500 versión 2.0.6; (Applied Biosystems). El umbral que se estableció para el ensayo de begomovirus es 0,025 y el umbral establecido para la amplificación de Cox1 es 0,047. Se realizó un análisis de la temperatura de fusión (T_m) para confirmar la ausencia de amplificaciones inespecíficas. Los resultados obtenidos en el ensayo fueron comparados con los resultados obtenidos por Dot Blot mediante la prueba chi cuadrado (χ^2). Adicionalmente se evaluó la repetibilidad del ensayo mediante la prueba Kruskal & Wallis

(Kruskal & Wallis, 1952). Los C_T y T_m obtenidos se graficaron con un intervalo de confianza, este intervalo se obtuvo con un nivel de probabilidad de $1 - \alpha$ ($\alpha = 0.2$) de encontrar los valores de C_T y T_m dentro de cada grupo de virus u hospedero. El intervalo se estimó multiplicando la τ asociada (grados de libertad = $n-p$) por la variancia de esa distribución, esto se realizó en el programa RStudio Version 0.99.903 (RStudio 2016). La variancia se estimó según la fórmula descrita en Neter, Kutner, Nachsheim & Wasserman (1996):

$$s^2\{\text{pred}\} = MSE + s^2\{\hat{Y}_h\}$$

V. RESULTADOS

1. Características de las muestras analizadas

Todas las muestras extraídas presentaron una concentración de ANt por encima de los 100 ng/ μ l. La calidad 260/280 fue superior a 1,8 en todas las muestras exceptuando en la muestra 1 que tuvo un valor de 1,39. La calidad 260/230 fue superior a 1,8 en la mayoría de las muestras, exceptuando 13 muestras que mostraron una calidad entre 1,3 - 1,8 (muestras 2, 14, 15, 16, 20, 21, 26, 27, 28, 30, 31, 34 y 35) y la muestra uno cuya calidad fue de 0,72 (Cuadro II; Anexo I).

2. Frecuencia de virus presente en las muestras de estudio

De un total de 38 muestras analizadas, 35 fueron detectadas positivas utilizando Dot blot e imprimadores específicos, se detectaron tres virus distintos en tomate: ToLCSiV se encontró en cuatro muestras (Fig. S1), el ToYMV se encontró en 10 muestras (Fig. S2) y TYLCV se encontró en dos muestras (Fig. S3). Dos plantas de tomate presentaron una coinfección de ToLCSiV y ToYMV. El BGYMV fue detectado en una maleza (Fig. S4). Por otro lado, el SYMMoV se detectó en dos malezas y cinco muestras de ayote (*C. moschata*) (Fig. S5). Las nueve muestras de chile dulce analizadas presentaron PepGMV (Fig. S6). Tres muestras fueron negativas para los virus analizados, dos procedían de arvenses y una de tomate (Cuadro IV). Estos resultados se obtuvieron con una sensibilidad de $2,28 \times 10^9$ copias virales para los ensayos de ToLCSiV y PepGMV, y $2,28 \times 10^8$ copias virales para los ensayos ToYMV, TYLCV, BGYMV y SYMMoV.

3. Detección de virus mediante PCR tiempo real

Las secuencias obtenidas de los imprimadores que permitieron detectar begomovirus por PCR tiempo real son: 5'-GNTGTGARGGNCNTGYAA-3' (sentido) y 3'TCRTCCATCCANAYTTNCC-5' (anti-sentido). Las figuras suplementarias S7-S15 incluyen todas las curvas de amplificación y análisis de disociación encontrados en las muestras estudiadas por PCR tiempo real y estos imprimadores degenerados. Las figuras suplementarias S16-S17 incorporan las curvas de amplificación y análisis de disociación de las mismas muestras utilizando PCR tiempo real e imprimadores degenerados para *Cox1*. Los mismos resultados se resumen en el Cuadro IV.

Los resultados de qPCR no presentan diferencia a los reportados en la prueba de Dot blot utilizando sondas específicas (Cuadro IV; $p = 0,644$; $\chi^2 = 0,214$; g.l.= 1). Todas las muestras encontradas positivas por Dot blot amplificaron por PCR tiempo real utilizando imprimadores degenerados para begomovirus (Cuadro IV; Fig. S7 – S15). Dos de las tres muestras negativas reportadas por Dot blot fueron reportadas negativas con PCR tiempo real e imprimadores degenerados para begomovirus (Cuadro IV; Fig. S7 y S8). La única discordancia se dio en la muestra No.26, la cual fue detectada negativa por Dot blot y positiva por PCR tiempo real (Cuadro IV). La reacción de control interno utilizando el gen citocromo oxigenasa 1 (*Cox1*) permitió corroborar la calidad del ADN que se utilizó para esta investigación, ya que todas las muestras utilizadas en la investigación mostraron una amplificación (Cuadro IV; Fig. S16 y S17).

Cuadro IV. Comparación de resultados entre Dot blot y qPCR según el hospedero, ciclo umbral (por sus siglas en inglés “C_T”) y temperatura de disociación (por sus siglas en inglés “T_m”) para la detección de begomovirus y el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen *Cox1*)

Número de muestra	Hospedero	Dot blot	qPCR para Begomovirus		qPCR para el gen <i>Cox1</i>	
			C _T	T _m (°C)	C _T	T _m (°C)
1 - Control negativo	arvenses	Negativa	Negativa		25,26	75,30
2 - Control negativo	arvenses	Negativa	Negativo		20,87	75,15
3 - Control positivo	arvenses	BGYMV	17,95	77,45	17,33	74,71
4 - Control positivo	Chile dulce	PepGMV	16,23	80,56	16,15	75,15
5	Chile dulce	PepGMV	20,50	80,56	17,86	74,89
6	Chile dulce	PepGMV	16,39	80,17	17,46	75,34
7	Chile dulce	PepGMV	17,31	80,36	18,70	75,52
8	Chile dulce	PepGMV	15,74	80,75	16,98	75,34
9	Chile dulce	PepGMV	16,85	80,56	18,60	75,34
10	Chile	PepGMV	16,65	80,56	19,81	75,15

	dulce					
11	Chile dulce	PepGMV	18,65	80,94	19,35	74,58
12	Chile dulce	PepGMV	16,06	80,36	19,00	74,77
13 - Control positivo	Ayote	SYMMoV	11,40	78,62	19,19	75,15
14	Ayote	SYMMoV	13,71	78,42	19,82	75,08
15	Ayote	SYMMoV	14,32	78,42	20,30	75,34
16	Ayote	SYMMoV	12,14	78,23	21,59	74,96
17	Ayote	SYMMoV	11,73	77,65	19,45	75,34
18	arvenses	SYMMoV	11,12	77,65	19,25	75,08
19	arvenses	SYMMoV	11,04	77,84	20,75	75,52
20 - Control positivo	Tomate	ToLCSiV	19,32	80,36	22,64	75,34
21	Tomate	ToLCSiV	20,65	80,56	21,51	74,71
22	Tomate	ToLCSiV	20,33	80,56	21,85	75,34
23	Tomate	ToLCSiV	17,53	80,75	20,35	75,15
24	Tomate	ToLCSiV / ToYMV	16,67	79,78	22,18	75,15
25	Tomate	ToLCSiV / ToYMV	19,79	80,17	21,45	75,34
26	Tomate	Negativa	26,69	77,28	21,51	74,89
27	Tomate	TYLCV	20,11	77,09	20,50	74,96
28 - Control positivo	Tomate	TYLCV	20,29	77,07	19,99	74,96

29	Tomate	ToYMV	18,77	79,39	21,06	75,15
30 - Control positivo	Tomate	ToYMV	21,70	79,97	18,90	75,52
31	Tomate	ToYMV	21,58	80,17	18,80	75,34
32	Tomate	ToYMV	19,53	80,17	19,12	75,34
33	Tomate	ToYMV	18,64	80,17	20,29	75,15
34	Tomate	ToYMV	19,29	80,17	20,12	74,96
35	Tomate	ToYMV	19,98	80,17	19,81	74,58
36	Tomate	ToYMV	16,08	79,97	19,62	74,77
37	Tomate	ToYMV	20,37	79,97	20,50	74,96
38	Tomate	ToYMV	23,45	79,78	21,07	75,15
Número de muestras positivas			35	36	38	
Número de muestras sin señal			3	2	0	
Total			38	38	38	

Las figuras suplementarias S18 y S19 resumen los valores de ciclo umbral (por sus siglas en inglés “C_T”) y temperatura de disociación según virus encontrados por PCR tiempo real e imprimadores degenerados para begomovirus. Los C_T y la temperatura de disociación de cada muestra varían según el tipo de virus presente, sin embargo, todos los

grupos traslapan entre sí según los límites de confianza obtenidos para C_T . (Cuadro IV; Fig. S18 y S19).

Las muestras infectadas con ToLCSiV (promedio $C_T \pm$ Desviación estándar (sd) = $19,46 \pm 4,89$) y ToYMV (promedio $C_T \pm$ sd = $19,94 \pm 4,58$) presentan un comportamiento semejante. Las muestras positivas para el TYLCV por dot blot, presentaron las amplificaciones más tardías en comparación al resto de begomovirus (promedio $C_T \pm$ sd = $22,36 \pm 5,05$). Por otro lado, aquellas muestras con coinfección de ToLCSiV y ToYMV se intercalan con la de las muestras que presentaban sólo uno de los virus (promedio $C_T \pm$ sd = $18,23 \pm 5,35$). La muestra positiva para BGYMV tuvo un C_T de 17,95 (sd = 6,18) mientras que las muestras positivas para SYMMoV presentaron las amplificaciones más tempranas en el estudio, donde su promedio de C_T fue de 12,21 (sd = 4,67). Por último, las muestras positivas para PepGMV presentaron una amplificación semejante a ToLCSiV y ToYMV (promedio $C_T \pm$ sd = $17,15 \pm 4,61$).

Las muestras positivas para ToLCSiV (promedio $T_m \pm$ sd = $80,56 \pm 0,74$) presentaron temperaturas de disociación semejantes a las que presentó ToYMV (promedio $T_m \pm$ sd = $79,99 \pm 0,70$). Las muestras positivas para TYLCV presentaron temperaturas de disociación menor de todos (promedio $T_m \pm$ sd = $77,63 \pm 0,77$). Las plantas coinfectadas con ToLCSiV y ToYMV (promedio $T_m \pm$ sd = $79,48 \pm 0,81$) presentaron una temperatura de disociación que se traslapa con las muestras infectadas de manera individual con ToYMV o ToLCSiV. La muestra positiva para BGYMV obtuvo una temperatura de disociación de 77,45 (sd = 0,94). Las muestras positivas para SYMMoV (promedio $T_m \pm$ sd = $78,12 \pm 0,71$) presentaron temperaturas de disociación que traslapan con TYLCV y BGYMV. Por último, las muestras con PepGMV (promedio $T_m \pm$ sd = $80,54 \pm 0,70$) presentaron una distribución de temperaturas de disociación que traslapan con ToLCSiV y ToYMV, así como con el grupo de coinfección de las mismas. A nivel general se pueden hacer dos grandes grupos, un

primer grupo donde se encuentran los virus PepGMV, ToLCSiV, ToYMV y coinfecciones. Y un segundo grupo que incluye: BGYMV, SYMMoV y TYLCV.

El C_T y la temperatura de disociación entre las diferentes plantas no varían de manera importante en el ensayo donde se utilizaron los imprimadores para el gen citocromo oxigenasa 1 o *Cox1* (Cuadro IV; Fig. S20-S21). Los C_T de las muestras de tomate (promedio $C_T \pm sd = 20,59 \pm 3,91$), arvenses (promedio $C_T \pm sd = 20,69 \pm 4,17$), ayote (promedio $C_T \pm sd = 20,07 \pm 4,17$) y chile dulce (promedio $C_T \pm sd = 18,21 \pm 4,01$) traslaparon entre sí. La muestra 1 es un valor extremo al presentar un C_T de 25,26. Así mismo, no se encontró diferencia entre las temperaturas de disociación de las plantas de tomate (promedio $T_m \pm sd = 75,09 \pm 0,55$), arvense (promedio $T_m \pm sd = 75,15 \pm 0,59$), ayote (promedio $T_m \pm sd = 75,17 \pm 0,59$) y chile dulce (promedio $T_m \pm sd = 75,12 \pm 0,57$). Las tres muestras analizadas por repetición no presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$), ya que no se observan fluctuaciones importantes entre los diferentes valores de C_T (Cuadro V; Fig. S22-S24) y las temperaturas de fusión ($p > 0.05$) (Cuadro V) entre los diferentes ensayos.

