

Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

**Detección de geminivirus y crinivirus en almácigos de tomate
(*Lycopersicon esculentum* Mill.) y chile dulce (*Capsicum annuum* L.),
durante el periodo crítico del desarrollo**

Tesis sometida a consideración de la Comisión de Trabajos Finales de
Graduación de la Escuela de Biología para optar por el título de Licenciado en
Biología con énfasis en Genética y Biotecnología

Ántony Solórzano Morales

Ciudad Universitaria “Rodrigo Facio”

San José, Costa Rica

2011

Esta tesis fue aprobada por la Comisión de Trabajos Finales de Graduación de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología.

Tribunal examinador:

Dra. Pilar Ramírez Fonseca _____
Directora de la tesis

Dra. Floribeth Mora Umaña _____
Integrante del Comité Asesor

M.Sc. Natalia Barboza Vargas _____
Integrante del Comité Asesor

Lic. Eduardo Hernández Jiménez _____
Integrante del Comité Asesor

Dr. James Karkashian Córdoba _____
Miembro del Tribunal

Dra. Virginia Solís Alvarado _____
Presidenta del Tribunal

Bach. Antony Solórzano Morales _____
Postulante

DEDICATORIA

A Dios padre todo poderoso, por darme la oportunidad de lograr esta meta y abrirme las puertas hacia un mejor futuro, el cual se lo encomiendo a Él y a la Virgen María; para que siempre me brinden salud, pues de mi parte pondré fé y lucha continua para alcanzar nuevas metas.

A mis padres: Álvaro Solórzano Araya y Grace Morales Castro, quienes son mi gran apoyo incondicional.

PREFACIO DEL AUTOR

Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica: la voluntad.

Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.

Albert Einstein (1879-1955)

RECONOCIMIENTOS

Agradezco a todas las personas e instituciones que me apoyaron durante la realización de este trabajo: Inicialmente a mi comité de tesis, mi tutora Dra. Pilar Ramírez, y los lectores M.Sc. Natalia Barboza, Lic. Eduardo Hernández y en especial a la Dra. Floribeth Mora (gracias tita!). A ellos les agradezco afectuosamente la formación a nivel teórico y práctico. Asimismo a mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Virus, en especial a la MSc. Ruth Castro por iniciarme en el entrenamiento en laboratorio y por ser la autora principal de la idea de esta investigación, muchas bendiciones en tu vida y con tu familia.

A los investigadores Ph.D. Rosemarie Hammond (USDA - ARS, Beltsville, MD 20705), Ph.D. María R. Rojas, Ph.D. Robert L. Gilbertson (Plant Molecular Pathology, University of Davis, California) por el uso de sus laboratorios y su valioso aporte crítico-intelectual.

Al Dr. Federico Albertazzi, M.Sc. Lisela Moreira y la Dra. Heidy Villalobos por colaborar en el desarrollo de las metodologías y en el manejo de equipo del CIBCM. Al Dr. Carlos Morales O., Escuela Biología, UCR, por la identificación taxonómica de las malezas.

A los demás miembros del tribunal examinador Dr. James karkashian y la Dra. Virginia Solís por sus correcciones en la redacción del documento final de la tesis.

A la MSc. Ana Maria Conejo por realizar el mapa de localización de los invernaderos de almácigos, y por muchos aspectos te amo mucho!. A mis primos Marcela y Gabriel por el préstamo del Internet para las búsquedas y estudio bibliográfico.

Por supuesto a los agricultores de los invernaderos, por ser parte de este proyecto.

Esta investigación se logró gracias al financiamiento de los proyectos: “Acción participativa de agricultores, técnicos e investigadores de la Universidad de Costa Rica para mejorar la competitividad de los agricultores de chile dulce y tomate en Cartago” de la Vicerrectoría de Acción Social, Universidad de Costa Rica y el proyecto EIMHAP: “Estrategia Interuniversitaria de Manejo de Hortalizas en Ambientes Protegidos” del Consejo Nacional de Rectores (CONARE).