Cuadro V. Valores de ciclo umbral (por sus siglas en inglés “ C_T ”) y temperaturas de disociación (por sus siglas en inglés “ T_m ”) de tres muestras evaluadas, su promedio y desviación estándar ($\pm s$; por sus siglas en inglés).

Número de ensayo	Muestra 15		Muestra 19		Muestra 23	
	C_T	T_m	C_T	T_m	C_T	T_m
1	13,8	77,6	11,7	77,3	18,9	80,0
2	13,4	78,4	11,5	77,8	18,7	80,6
3	14,3	78,4	11,0	77,8	17,5	80,8
Promedio \pm sd	13,8 \pm 0,47	78,2 \pm 0,45	11,4 \pm 0,35	77,6 \pm 0,34	18,4 \pm 0,73	80,4 \pm 0,40

DISCUSIÓN

En esta investigación fue posible detectar diferentes begomovirus utilizando sondas específicas por dot blot, entre los que se encontraron: ToLCSiV, ToYMV y TYLCV en tomate, mientras que el SYMMoV fue detectado en ayote y el PepGMV en chile dulce. La presencia de ToLCSiV, ToYMV y TYLCV en tomate se ha reportado con anterioridad en Costa Rica, al igual que la presencia de SYMMoV en ayote y PepGMV en chile dulce descrito como *Texas pepper virus* (Idris et al., 1999; Jovel, Kleinn, Hilje & Ramírez, 2000; Karkashian et al., 2002; Lotrakul et al., 2000). Así mismo, se encontró BGYMV y SYMMoV en arvenses. Anteriormente se ha reportado la presencia de los mismos virus en diferentes especies de plantas aledañas a cultivos en Centro América y el Caribe (Castro et al., 2013; Sanpedro, González, Pérez & Pérez, 2002). Esto ha llevado a que diferentes autores consideren a las arvenses como reservorios de begomovirus (Inoue-Nagata, Lima & Gilbertson, 2016; Potter et al., 2003; Prajapat, Marwal & Gaur, 2014).

Los imprimadores específicos utilizados para amplificar las secuencias que se marcaron como sondas en Dot blot permitieron detectar la presencia de dos virus en una sola muestra de tomate, el ToLCSiV y ToYMV. Infecciones mixtas se han reportado antes, como por ejemplo en tomate y chile dulce se ha encontrado PepGMV con ToLCSiV y ToSLCVNI, y en zapallo (*Cucurbita argyrosperma*) se ha detectado SYMMoV y PepGMV, los cuales se encontraron en Nicaragua y fueron detectadas utilizando las técnicas PCR con imprimadores degenerados y secuenciación (Ala-Poikela et al., 2005). Las infecciones mixtas son de importancia a nivel evolutivo ya que en cierto tiempo alcanzan un equilibrio permitiendo que surjan especies recombinantes (Davino et al., 2012).

La sensibilidad en el dot blot varía según el ensayo y la sonda del virus utilizado. La mayor sensibilidad en los diferentes ensayos fue de $2,28 \times 10^8$ copias de ADN viral para poder detectar el virus. En el caso de ToLCSiV y PepGMV esta sensibilidad se eleva a $2,28 \times 10^9$ copias. Cabe resaltar que este valor limita el diagnóstico a un tipo de muestra donde la

carga viral es superior a límite de detección (Maule, Hull & Donson, 1983). Es importante mencionar que este punto de detección puede llegar a variar dependiendo de la precisión con la que se ejecute la técnica, por lo cual se hace necesario determinar la reproducibilidad de este límite de detección y así comparar la oportunidad de reportar un falso negativo versus otras técnicas que aseguran ser más sensibles con menos oportunidad de cometer errores (Dalmon et al., 2000; Sohrab et al., 2006). Entre las técnicas que se prefieren en la actualidad se encuentra el PCR tiempo real, ya que muchos aseguran tener el mejor límite de detección a nivel molecular, mejor tiempo de respuesta y menor oportunidad de error (Hu, Li, Barry, Wang & Jordan, 1995; Malinen, Kassinen, Rinttilä & Palva, 2003).

El ensayo para begomovirus utilizando los imprimadores degenerados para qPCR desarrollados en este estudio mostró un alto desempeño y una alta reproducibilidad. Por lo que esta podría considerarse como una nueva opción para la detección de begomovirus. El qPCR permitió corroborar los resultados obtenidos en el ensayo por dot blot en un menor tiempo de análisis. Cabe resaltar la presencia de una muestra positiva por qPCR, cuya señal no pudo ser detectada utilizando dot blot. Este resultado podría explicarse por la posible infección por una especie de virus diferente a las analizadas en el estudio o a una mayor sensibilidad del qPCR. Sin embargo, para lograr esclarecer esta situación se deberá determinar la secuencia del patógeno presente. A la vez, se considera oportuno determinar el límite de sensibilidad del qPCR utilizando los imprimadores diseñados en este estudio, que permita establecer la diferencia en sensibilidad de ambas técnicas.

La distribución en los valores de C_T utilizando los imprimadores de qPCR diseñados en este estudio varía de acuerdo a la especie viral. Diferentes valores de C_T se pueden atribuir a diferente carga viral, ya que a mayor cantidad de ADN molde, menor el valor de C_T (Arya et al., 2014). Sin embargo, para poder asegurar cargas virales diferentes es

necesario corroborar primero con estándares conocidos de cuantificación para determinar que un menor C_T corresponden a una mayor carga viral cuando se utiliza estos imprimadores degenerados para begomovirus. También es necesario llevar a cabo una normalización de los datos según cantidad de muestra analizada. Un ejemplo es el estudio de Urbino, Thébaud, Granier, Blanc y Peterschmitt (2008), el cual utiliza la química SYBR Green para determinar carga viral en begomovirus, para ello crean estándares de cuantificación y normalizan con un control interno el cual es una amplificación del gen de la Actina 2.

Todas las muestras amplificaron correctamente para el gen *Cox1*, el cual permitió determinar que se contaba con una calidad de muestra suficiente para realizar la detección de begomovirus utilizando qPCR (Cuadro IV; Fig. S16-S17). El uso de ensayos control es altamente utilizado en esta clase de pruebas con la finalidad de evaluar la calidad de la extracción de ADN. Este ensayo permitió descartar la posibilidad de un falso negativo, en los ensayos realizados para probar los imprimadores diseñados en este estudio para el qPCR (Hoorfar et al., 2004; Menzel, Jelkmann & Maiss, 2002). Cabe resaltar que los C_T en el ensayo del gen *Cox1* se mantienen relativamente homogéneos en las diferentes plantas. La única muestra cuyo C_T se desplaza tres ciclos más es la muestra control No. 1. Esto se puede deber a una posible presencia de contaminantes proteicos ya que la muestra no cuenta con una relación 260/280 inferior a las demás muestras (Muestra 1; Cuadro III) (Demeke & Jenkins, 2010).

El análisis de curvas de disociación permite determinar la ausencia de amplificaciones inespecíficas y diversidad de ampliaciones entre muestras (Herrmann, Durtschi, Wittwer & Voelkerding, 2007; Rasmussen, Morrison, Herrmann & Wittwer, 1998). En el presente ensayo los resultados muestran un T_m muy variante en cuanto al ensayo con imprimadores para begomovirus, mientras que el ensayo utilizando los imprimadores para amplificar el control interno, *Cox1*, presentó un T_m similar para todas

las muestras analizadas. Las variaciones en los T_m para las distintas especies virales, se debe a variaciones en las secuencias de nucleótidos del gen de la cápside, que a pesar de ser una secuencia muy conservada entre los distintos miembros del género, presenta variantes en la secuencia nucleotídica, que pueden darse por las interacciones con el hospedero (Acosta-Leal, Duffy, Xiong, Hammond & Elena, 2011). Diversas publicaciones han utilizado la diferencia entre las amplificaciones de T_m , para realizar un diagnóstico parcial de especies (Winder et al., 2011; Yvon, Monsion, Martin, Gutiérrez & Blanc, 2009). Aunque en este estudio esto no fue validado, es probable que estos valores se puedan utilizar para determinar la presencia de un begomovirus específico en ensayos futuros, sin embargo, sería necesaria la estandarización rigurosa con muchas muestras y distintas especies virales.

En la actualidad, existen diferentes instrumentos que permiten realizar una curva de disociación de alta resolución, esto ha permitido estandarizar procesos de genotipo sin necesidad de secuenciar. Los imprimadores diseñados en este estudio también se podrían utilizar en esta clase de equipos, para con ello estandarizar un T_m más específico por virus, esto permitiría realizar en un solo ensayo la determinación y diagnóstico parcial del virus presente, además de emplear un menor tiempo y costo. También, podría ser un indicativo de variantes o virus no detectados previamente en los ensayos de diagnóstico (Demeke & Jenkins, 2010; Holysz, Bialas, Migdalski, Kmiecik & Trzeciak, 2015; Renz, Cheetham & Walkden-Brown, 2013). Al contrario, la poca variación entre los valores de T_m reportados en ensayo utilizando los marcadores internos *Cox1*, reflejan muy poca variación genética en esta zona, lo cual se ha reportado con anterioridad, ya que es gen importante a nivel evolutivo (Fig. S21; Adams, Qiu, Stoutemyer & Palmer, 2002; Chase et al., 2005).

En conclusión, existen gran diversidad de técnicas que se pueden utilizar para el diagnóstico de begomovirus, entre ellas se encuentran dot blot, PCR, PCR tiempo real y

otras (Lotrakul et al., 1998; Stonor et al., 2003; Ramírez et al., 2004; Alves-Júnior et al., 2009). En el presente estudio se diagnosticaron diferentes begomovirus y hospederos utilizando imprimadores degenerados y PCR tiempo real, teniendo como resultado la misma eficacia que la técnica dot blot. Futuros proyectos pueden utilizar esta técnica para diagnóstico inicial de begomovirus en diferentes muestras. Cabe resaltar, la posibilidad de complementar el resultado con una posterior secuenciación del amplicón, para con ello realizar un diagnóstico parcial de la especie de begomovirus (Paximadis, Muniyappa & Rey, 2001). Así mismo, se podría estandarizar a futuro esta técnica para identificar begomovirus mediante análisis de disociación o realizar cargas virales de begomovirus en diferentes hospederos y tejidos.

VI. LITERATURA CITADA

- Abouzid, A. M., Freitas-Astua, J., Purcifull, D.E., Poston, J.E., Beckham, K.A., Crawford, W.E., & Hiebert, E. (2002). Serological studies using polyclonal antisera prepared against the viral coat protein of four begomoviruses expressed in *Escherichia coli*. *Plant Disease*, *86*, 1109-1114.
- Abrahamian, P. E. & Abou-Jawdah, Y. (2013). Detection and quantitation of the new world Squash leaf curl virus by TaqMan real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, *191*, 76–81. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.04.001.
- Acosta-Leal, R., Duffy, S., Xiong, Z., Hammond, R. W., & Elena, S. F. (2011). Advances in plant virus evolution: translating evolutionary insights into better disease management. *Phytopathology*, *101*(10), 1136-1148.
- Adams, K. L., Qiu, Y. L., Stoutemyer, M., & Palmer, J. D. (2002). Punctuated evolution of mitochondrial gene content: high and variable rates of mitochondrial gene loss and transfer to the nucleus during angiosperm evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(15), 9905-9912.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. London, United Kingdom: Elsevier.
- Ala-Poikela, M., Svensson, E., Rojas, A., Horko, T., Paulin, L., Valkonen, J. P. T., & Kvarnheden, A. (2005). Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant pathology*, *54*(4), 448-459.
- Alves-Júnior, M., Alfenas-Zerbini, P., Andrade, E.C., Esposito, D.A., Silva, F.N., Cruz, A.C.F., & Murilo, F. (2009). Synergism and negative interference during co- infection of tomato and *Nicotiana benthamiana* with two bipartite begomoviruses. *Virology*, *387*, 257–266.