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Número de Página
Hoja de aprobación.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Prefacio del autor.....	iv
Reconocimientos.....	v
Índice general.....	vi
Índice de ilustraciones.....	viii
Índice de cuadros.....	ix
Lista de abreviaturas.....	x
Resumen.....	xii
I. Estado Actual del Conocimiento.....	1
A. Infección causada por virus en plantas.....	1
B. Virus que afectan al tomate y chile dulce.....	1
B.1 Geminivirus.....	1
B.2 Crinivirus.....	3
C. Crecimiento de los cultivos de tomate y chile dulce.....	6
D. Importancia de los cultivos en estudio.....	7
E. Efecto de la infección viral dentro del periodo crítico de desarrollo de los cultivos de tomate y chile dulce.....	8
II. Justificación de la Investigación.....	9
III. Objetivo General.....	11
IV. Objetivos Específicos.....	11
V. Materiales y Métodos.....	12
A. Estrategia Metodológica.....	12
B. Muestras vegetales.....	13
C. Liofilización del tejido vegetal.....	14
D. Detección de <i>Begomovirus</i>	14
D.1. Extracción de ácidos nucleicos totales (ANt).....	14

D.2. Cuantificación de los ANt.....	14
D.3. Hibridación Molecular.....	15
D.4. Amplificación por RCA del ADN viral.....	16
D.5. Confirmación por PCR del ADN viral.....	16
D.6. Secuenciación parcial.....	19
E. Detección de Crinivirus.....	20
E.1. Extracción de ARN total.....	20
E.2. Cuantificación de los ARN totales.....	20
E.3. Amplificación por qRT-PCR de ARN del crinivirus ToCV	20
VI. Resultados.....	21
A. Detección de <i>Begomovirus</i>	21
A.1. Extracción, cuantificación y análisis electroforético de los ANt.....	21
A.2. Hibridación molecular, RCA y PCR en tomate y chile dulce.....	21
A.3. Hibridación molecular, RCA y PCR en malezas.....	22
A.4. Análisis de las secuencias parciales de <i>Begomovirus</i> en malezas.....	23
B. Detección del crinivirus ToCV.....	24
B.1. Extracción, cuantificación y análisis electroforético de los ARN totales..	24
B.2. Amplificación por qRT-PCR de ARN del ToCV en tomate.....	24
B.3. Amplificación por qRT-PCR de ARN del ToCV en malezas.....	25
VII. Discusión.....	26
A. Detección de <i>Begomovirus</i>	26
B. Detección del crinivirus ToCV.....	29
VIII. Conclusiones y recomendaciones.....	32
IX. Literatura citada.....	33

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura	Descripción	Página
Figura 1.	Esquema de la organización del genoma bipartita de <i>Begomovirus</i> . Se indica la región común (CR). Las flechas indican la localización de los genes, su nomenclatura y dirección de transcripción: sentido manecillas del reloj = viral y sentido inverso manecillas del reloj = complementario (Tomado de Gutiérrez <i>et al.</i> 2004).	3
Figura 2.	Esquema de la organización del genoma ARN1 de un aislado español AT80/99 del crinivirus ToCV (Tomado de Lozano <i>et al.</i> 2007).	4
Figura 3.	Esquema de la organización del genoma ARN2 de un aislado español AT80/99 del crinivirus ToCV (Tomado de Lozano <i>et al.</i> 2006).	4
Figura 4.	Mapa de Cartago, Costa Rica. Se resaltan en negro la localización de los tres invernaderos de almacigos de tomate y chile dulce.	12
Figura 5.	Esquemas de genomas geminivirales donde se ubican los iniciadores utilizados y las tallas aproximadas de los productos de PCR obtenidos. A. Componente A en el cual se muestran los sitios en los que se unen los iniciadores PBGGTv647/PBGGTc1048 y las tallas aproximadas de los productos de PCR usados como sonda general. B. ADN-A en el que se denotan los sitios de unión de los iniciadores PAV494/ PAC1048. C. Representación esquemática de la amplificación de aproximadamente 1.4kb con los iniciadores PAR1c715/PAL1v1978. D. Componente B donde se muestran los sitios de unión de los iniciadores PBL1v2039/PCRC2 que amplifican diferentes tallas (0.3-0.6kb).	18