- Araujo, J.A., Queiroz, A.K., Oliveira, V.B., Radaelli, P., & Torres, J. (2012). Serological detection and molecular characterization of a begomovirus isolate obtained from *Macroptilium lathyroides*. *Revista Caatinga*, 25, 14-20.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2014). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert review of molecular diagnostics*, 5(2), 209-219.
- Azhar, M.T., Amin, I., Iqbal, Z., Arshad, M., Briddon, R. W. & Mansoor, S. (2010). Both malvaceous and non-malvaceous betasatellites are associated with two wild cotton species grown under field conditions in Pakistan. *Virus Genes*, 41, 417–424.
- Barboza, N., Blanco-Meneses, M., Hallwass, M., Moriones, E., & Inoue-Nagata, A. K. (2014). First Report of *Tomato yellow leaf curl virus* in Tomato in Costa Rica. *Plant Disease*, 98(5), 699-699.
- Barczak, W., Suchorska, W., Rubiś, B., & Kulcenty, K. (2015). Universal Real-Time PCR-Based Assay for Lentiviral Titration. *Molecular Biotechnology*, 57, 195–200. <http://doi.org/10.1007/s12033-014-9815-4>
- Bela-ong, D. B. & Bajet, N. B. (2007). Molecular Detection of Whitefly-Transmissible Geminiviruses (Family *Geminiviridae*, Genus *Begomovirus*) in the Philippines. *Philippine Journal of Science*, 136, 87-101.
- Bigarre´l, L., Chazly, M., Salah, M., Ibrahim, M., Padidam, M., Nicole, M. & Thouvenel, J.C. (2001). Characterization of a new begomovirus from Egypt infecting hollyhock (*Althea rosea*). *European Journal of Plant Pathology*, 107, 701-711.
- Boykin, L. M. (2014). *Bemisia tabaci* nomenclature: lessons learned. *Pest management science*, 70, 1454-1459.

- Carter, J. & Saunders, V. (2007). *Virology Principles and Applications*. England: John Wiley & Sons.
- Castro, R. M., Moreira, L., Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., Hernández, E., Mora, F., & Ramírez, P. (2013). Occurrence of *Squash yellow mild mottle virus* and *Pepper golden mosaic virus* in Potential New Hosts in Costa Rica. *The Plant Pathology Journal*, 29(3), 285–293.
- Chase, M. W., Salamin, N., Wilkinson, M., Dunwell, J. M., Kesanakurthi, R. P., Haidar, N., & Savolainen, V. (2005). Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360(1462), 1889-1895.
- Chen, G., Pan, H., Xie, W., Wang, S., Wu, Q., Fang, Y., ... Zhang, Y. (2013). Virus infection of a weed increases vector attraction to and vector fitness on the weed. *Scientific Reports*, 3, 1-6. doi: 10.1038/srep02253.
- Cohen, S., Duffus, J. E., Larsen, R. C., Liu, H. Y. & Flock, R. A. (1983). Purification, Serology and Vector Relationships of *Squash leaf curl virus*, a Whitefly-transmitted Geminivirus. *Phytopathology* 73:1669-1673.
- Czosnek, H. & Laterrot, H. (1997). A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology*, 142, 1391-1406.
- Dalmon, A., Cailly, M. & David, C. (2000). Comparison of serological and molecular techniques for detection of *Tomato yellow leaf curl begomovirus*. *Bulletin OEPP/EPPO*, 30, 457-462.
- Davino, S., Miozzi, L., Panno, S., Rubio, L., Davino, M. & Accotto, G. P. (2012). Recombination profiles between *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato*

yellow leaf curl Sardinia virus in laboratory and field conditions: evolutionary and taxonomic implications. *Journal of General Virology*, 93(12), 2712-2717.

Dellaporta, S.L., Wood, J., & Hicks, J.B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1 (4), 19-21.

Demeke, T., & Jenkins, G. R. (2010). Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and quantification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(6), 1977-1990.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12, 13-15.

Duffy, S. & Holmes, E. C. (2008). Phylogenetic Evidence for Rapid Rates of Molecular Evolution in the Single-Stranded DNA Begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus*. *Journal of Virology*. *Journal of Virology*, 82, 957-965.

Duffy, S. & Holmes, E. C. (2009). Validation of high rates of nucleotide substitution in geminiviruses: phylogenetic evidence from East African cassava mosaic viruses. *Journal of General Virology*, 90, 1539–1547.

Engel, M., Jeske, H., & Frischmuth, T. (1997). Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *Journal of general virology*, 78(7), 1785-1790.

Fauquet, C.M., Briddon, R.W., Brown, J.K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., & Zhou, X. (2003). Geminivirus strain demarcation and nomenclature. *Archives of Virology*, 153: 783-82.

Firdaus, S., Vosman, B., Hidayati, N., Jaya, E. D., Visser, R., & vanHeusden, A. H. (2012). The *Bemisia tabaci* species complex: Additions from different parts of the world. *Insect Science*, 00, 1-11. doi: 10.1111/1744-7917.12001

- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2014). Real-Time PCR. *Current protocols essential laboratory techniques*, 10.3, 10.3.1-10.3.40.doi: 10.1002/9780470089941.et1003s08.
- Gómez, R. (1970). *El virus del moteado amarillo del frijol, plantas hospederas y efecto en producción* (XV Reunión Annual PCCMCA). Antigua Guatemala: IICA Zona Norte Guatemala C.A.
- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., & Martinez, R. T. (1991). Differentiation of Bean-Infecting Geminivirus by Nucleic Acid Hybridization Probes and aspects of Bean Golden Mosaic in Brazil. *Plant Disease*, 75, 336-342.
- Gutiérrez, C. (2002). Strategies for geminivirus DNA replication and cell cycle interference. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60, 219-230.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S., & Robertson, D. (1999). Geminiviruses: models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(1), 71-106.
- Harper, K. & Creamer, R. (1995). Hybridization detection of insect-transmitted plant viruses with digoxigenin-labeled probes. *Plant Disease*, 79, 563-567.
- Harrison, B.D. & Robinson, D.J. (1999). Natural Genomic and antigenic variation in whitefly-transmitted geminiviruses (Begomoviruses). *Annual Reviews of Phytopathology*, 37, 369-398.

- Harrison, B.D., Swanson, M.M., & Fargette, D. (2002). Begomovirus coat protein: serology, variation and functions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 60, 257-271.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6, 986-994.
- Henson, J.M. & French, R. (1993). The polymerase chain-reaction and plant-disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 31, 81-109.
- Hernández, E. J., Mora-Umaña, F., Albertazzi, F., Karkashian, J. P., & Ramírez, P. (2012). Comparative Analysis of Three Different Total Nucleic Acid Extraction Protocols for the Diagnosis of Geminiviruses in Squash (*Cucurbita moschata*). *Journal of Phytopathology*, 160, 19–25. doi:10.1111/j.1439-0434.2011.01850.x
- Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Wittwer, C. T., & Voelkerding, K. V. (2007). Expanded instrument comparison of amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping. *Clinical chemistry*, 53(8), 1544-1548.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*, 10, 413-417.
- Hilje, L. (2001). Avances hacia el manejo sostenible del complejo mosca blanca-geminivirus en tomate, en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas*, 61, 69-80.
- Holysz, M., Bialas, K., Migdalski, P., Kmieciak, D., & Trzeciak, W. H. (2015). Application of a high-resolution melting technique for the rapid detection of partial replacement of HCV-1b by HCV-1a after PEG-IFN α /RBV therapy. *Journal of applied genetics*, 56(2), 271-275.

- Hoorfar, J., Malorny, B., Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., & Fach, P. (2004). Practical considerations in design of internal amplification controls for diagnostic PCR assays. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(5), 1863-1868.
- Hu, J. S., Li, H. P., Barry, K., Wang, M., & Jordan, R. (1995). Comparison of dot blot, ELISA, and RT-PCR assays for detection of two cucumber mosaic virus isolates infecting banana in Hawaii. *Plant Disease*, *79*(9), 902-906.
- Idris, A. M., Rivas-Platero, G., Torres-Jerez, I., & Brown, J. K. (1999). First report of *Sinloa tomato leaf curl geminivirus* in Costa Rica. *Plant Disease*, *83*(3), 303-303.
- Inoue-Nagata, A. K., Lima, M. F., & Gilbertson, R. L. (2016). A review of geminivirus diseases in vegetables and other crops in Brazil: current status and approaches for management. *Horticultura Brasileira*, *34*(1), 8-18.
- Jeske, H. (2009). Geminiviruses. *Current topics in microbiology and immunology*, *331*, 185-226.
- Jones, R.A.C. (2009). Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions, and prospects for control. *Virus Research*, *141*, 113–130.
- Jovel, J., Kleinn, C., Hilje, L., & Ramírez, P. (2000). Distribution of spatio-temporal spread of yellow mottle virus (ToYMoV) in tomato plots, in Turrialba, Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas*, *57*, 35-44.
- Karkashian, J.P., Maxwell, D.P., & Ramírez, P. (2002). Squash yellow mottle geminivirus; a new cucurbit-infecting geminivirus from Costa Rica. *Phytopathology*, *92*, S125.
- Khan, J.A. (2000). Detection of tomato leaf curl geminivirus in its vector *Bemisia tabaci*. *Indian Journal of Experimental Biology*, *38*, 512-515.

- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., & Lefkowitz, E.J. (2012). *Virus Taxonomy Classification and Nomenclature of viruses Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. United States of America: Elsevier.
- Kruskal, W. H., & Wallis, W. A. (1952). Use of ranks in one-criterion variance analysis. *Journal of the American statistical Association*, 47(260), 583-621.
- Kumari, S. G., Makkouk, K. M., & Attar, N. (2006). An Improved Antiserum for Sensitive Serologic Detection of *Chickpea chlorotic dwarf virus*. *Phytopathology*, 154, 129-133.
- Lazarowitz, S., & Shepherd, R. J. (1992). Geminiviruses: Genome Structure and Gene Function. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 11(4), 327-349.
- Lotrakul, P., Valverde, R.A., Clark, C.A., Sim, J., & De La Torr, R. (1998). Detection of a Geminivirus Infecting Sweet Potato in the United States. *Plant Disease*, 82(11), 1253-1257.
- Lotrakul, P., Valverde, R. A., De La Torre, R., Sim, J., & Gomez, A. (2000). Occurrence of a strain of Texas pepper virus in Tabasco and Habanero pepper in Costa Rica. *Plant disease*, 84(2), 168-172.
- Lozano, G., Trenado, H.P. Valverde, R.A., & Navas-Castillo, J. (2009). Novel begomovirus species of recombinant nature in sweet potato (*Ipomoea batatas*) and *Ipomoea indica*: taxonomic and phylogenetic implications. *Journal of General Virology*, 90, 2550–2562.
- Lugo, O. Y., Uriarte, R. G., García, R. S., & León, J. (2011). Geminivirus Transmitidos por Mosca Blanca (*Bemisia tabaci*) en Tomate, en el Valle Agrícola de Culiacán, Sinaloa. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 29(2), 109-118.

- Malinen, E., Kassinen, A., Rinttilä, T., & Palva, A. (2003). Comparison of real-time PCR with SYBR Green I or 5'-nuclease assays and dot-blot hybridization with rDNA-targeted oligonucleotide probes in quantification of selected fecal bacteria. *Microbiology*, *149*(1), 269-277.
- Martin, R. R., James, D., & Levesque, C. A. (2000). Impacts of molecular diagnostic technologies on plant disease management. *Annual Review of Phytopathology*, *38*, 207-239.
- Mason, G., Caciagli, P., Accotto, G.P., & Noris, E. (2008). Real-time PCR for the quantitation of *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* in tomato plants and in *Bemisia tabaci*. *Journal of Virological Methods*, *147*, 282–289.
- Maule, A. J., Hull, R., & Donson, J. (1983). The application of spot hybridization to the detection of DNA and RNA viruses in plant tissues. *Journal of Virological Methods*, *6*(4), 215-224.
- Menzel, W., Jelkmann, W., & Maiss, E. (2002). Detection of four apple viruses by multiplex RT-PCR assays with coamplification of plant mRNA as internal control. *Journal of Virological Methods*, *99*(1), 81-92.
- Morales, F. J. & Anderson, P. K. (2001). The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminivirus in Latin America. *Archives of Virology*, *146*, 415-441.
- Morales, F. J. (2011). Interaction between *Bemisia tabaci*, begomoviruses, and plant species in Latin America and the Caribbean. En *The Whitefly, Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae) Interaction with Geminivirus-Infected Host Plants* (pp. 15-49). Netherlands: Springer.

- Mouhanna, A.M., Langen, G., & Schlösser, E. (2008). Weeds as alternative hosts for BSBV, BNYVV, and the vector *Polymyxa betae* (German isolate). *Journal of Plant Diseases and Protection*, *115*, 93–198.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *51*, 263-273.
- Nakhla, M. K., Maxwell, M. D., Hidayat, S. H., Lange, D. R., Loniello, A. O., Rojas, M. R., ... Gilbertson, R. L. (1994). Two geminiviruses associated with tomatoes in Central America, *Phytopathology*, *84*, 1155.
- Nakhla, M. K., Sorensen, A., Mejía, L., Ramírez, P., Karkashian, J. P., & Maxwell, D. P. (2004). Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. In *I International Symposium on Tomato Diseases 695* (pp. 277-288).
- Nava, A. R., Patte, C. P., Hiebert, E., & Polston, J. E. (2006). Detection and variability of begomoviruses in tomato from the Andean states of Venezuela. *Plant disease*, *90*(1), 61-66.
- Navas-Castillo, J., Fiallo-Olivé, E., & Sanchez-Campos, S. (2011). Emerging Virus Diseases Transmitted by Whiteflies. *Annual Review Phytopathology*, *49*, 219-248.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S. & Fauquet, C. M. (2009). Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Letters*, *583*, 1825-1832.
- Neter, J., Kutner, M. H., Nachtsheim, C. J., & Wasserman, W. (1996). *Applied linear statistical models* (Vol. 4, p. 318). Chicago: Irwin.

- Papayiannis, L.C., Iacovides, T.A., Katis, N.I. & Brown, J.K. (2010) Differentiation of *Tomato yellow leaf curl virus* and *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* using real-time TaqMan® PCR. *Journal of Virological Methods*, 165, 238–245.
- Paximadis, M., Muniyappa, V., & Rey, M. E. C. (2001). A mixture of begomoviruses in leaf curl-affected tobacco in Karnataka, South India. *Annals of applied biology*, 139(1), 101-109.
- Péréfarres, F., Hoareau, M., Chiroleu, F., Reynaud, B., Dintinger, J., & Lett, J.M. (2011). A novel synthetic quantification standard including virus and internal report targets: application for the detection and quantification of emerging begomoviruses on tomato. *Virology Journal*, 8, 389.
- Peterschmitt, M., Reynaud, B., Sommermeyer, G., & Baudin, P. (1991). Characterization of Maize Streak Virus Isolates using monoclonal and polyclonal antibodies and by transmission to a few hosts. *Plant Disease*, 75, 27-32.
- Picó, B., Díez, M. J., & Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. II. The tomato yellow leaf curl virus – a review. *Scientia Horticulturae*, 67,151-196.
- Pinner, M. S., Markham, P.G., Rybicki, E.P., & Greber, R. S. (1992). Serological relationships of geminivirus isolates from Gramineae in Australia. *Plant Pathology*, 41, 618-625.
- Polston, J. E., & Anderson, P.K. (1997). The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in Tomato in the Western Hemisphere. *Plant Disease*, 81(12), 1358-1369.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S. H., Field, S.L. & Markham, A.F. (2003). Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An

alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology*, 3, 18. doi: 10.1186/1472-6750-3-18

Potter, J. L., Nakhla, M. K., Mejía, L., & Maxwell, D. P. (2003). PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. *Plant Disease*, 87(10), 1205-1212.

Prajapat, R., Gaur, R. K., Raizada, R., & Gupta, V. K. (2010). In silico analysis of genetic diversity of begomovirus using homology modelling. *Journal of Biological Sciences*, 10, 217-223.

Prajapat, R., Marwal, A., & Gaur, R. K. (2014). Begomovirus associated with alternative host weeds: a critical appraisal. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(2), 157-170.

Quiros, C.A., Calvo, G., & Ramírez, O. (1995). Diagnóstico de la problemática fitosanitaria del cultivo de tomate, con énfasis en mosca blanca *Bemisia tabaci* (Geminivirus). *Manejo Integrado de Plagas*, 38, 8-15.

Ramakers, C., Ruijter, J.M., Lekanne, R. H., & Moorman, F. M. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience letters*, 339, 62-66.

Ramírez, P., Chicas, M., Salas, J., Maxwell, D. & Karkashian, J. (2004). Identificación de un nuevo begomovirus en melón (*Cucumis melo* L.) en Lara, Venezuela. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 72, 22-30.

Rasmussen, R., Morrison, T., Herrmann, M. A. R. K., & Wittwer, C. A. R. L. (1998). Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. *Biochemica*, 2(8), 11.

- Renz, K. G., Cheetham, B. F., & Walkden-Brown, S. W. (2013). Differentiation between pathogenic serotype 1 isolates of Marek's disease virus and the Rispens CVI988 vaccine in Australia using real-time PCR and high resolution melt curve analysis. *Journal of virological methods*, *187*(1), 144-152.
- Roberts, I. M., Robinson, D. J., & Harrison, B. D. (1984). Serological Relationships and Genome Homologies among Geminiviruses. *Journal of General Virology*, *65*, 1723-1730.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L., & Maxwell, D. P. (1993). Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant disease*, *77*(4), 340-347.
- 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.
- Rojas, A., Kvarnheden, A., Marcenaro, D., & Valkonen, J. P. T. (2005a). Sequence characterization of tomato leaf curl Sinaloa virus and tomato severe leaf curl virus: phylogeny of New World begomoviruses and detection of recombination. *Archives of Virology*, *150*(7), 1281-1299.
- Rouhibakhsh, A., Priya, J., Periasamy, M., Haq, Q.M.I., & Malathi, V.G. (2008). An improved DNA isolation method and PCR protocol for efficient detection of multicomponents of begomovirus in legume. *Journal of Virological Methods*, *147*, 37-42.
- RStudio (2016). RStudio: Integrated development environment for R (Version 0.99.903) [Computer software]. Boston, MA. Retrieved May 20, 2012. Available from <http://www.rstudio.org/>

- Sanpedro, J., González, M., Pérez, N., & Pérez, E. (2002). Malezas hospedantes de geminivirus en campos de frijol en Cuba. *MIPA* 66, 36-38.
- Seal, S. E., vandenBosch, F., & Jeger, M. J. (2006). Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25, 23-46.
- Shu-sheng, L., Colvin, J., & De-Barro, P. J. (2012). Species Concepts as Applied to the Whitefly *Bemisia tabaci* Systematics: How Many Species Are There? *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2), 176-186.
- Sohrab, S.S., Mandal, B., Ali, A., & Varma, A. (2006). Molecular Diagnosis of emerging begomovirus disease in cucurbits occurring in northern India. *Indian Journal of Virology*, 17, 88-95.
- Stanley, J., Boulton, M. I., & Davies, J. W. (2005). *Geminiviridae*. eLS. doi: 10.1038/npg.els.0000750.
- Stonor, J., Hart, P., Grunther, M., DeBarro, P., & Rezaian, M. A. (2003). *Tomato leaf curl* geminivirus in Australia: occurrence, detection, sequence diversity and host range. *Plant Pathology*, 52, 379-388.
- Sunitha, S., Shanmugapriya, G., Balamani, V., & Veluthambi, K. (2013). *Mungbean yellow mosaic virus* (MYMV) AC4 suppresses post-transcriptional gene silencing and an AC4 hairpin RNA gene reduces MYMV DNA accumulation in transgenic tobacco. *Virus genes*, 46(3), 496-504.
- Swanson, M.M., & Harrison, B. D. (1993). Serological relationships and epitope profiles of isolates of okra leaf curl geminivirus from Africa and the Middle east. *Biochimie*, 75, 707-711.

- Swanson, M. M., Valand, G.B., Muniyappa,V., & Harrison, B.D. (1998). Serological detection and antigenic variation of two whitefly-transmitted geminiviruses: tobacco leaf curl and croton yellow vein mosaic viruses. *Annals of Applied Biology*, *132*, 427-435.
- Thomas, J.E., Massalski, P.R., & Harrison, B.D. (1986). Production of monoclonal antibodies to *African cassava mosaic virus* and differences in their reactivities with other whitefly-transmitted geminiviruses. *Journal of General Virology*, *67*, 2739-2748.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., & Rozen, S.G. (2012). Primer3-- new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, *40*(15), e115.
- 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*(1), 1.
- Van, S.L, Persley, D. M., Geering, A. D. W., Campbell, P. R., & Thomas, J. E. (2010). *Tomato yellow leaf curl virus* in Australia: distribution, detection and discovery of naturally occurring defective DNA molecules. *Australasian Plant Pathology*, *39*(5), 412-423.
- van-Brunschot, S.L., Gambleyc, C.F., De-Barrod, P.J., Gramse, R., Thomasaf, J.E., Hendersonf, J., ... Geeringaf, A.D.W. (2013). Panel of real-time PCRs for the multiplexed detection of two tomato-infecting begomoviruses and their cognate whitefly vector species. *Plant Pathology*, *62*, 1132–1146. Doi: <http://dx.doi.org/10.1603/AN09061>.

- Varma, A. & Malathi, V.G. (2003). Emerging geminivirus problems: A serious threat to crop production. *Annals of Applied Biology*, 142, 145-164.
- Viet, C. (2007). *Detection and Identification of Potyviruses and Geminiviruses in Vietnam* (Doctoral thesis). Queensland University of Technology, Australia.
- Wasswa, P., Ottoa, B., Maruthia, M. N., Mukasab, S. B., Mongerc, W. & Gibson, R. W. (2011). First identification of a sweet potato begomovirus (sweepovirus) in Uganda: characterization, detection and distribution. *Plant Pathology*, 60, 1030–1039.
- Weller, S. A., Elphinstone, J. G., Smith, N. C., Boonham, N., & Stead, D. E. (2000). Detection of *Ralstonia solanacearum* Strains with a Quantitative, Multiplex, Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2853-2858.
- Winder, L., Phillips, C., Richards, N., Ochoa-Corona, F., Hardwick, S., Vink, C. J., & Goldson, S. (2011). Evaluation of DNA melting analysis as a tool for species identification. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(3), 312-320.
- Wyatt, S. D. & Brown, J. K. (1996). Detection of subgroup III Geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 86, 1288- 1293.
- Yadava, P., Suyal, G., & Mukherjee, S. K. (2010). Begomovirus DNA replication and pathogenicity. *Current Science*, 98(3), 360-368.
- Yvon, M., Monsion, B., Martin, J. F., Gutiérrez, S., & Blanc, S. (2009). PCR-based amplification and analysis of specific viral sequences from individual plant cells. *Journal of virological methods*, 159(2), 303-307.

VII. ANEXOS

Número de muestra	Fecha de recolección	Procedencia	Hospedero	Concentración de ácidos nucleicos (ng/μl)	Calidad 260/280	Calidad 260/230
1 – Control Negativo	13/04/2011	San Vito Coop Victoria	Arvense	2588,1	1,39	0,72
2	25/02/2011	Puntarenas 2888 ICE	Arvenses, asociado a cultivos de tempate	141,6	1,82	1,37
3 - Control Positivo BGYMV	26/07/2011	Cachí, Campo abierto	Arvense, asociado a cultivos de chile	843,9	1,97	2,1
4 - Control Positivo PepGMV	09/12/2012	Cervantes	Chile dulce	325,7	1,95	1,9
5	09/12/2012	Cervantes	Chile dulce	322,2	1,92	1,99
6	09/12/2012	Cervantes	Chile dulce	244,7	1,88	2,06
7	09/12/2012	Cervantes	Chile dulce	522,5	1,89	2,09

Cuadro III. Fecha de recolección, procedencia, hospedero, concentración de ácidos nucleicos, calidad 260/280 y calidad 260/230 según muestra utilizada en el estudio

8	09/12/2012	Santiago, Cartago	Chile dulce	375,5	2,02	1,95
9	09/12/2012	Santiago, Cartago	Chile dulce	532,2	1,97	2,02
10	09/12/2012	Santiago, Cartago	Chile dulce	553,8	2,01	2
11	09/12/2012	Ujarrás	Chile dulce	218,9	2,1	1,87
12	09/12/2012	Ujarrás	Chile dulce	128,5	2,05	1,93
13 - Control Positivo SYMMoV	15/01/2013	Upala	Ayote	417,8	2,1	2,11
14	15/01/2013	Upala	Ayote	184,9	2	1,76
15	15/01/2013	Upala	Ayote	221,7	2,01	1,61
16	15/01/2013	Upala	Ayote	193,1	1,95	1,62
17	15/01/2013	Upala	Ayote	346,3	2,08	2,18
18	15/01/2013	Upala	Arvense	323,9	2,07	2,18