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
Cuadro 1.	Distribución espacial del ToCV a nivel mundial.	5
Cuadro 2.	Familias y especies que actúan como hospedantes de ToCV.	6
Cuadro 3.	Secuencias de nucleótidos de los iniciadores utilizados para detección de geminivirus. D=A,G,T; H=T,A,C; K=G,T; M=A,C; N=A,C,G,T; R=A,G; Y=C,T; W=A,T. La nomenclatura de los iniciadores generales es codificada de la siguiente forma P (Iniciadores); BL y CR (encuadres abiertos de lectura); c (sentido complementario); v (sentido viral); el número (nucleótido al que se une el iniciador) y la secuencia subrayada es la que reconoce la enzima de restricción PstI. La nomenclatura de los iniciadores específicos: P (Iniciador), BGGT (Virus del mosaico dorado amarillo del frijol aislado de Guatemala), v (sentido viral), c (sentido complementario) y el número (nucleótido al que se une el iniciador).	17
Cuadro 4.	Descripción de las concentraciones y cantidades de reactivos utilizados en una reacción de PCR.	17
Cuadro 5.	Detección de <i>Begomovirus</i> en invernaderos de almácigos de Cartago durante el 2008-2009. Número total de muestras analizadas e infectadas por almácigo y por especie.	22
Cuadro 6.	Especies de malezas infectadas por begomovirus y porcentajes de identidad nucleotídica de la parte superior-A (Top-A) y núcleo gen cp (cp) en el componente A y de la región hipervariable (RHV) en el componente B.	23
Cuadro 7.	Detección del crinivirus ToCV en invernaderos de almácigos de Cartago durante el 2008-2009. Número total de muestras analizadas e infectadas por almácigo y por especie.	25
Cuadro 8.	Especies de malezas infectadas por el crinivirus ToCV.	25

LISTA DE ABREVIATURAS

Índice en orden alfabético:

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANt	Ácidos nucleicos totales
ARN	Ácido ribonucleico
CATIE	Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza
CIBCM	Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular
CP	Proteína de cubierta
CPm	Proteína de cubierta menor
DDS	Días después de la siembra
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPPO	Organización Europea y Mediterránea para la Protección de Plantas
GPS	Sistema de Posicionamiento Geográfico
HEL	Helicasa viral
HSP70h	Proteína homóloga de choque térmico
ICTV	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
M	Molar
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MIP	Manejo Integrado de Plagas
MPB	Proteína de movimiento entre células
MT	Metiltransferasa viral
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NSP	Proteína de movimiento hacia fuera del núcleo
ORF	Encuadre abierto de lectura
P	Proteasa viral
P ³²	Isótopo radiactivo fósforo 32
pb	Pares de bases

PCI	Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico, 25:24:1
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
qRT-PCR	Retrotranscripción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real
RC	Región común
RCA	Amplificación por el círculo rodante
RdRp	Replicasa viral
REn	Proteína que incrementa la eficiencia de la replicación
Rep	Proteína relacionada con la replicación
RHV	Región hipervariable geminivirus
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Duodecilsulfato de sodio
TAE	Tris Base-Ácido acético glacial-EDTA
TrAP	Proteína vinculada a la activación de la replicación
Tris-HCl	Tris-Ácido clorhídrico

RESUMEN

Solórzano Morales, Antony

Detección de geminivirus y crinivirus en almácigos de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y chile dulce (*Capsicum annuum* L.), durante el periodo crítico del desarrollo

Tesis de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología.
Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San José.

Se realizó la detección de begomovirus y crinivirus en tres viveros dedicados al desarrollo y venta de almácigo de tomate y chile dulce, así como en malezas asociadas, en la provincia de Cartago. Se recolectaron 30 muestras por cada ambiente protegido, 15 de ellas fueron tratadas con insecticida, mientras que a la otra mitad no se le aplicó ningún tratamiento. El ensayo se repitió de manera sistemática en los tres invernaderos y para ambos cultivos. El muestreo de malezas se efectuó en dos épocas (lluviosa y seca), se recolectaron alrededor de 10 muestras por cada invernadero y época. El material vegetal fue analizado para begomovirus mediante hibridación molecular (dot blot), los resultados fueron confirmados utilizando la amplificación por el círculo rodante (RCA) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los productos de PCR fueron analizados por secuenciación parcial. Se realizó la identificación del crinivirus *Tomato chlorosis virus* (ToCV) mediante la técnica del qRT-PCR. Se identificaron seis muestras positivas para begomovirus en malezas, éstas se identificaron taxonómicamente como *Brassica* sp. (Brassicaceae), *Phaseolus* sp. (Fabaceae) (3 muestras), *Solanum quitoense* (Solanaceae), y *Phytolacca icosandra* (Phytolacaceae), la última posee una infección mixta. Se diagnosticaron 17 muestras de tomate infectadas con el ToCV y cinco de malezas, identificadas como *Ruta chalepensis* (Rutaceae), *Phytolacca icosandra* (Phytolacaceae), *Plantago major* (Plantaginaceae), *Brassica* sp. (Brassicaceae) (dos muestras), y en una única planta de *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae) que se encontraba creciendo cerca de estas malezas. Dos estaban coinfectadas con begomovirus. Los resultados corroboran que el ToCV es un virus emergente y que podría incrementar su incidencia para Costa Rica. Los datos obtenidos permiten afirmar que las malezas asociadas a los cultivos, podrían ser hospederos alternos de sus vectores e importantes fuentes de inóculo de begomovirus y crinivirus.

Palabras clave: begomovirus, crinivirus, almácigos tomate, almácigos chile dulce, malezas.

I. ESTADO ACTUAL DEL CONOCIMIENTO

Infección causada por virus en plantas

Los virus de plantas son agentes infecciosos que realizan su propia replicación únicamente dentro de una célula hospedante, secuestrando la maquinaria celular (Hull 2002, Nelson y Citovsky 2005, Wintermantel *et al.* 2005, Chen *et al.* 2010). Existe una gran cantidad de estos fitopatógenos que causan numerosos daños en cultivos, de los cuales el 90% poseen genomas de ácido ribonucleico - ARN, mientras que el 10% restante tienen genomas de ácido desoxirribonucleico - ADN (Perea-Araujo 2006). Los ácidos nucleicos normalmente están encapsidados en una capa proteica o de lipoproteínas y no forman una estructura celular (Agrios 2005).

En cualquier sistema de producción, las enfermedades ocasionadas por los agentes virales son las de mayor impacto económico, pues disminuyen la calidad y los rendimientos en los cultivos y son difíciles de controlar (Perea-Araujo 2006). La incidencia y severidad de este tipo de patología varía según las interrelaciones del complejo constituido por el hospedero, patógeno, vector, ambiente y tiempo (Agrios 2005).

Virus que afectan al tomate y chile dulce

Geminivirus

Son virus de plantas de la familia *Geminiviridae*. La organización del genoma y las propiedades biológicas (ámbito de hospederos e insecto vector), permiten dividirlos en cuatro géneros: *Mastrevirus*, *Topocuvirus*, *Curtovirus* y *Begomovirus* (Hull 2002, Fauquet *et al.* 2008). Este último, incluye la mayor parte de geminivirus descritos (Briddon *et al.* 2008), de los cuales el *Bean golden mosaic virus* (BGMV) es la especie tipo. Son transmitidos de manera circulativa y persistente por *Bemisia tabaci* Gennadius (Polston y Anderson 1997), únicamente a plantas dicotiledóneas (Nawaz-ul-Rehman y Fauquet 2009).

Es uno de los grupos más importantes de patógenos que ocasionan pérdidas significativas en cultivos en agro-ecosistemas tropicales y subtropicales a nivel mundial (Rojas y Gilbertson 2008, Faria y Nava 2009, Lett *et al.* 2009). Actualmente, América Latina es la región más afectada en términos del número total de begomovirus transmitidos, cultivos afectados, pérdidas en rendimiento y el área agrícola devastada (Cuellar y Morales 2006). Millones de hectáreas de tierra apta para la agricultura en 20 países sufren el ataque de más de 30 begomovirus (Morales y Anderson 2001).

Poseen el genoma bipartito (dos moléculas de ADN monocatenario y circular: ADN-A y ADN-B) (Fig. 1), con algunas excepciones (por ejemplo, *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) y *Tomato leaf curl virus* (ToLCV)) para los cuales el ADN-B no ha sido encontrado (Davino *et al.* 2009). Estas dos moléculas tienen unos 2.800 nucleótidos, dentro de partículas virales geminadas, compuestas por dos icosaedros (Moriones y Navas-Castillo 2008) y se multiplican en el núcleo de las células vegetales por el mecanismo de “círculo rodante” (Stenger *et al.* 1990). Poseen una organización común con cuatro genes en el ADN-A llamados *rep* o *AC1* (codifica una proteína relacionada con la replicación), *trap* o *AC2* (vinculado con la activación de la transcripción), *ren* o *AC3* (incrementa la eficiencia de replicación), *AC4* (función desconocida) y *cp* o *AV1* (proteína de cubierta). Dos genes en el ADN-B llamados *mp* o *BC1* (relacionado con el movimiento del virus célula a célula) y *nsp* o *BV1* (movimiento fuera del núcleo) (Lazarowitz 1992, Gutiérrez *et al.* 2004) (Fig. 1).