19	15/01/2013	Upala	Arvense	419,4	2,09	2,24
20 - Control Positivo ToLCSiV	03/03/2011	Grecia, Campo Abierto Santa Gertrudis	Tomate	1577,7	1,87	1,3
21	03/03/2011	Grecia, Campo Abierto Santa Gertrudis	Tomate	2237,1	2	1,71
22	03/03/2011	Grecia, Campo Abierto Sta Gertrudis	Tomate	2478,6	2,03	1,79
23	11/06/2012	Servicio #37	Tomate	803,2	2,06	2,31
24	03/03/2011	Grecia, Campo Abierto Sta Gertrudis	Tomate	2961,1	2,07	1,88
25	03/03/2011	Grecia, Campo Abierto Sta Gertrudis	Tomate	2081,8	2,02	1,77
26	26/03/2012	San Juan, Tomate en invernadero	Tomate	693,5	1,9	1,48

27	26/03/2012	San Juan, Tomate en invernadero	Tomate	1119,7	1,97	1,54
28 - Control Positivo TYLCV	26/03/2012	San Juan, Tomate en invernadero	Tomate	1213,1	1,98	1,67
29	03/03/2011	Grecia, Campo Abierto Sta Gertrudis	Tomate	1822,3	2,03	1,76
30 - Control Positivo ToYMV	29/03/2012	Zarcero	Tomate	503,4	1,94	1,38
31	29/03/2012	Zarcero	Tomate	293,1	1,85	1,22
32	29/03/2012	Zarcero	Tomate	798,2	2,01	1,87
33	29/03/2012	Zarcero	Tomate	1238,1	2,05	1,79
34	29/03/2012	Zarcero	Tomate	541,4	1,93	1,48
35	29/03/2012	Zarcero	Tomate	583,9	1,93	1,64

36	29/03/2012	Zarcero	Tomate	1448,2	2,04	1,82
37	17/08/2012	Zarcero	Tomate	1229,4	2,08	2,08
38	17/08/2012	Zarcero	Tomate	1770,8	2,08	1,88

Anexo II. Figuras suplementarias

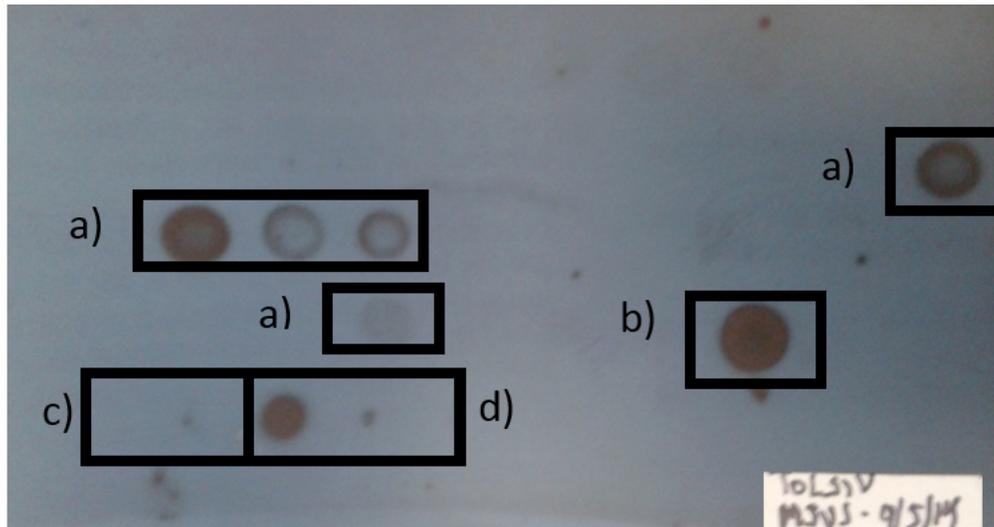


Fig. S1 Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el *Tomato leaf curl Sinaloa virus* (ToLCSiV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) Control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/ μ l, 1 ng/ μ l y 0,1 ng/ μ l respectivamente.

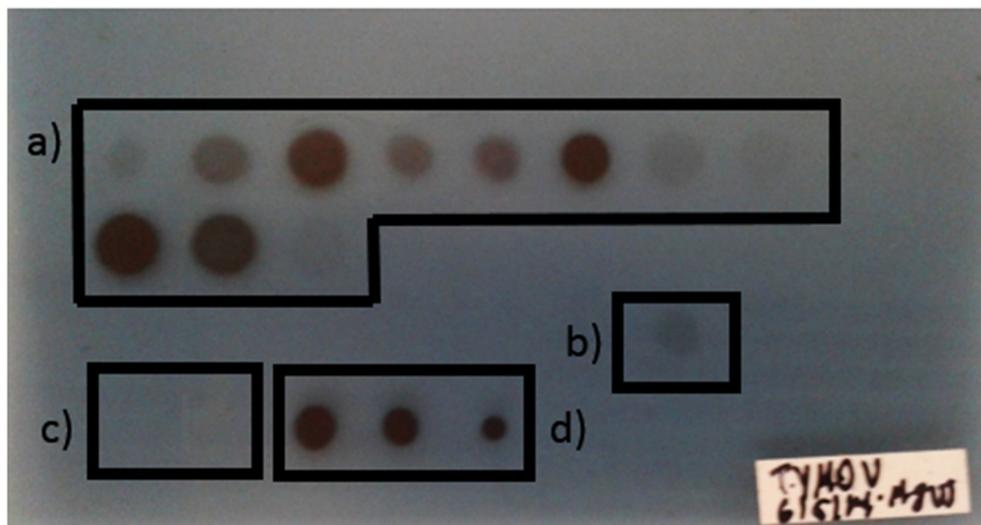


Fig. S2 Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el *Tomato yellow mottle virus* (ToYMV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/ μ l, 1 ng/ μ l y 0,1 ng/ μ l respectivamente.

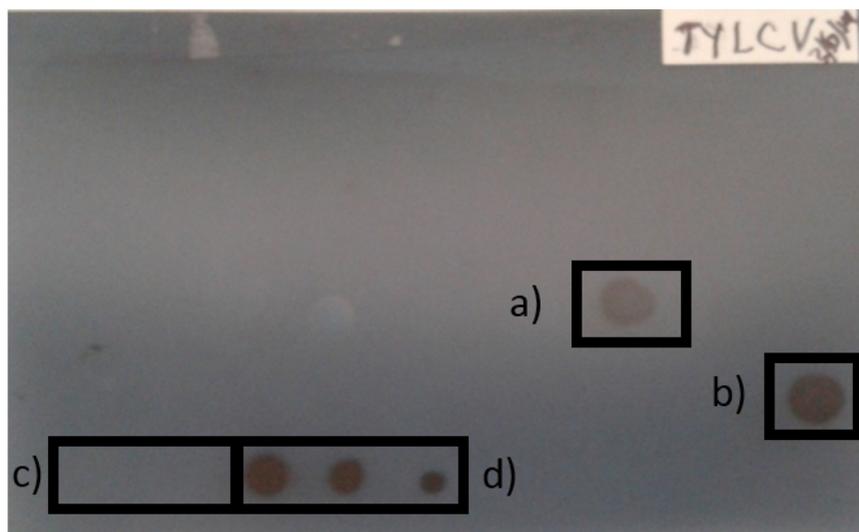


Fig. S3 Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.

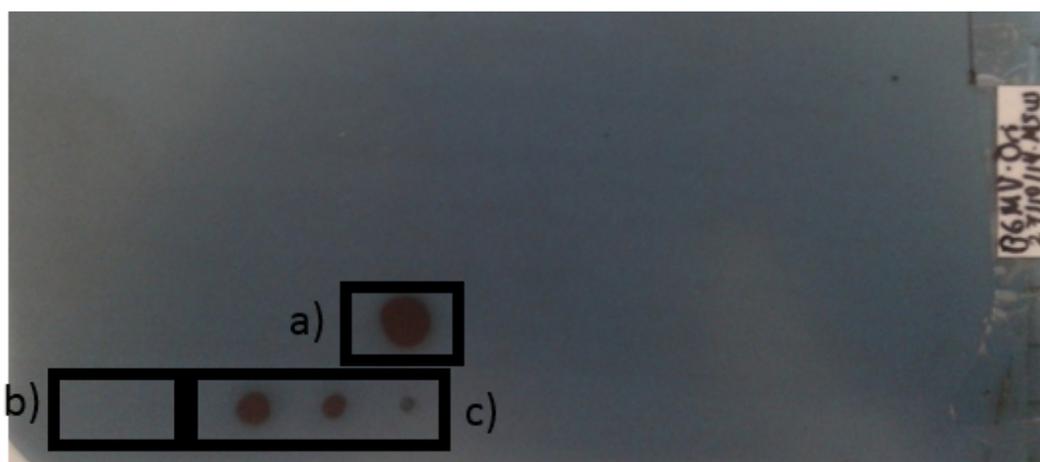


Fig. S4 Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV): a) control positivo, b) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). c) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.

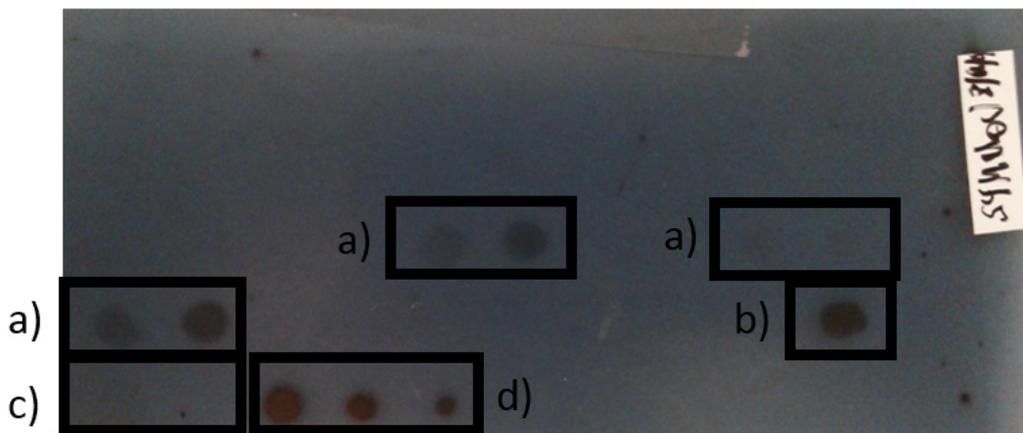


Fig. S5 Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el *Squash yellow mild mottle virus* (SYMMoV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.

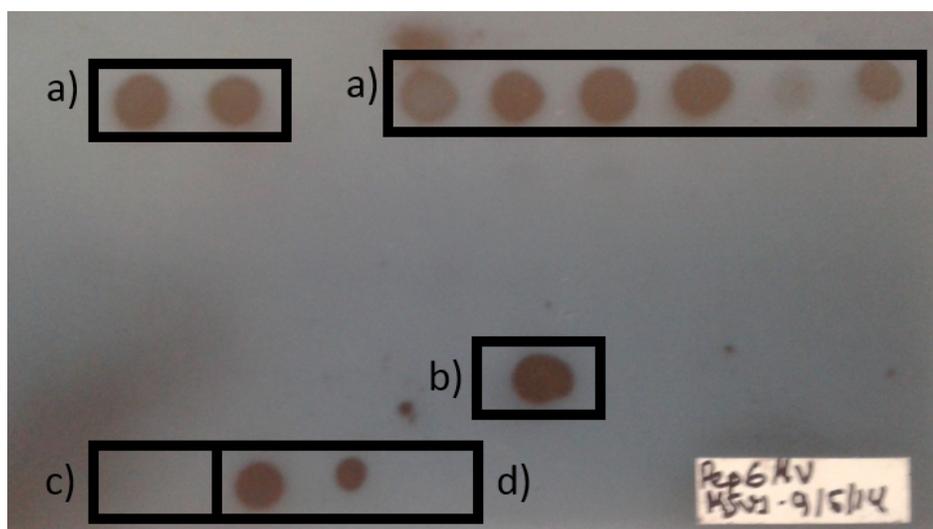


Fig. S6 Hibridación por dot blot utilizando una sonda específica para el *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV): a) muestras positivas, b) control positivo, c) control negativo (extracción de una planta sana) y control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”). d) Controles de sensibilidad: 10 ng/μl, 1 ng/μl y 0,1 ng/μl respectivamente.

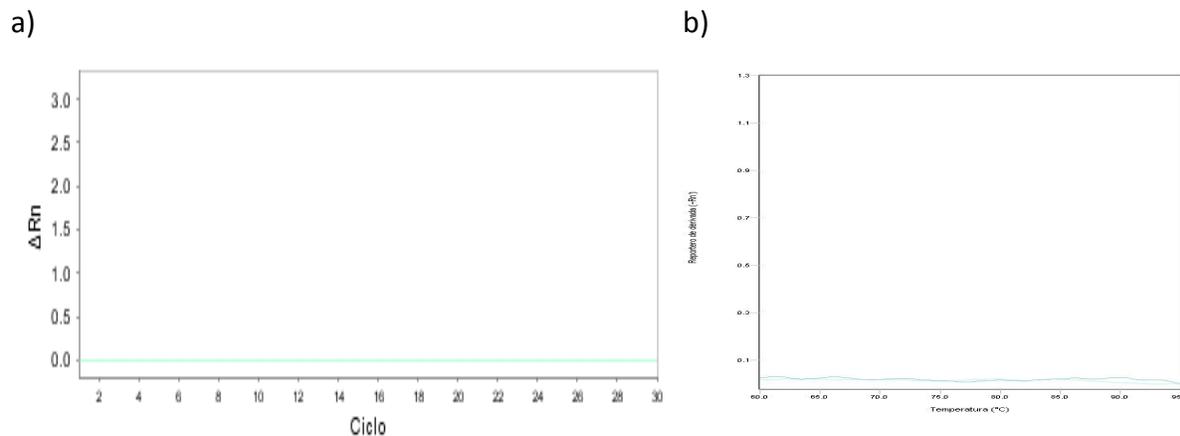


Fig. S7 Curva de amplificación y análisis de fusión del control negativo (ADN de una planta sana) y del control sin molde (por sus siglas en inglés “NTC”) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

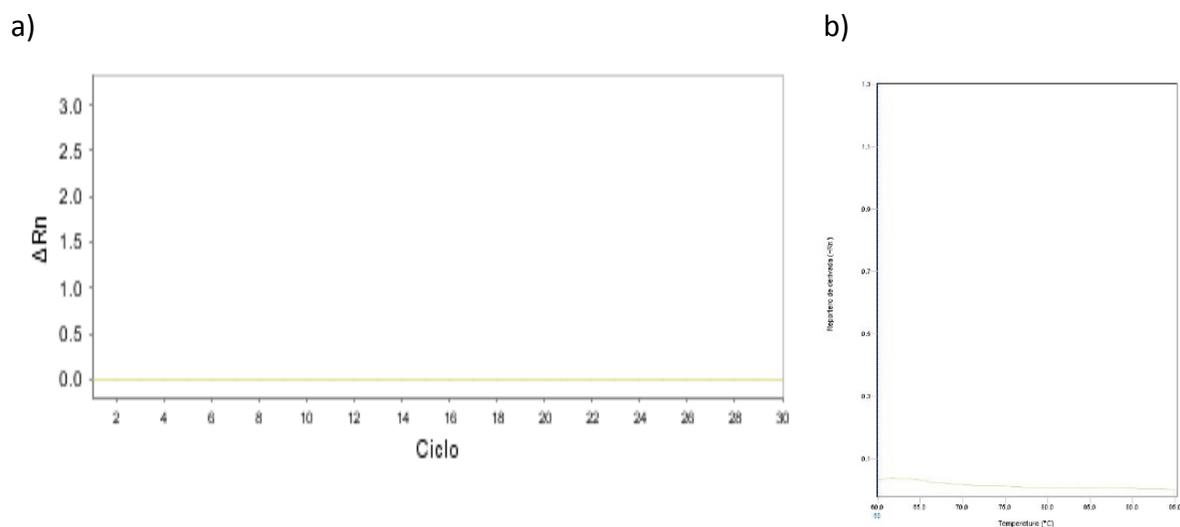
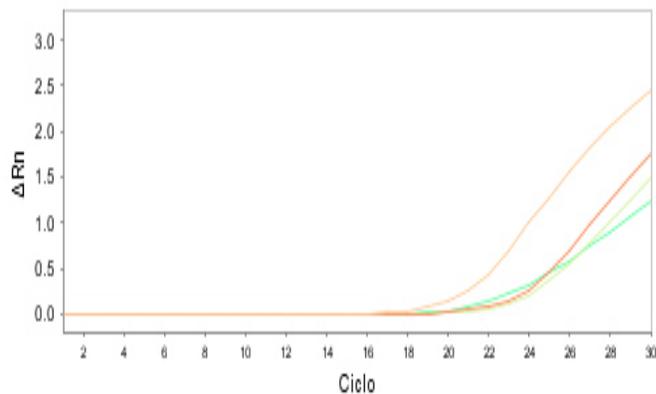


Fig. S8 Curva de amplificación y análisis de fusión de la muestra No. 2, muestra negativa utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

a)



b)

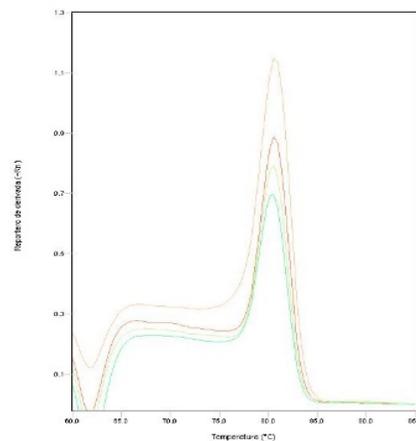


Fig. S9. Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para *Tomato leaf curl Sinaloa virus* (ToLCSiV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

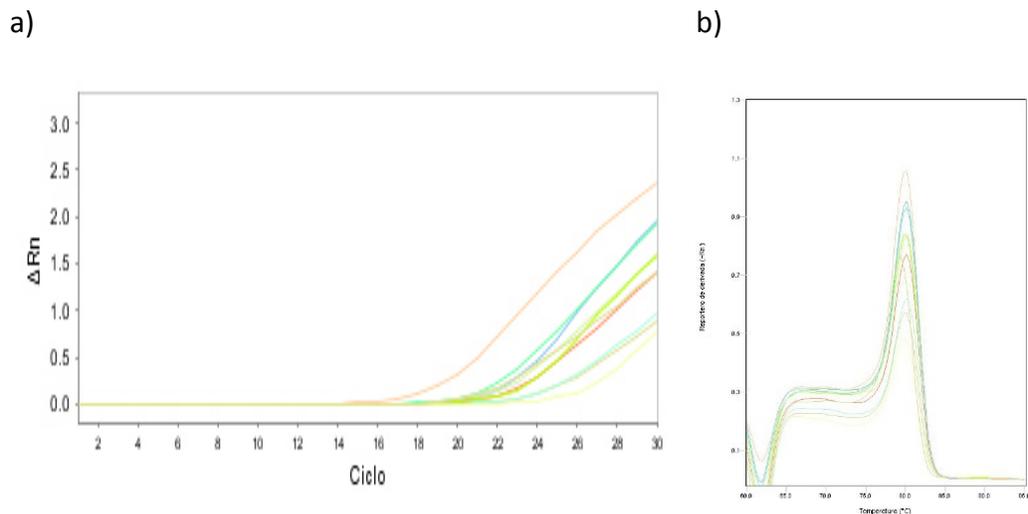


Fig. S10 Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para *Tomato yellow mottle virus* (ToYMV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

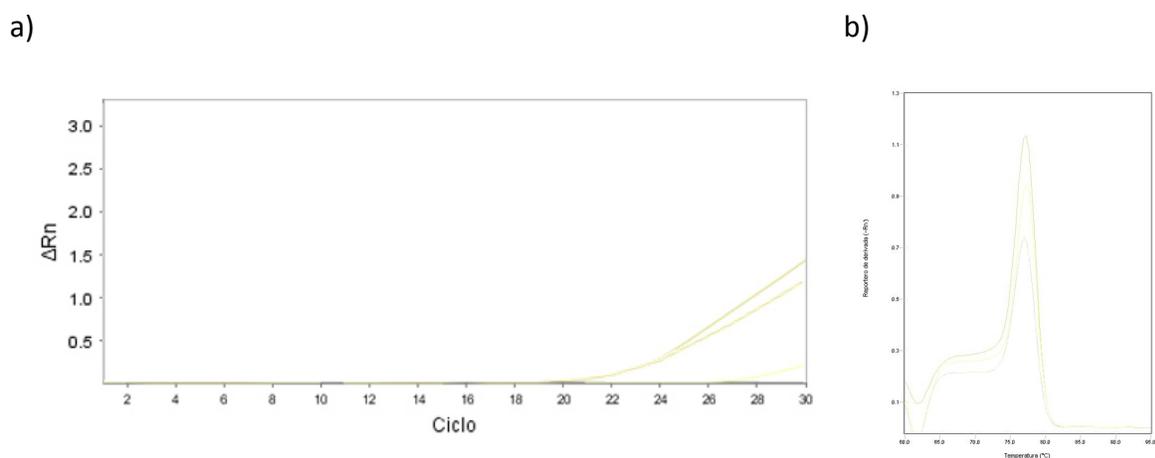


Fig. S11 Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión de fusión.

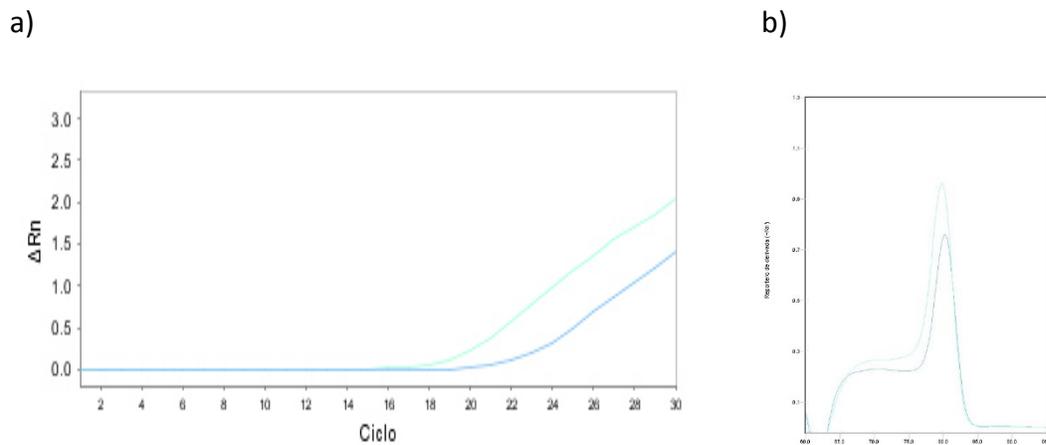


Fig. S12 Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas coinfectadas con *Tomato leaf curl Sinaloa virus* (ToLCSiV) y *Tomato yellow mottle virus* (ToYMV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

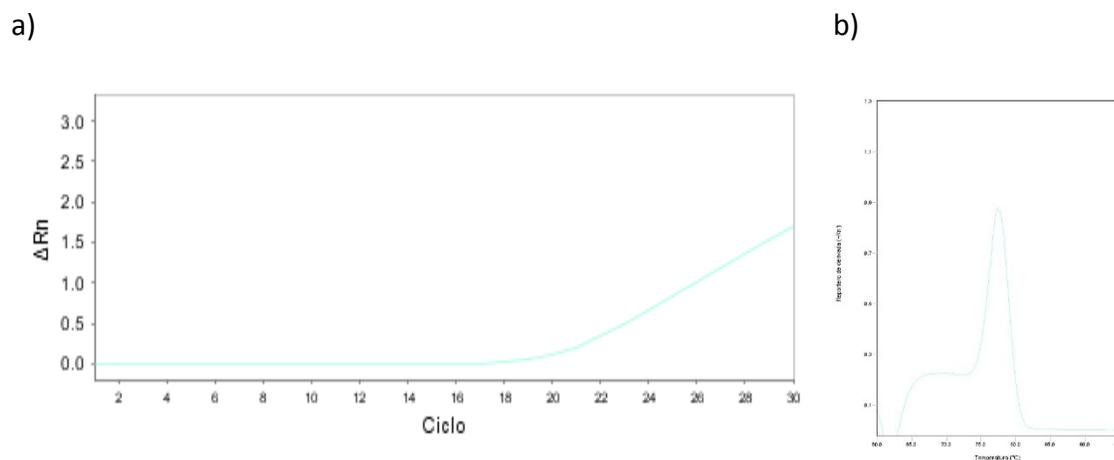


Fig. S13 Curva de amplificación y análisis de fusión de la única muestra positiva para *Bean golden yellow mosaic virus* (BGYMV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

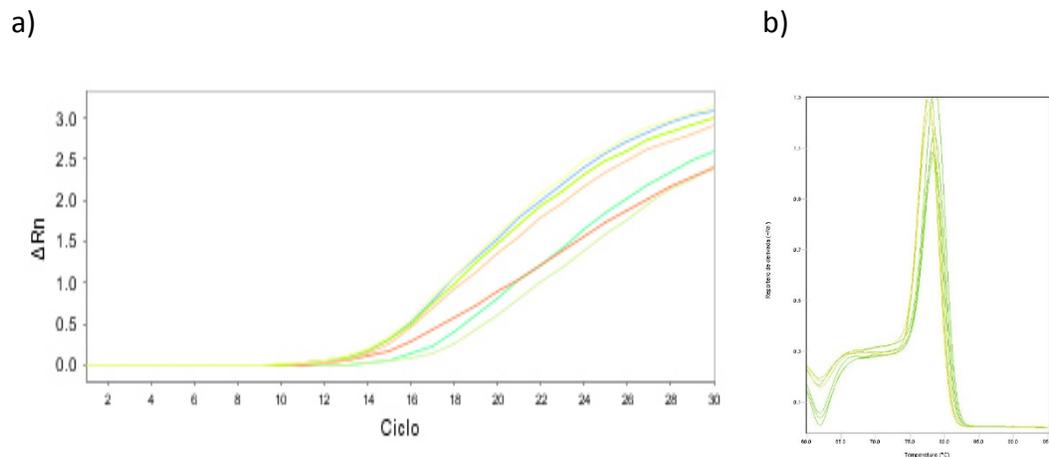


Fig. S14 Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para *Squash yellow mild mottle virus* (SYMMoV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

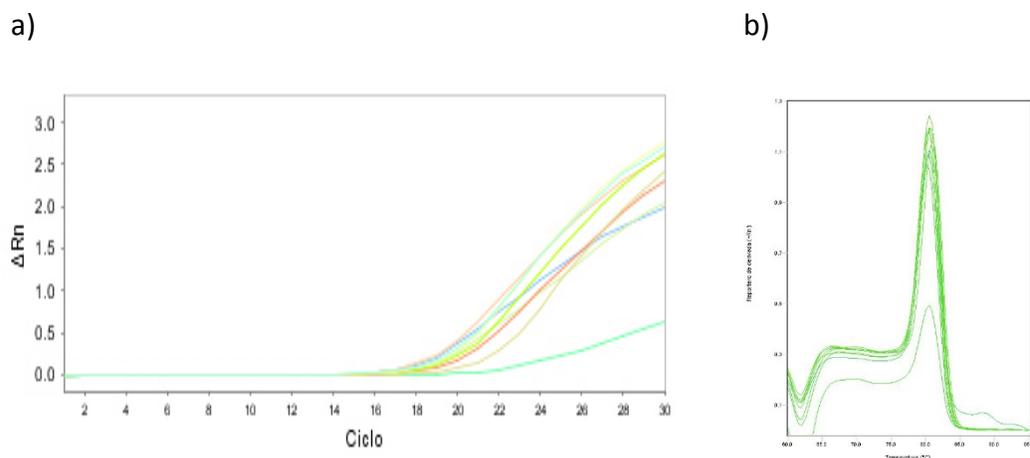
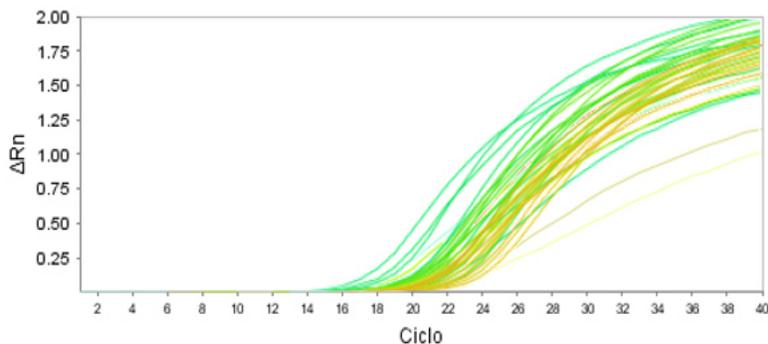


Fig. S15 Curva de amplificación y análisis de fusión de las muestras positivas para *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

a)



b)

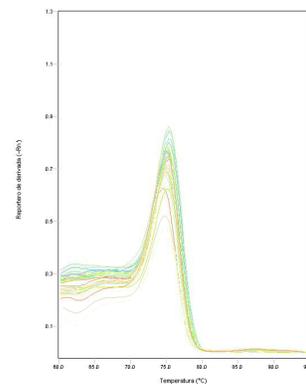
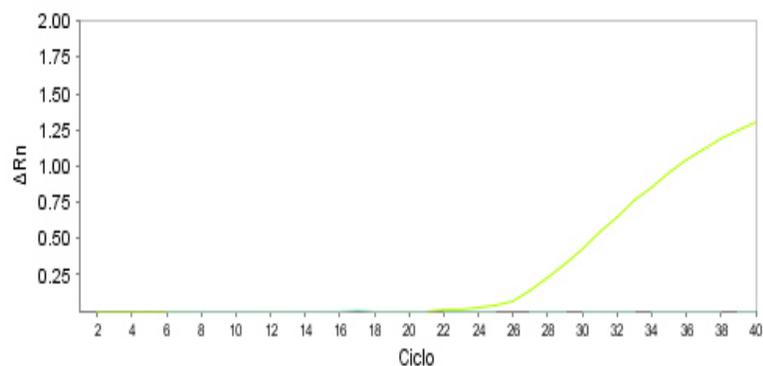


Fig. S16 Curva de amplificación y análisis de fusión de todas las muestras positivas utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen *Cox1*): a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

a)



b)

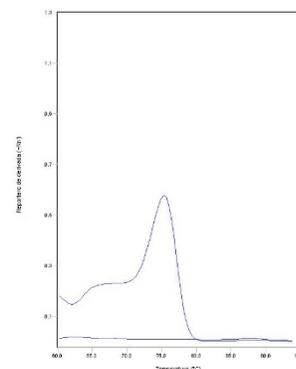


Fig. S17 Curva de amplificación y análisis de fusión del control negativo y la muestra negativa para begomovirus utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen *Cox1*). a) Curva de amplificación según ciclo. b) Análisis de temperatura de fusión.

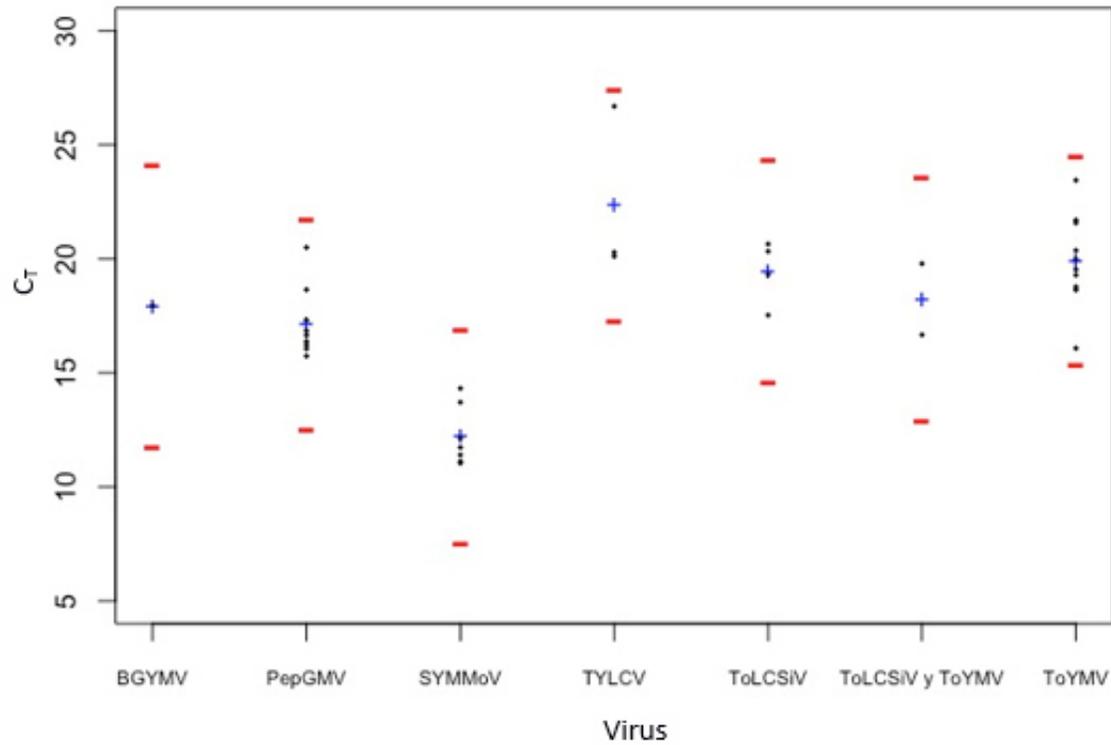


Fig. S18 Ciclo umbral (por sus siglas en inglés “ C_T ”) según virus utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. El punto azul representa el promedio y los puntos rojos representan los intervalos de confianza. BGYMV = $17,95 \pm 6,18$; PepGMV = $17,15 \pm 4,61$; SYMMoV = $12,21 \pm 4,67$; TYLCV = $22,36 \pm 5,05$; ToLCSiV = $19,46 \pm 4,89$; ToLCSiV y ToYMV = $18,23 \pm 5,35$; ToYMV = $19,94 \pm 4,58$.

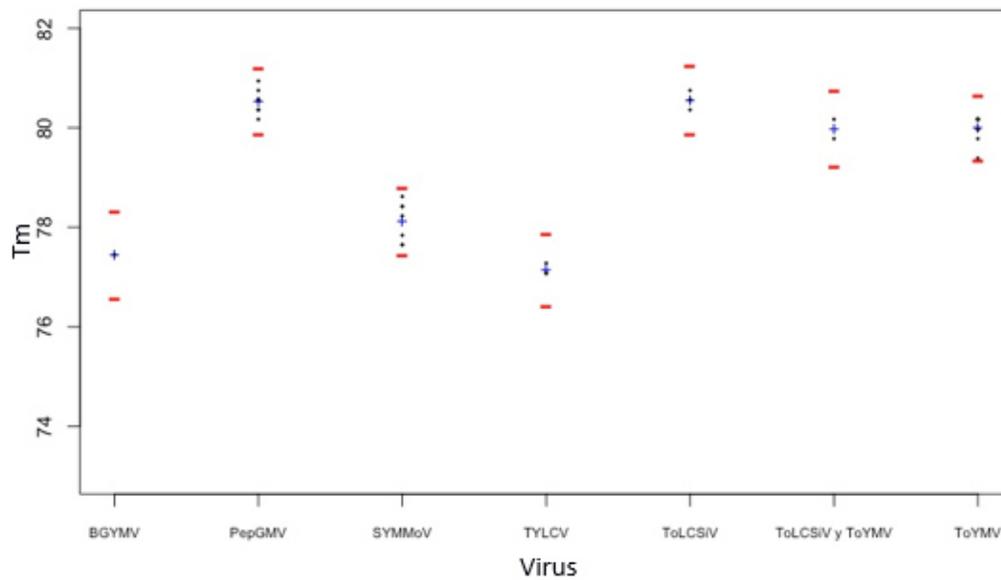


Fig. S19 Temperatura de disociación (por sus siglas en inglés “Tm”) según virus utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. El punto azul representa el promedio y los puntos rojos representan los intervalos de confianza. BGYMV = 77,45 ± 0,94; PepGMV = 80,54 ± 0,70; SYMMoV = 78,12 ± 0,71; TYLCV = 77,63 ± 0,77; ToLCSiV = 80,56 ± 0,74; ToLCSiV y ToYMV = 79,48 ± 0,81; ToYMV = 79,99 ± 0,70.

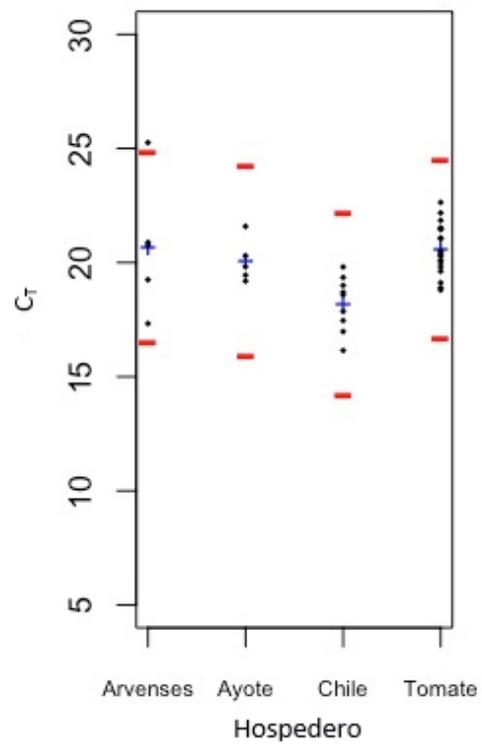


Fig. S20 Ciclo umbral (por sus siglas en inglés “ C_T ”) según hospedero utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen *Cox1*). El punto azul representa el promedio y los puntos rojos representan los intervalos de confianza. Arvenses = $20,69 \pm 4,17$; Ayote = $20,07 \pm 4,17$; Chile dulce = $18,21 \pm 4,01$; Tomate = $20,59 \pm 3,91$.

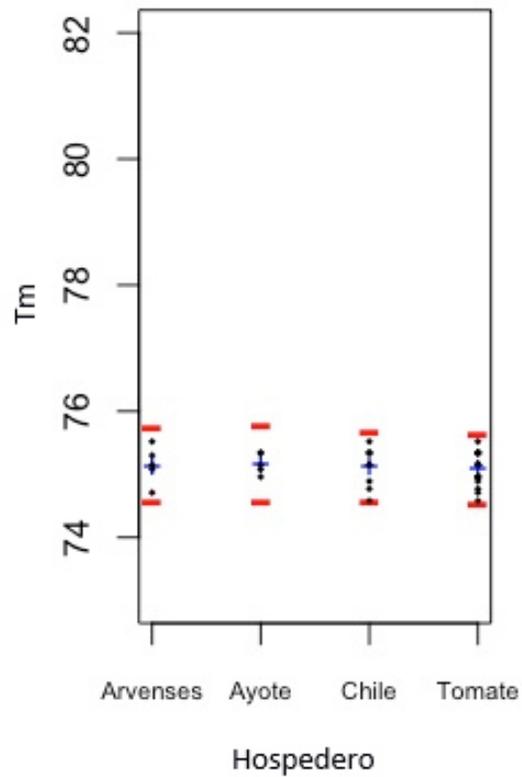


Fig. S21 Temperatura de disociación (por sus siglas en inglés “Tm”) según hospedero utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para el gen Citocromo oxigenasa 1 (Gen *Cox1*). El punto azul representa el promedio y los puntos rojos representan los intervalos de confianza. Arvense = $75,15 \pm 0,59$; Ayote = $75,17 \pm 0,59$; Chile dulce = $75,12 \pm 0,57$; Tomate = $75,09 \pm 0,55$.

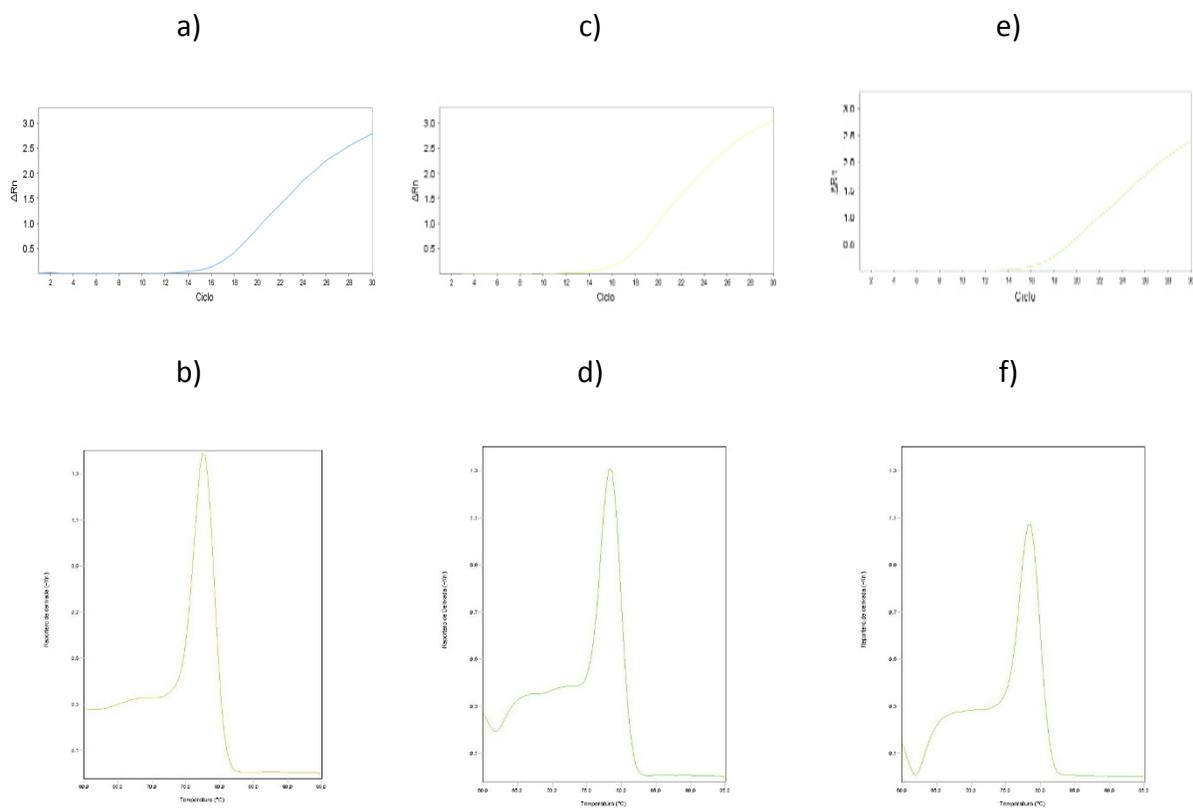


Fig. S22 Curvas de amplificación y análisis de fusión de la muestra No. 15 en tres diferentes momentos utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a-b) Ensayo 1. c-d) Ensayo 2. e-f) Ensayo 3.

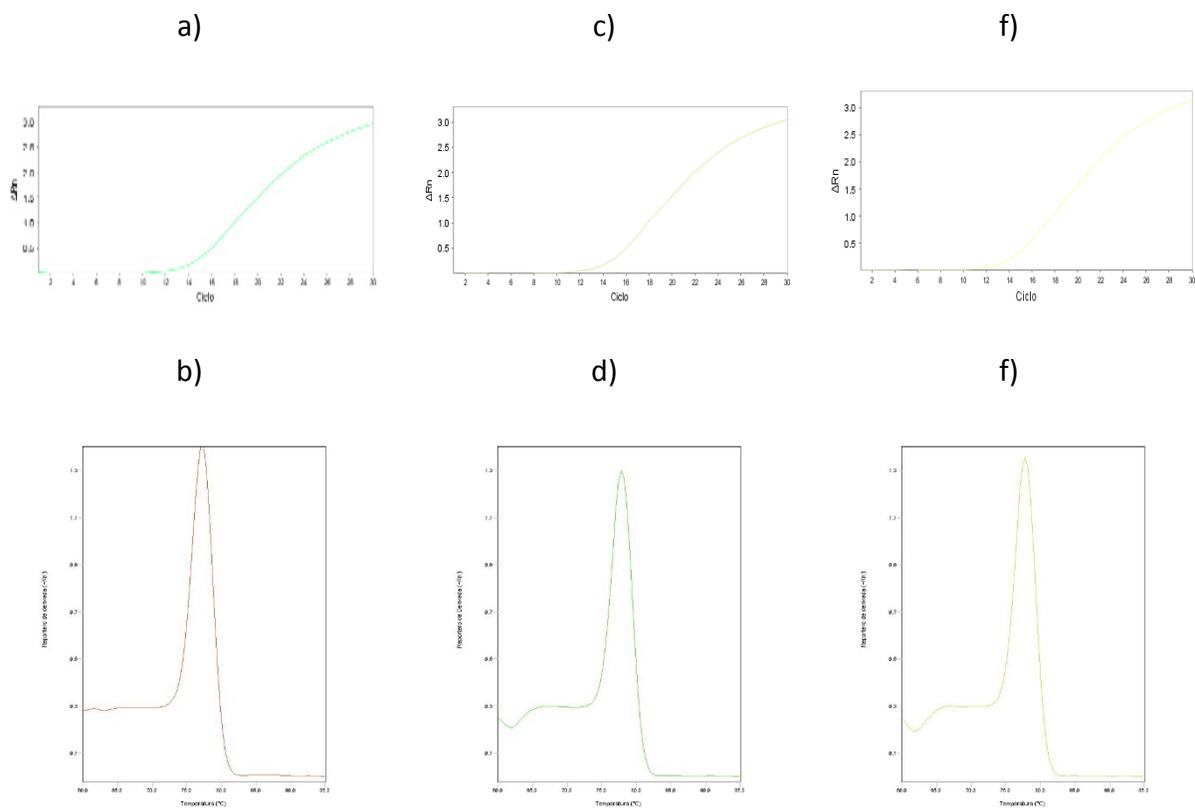


Fig. S23 Curvas de amplificación y análisis de fusión de la muestra No. 19 en tres diferentes momentos utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a-b) Ensayo 1. c-d) Ensayo 2. e-f) Ensayo 3.

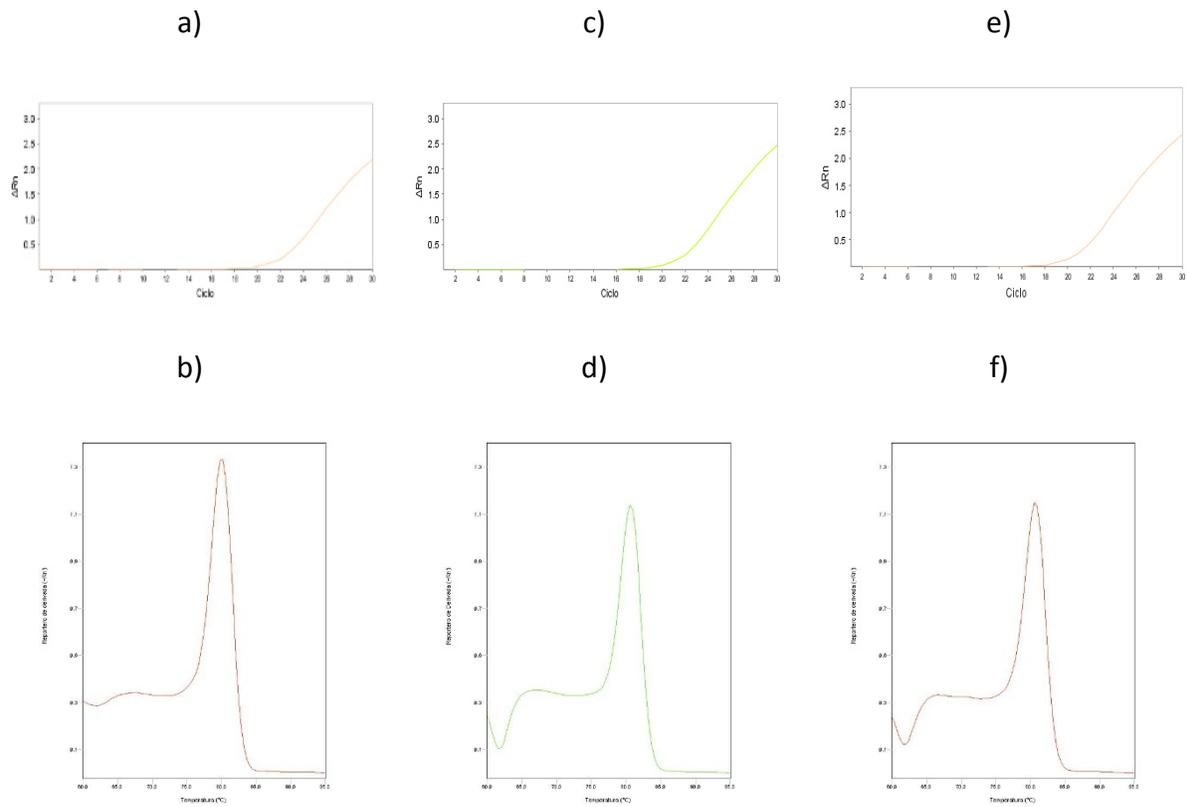


Fig. S24 Curvas de amplificación y análisis de fusión de la muestra No. 23 en tres diferentes momentos utilizando PCR Tiempo Real (qPCR) e imprimadores degenerados para begomovirus. a-b) Ensayo 1. c-d) Ensayo 2. e-f) Ensayo 3.