Las secuencias de ambos componentes (A y B) son diferentes, excepto por una banda intergénica conservada de aproximadamente 200 pares de bases llamada región común (RC). Es relativamente idéntica (similitud mayor al 90%) en ambos componentes de ADN aislados de la misma especie (Lazarowitz 1992), sin embargo, es completamente desigual en razas diferentes, excepto por unos nucleótidos conservados (5'-TAATATT*AC-3') donde se localiza el sitio de corte (*) para el inicio de la replicación del ADN viral (Hanley-Bowdoin *et al.* 2000) y la caja TATA (Lazarowitz 1992) (Fig. 1).

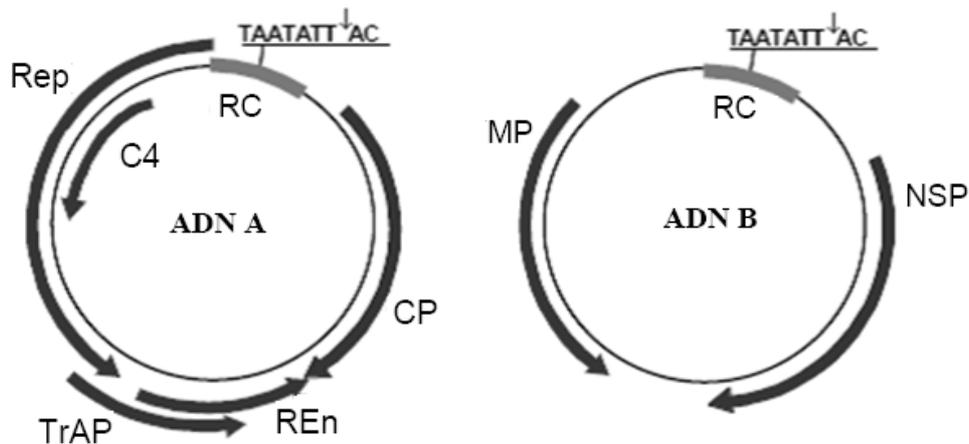


Figura 1. Esquema de la organización del genoma bipartita de *Begomovirus*. Se indica la región común (RC). Las flechas indican la localización de los genes, su nomenclatura y dirección de transcripción: sentido manecillas del reloj = viral y sentido inverso manecillas del reloj = complementario (Tomado de Gutiérrez *et al.* 2004).

En Centroamérica, el Caribe, México y Estados Unidos, numerosos begomovirus han emergido durante los últimos 30 años, ocasionando pérdidas económicas en cultivos de importancia, como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), tomate (*L. esculentum*), chile dulce (*C. annuum*), calabaza (*Cucurbita pepo*) y okra (*Abelmoschus esculentus*) (Ala-Poikela *et al.* 2005, De La Torre-Almaráz *et al.* 2006, Martínez *et al.* 2009, Nawaz-ul-Rehman y Fauquet 2009). En Costa Rica se ha informado de la presencia del *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV), *Sida golden mosaic Costa Rica virus* (SiGMV) y *Sinaloa tomato leaf curl virus* (STLCV) infectando al tomate, y el *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) afectando al chile dulce (Rojas *et al.* 2005, Moriones y Navas-Castillo 2008).

Crinivirus

El *Tomato chlorosis virus* (ToCV) (*Closteroviridae*) (Hull 2002), posee partículas flexuosas con 800-850 nm de longitud (Liu *et al.* 2000), genoma bipartito (8,595 + 8,247 kb) de ARN monocatenario con sentido positivo (Wintermantel *et al.* 2005) y es transmitido de manera semipersistente por *B. tabaci* (Gennadius), *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y *T. abutilonea* (Haldeman) (Wisler *et al.* 1999).

En el ARN1 y el ARN2 se localizan bloques o encuadres abiertos de lectura (ORFs) de genes altamente conservados, con diferentes estrategias de expresión (Martelli *et al.* 2002). El ToCV, presenta en el ARN1 cuatro ORFs, incluyendo los genes implicados en la replicación, que codifican para una proteasa (P), la helicasa (HEL), la metiltransferasa (MT) y la replicasa viral (RdRp), además de una proteína de función desconocida (p22) (Wintermantel *et al.* 2005; Lozano *et al.* 2007) (Fig. 2). El ARN2 está compuesto de nueve ORFs y contiene principalmente los genes que codifican una proteína homóloga de choque térmico (HSP70h) y dos involucradas en la encapsidación del ARN viral, referidas como la de cápside (CP) y la de cápside menor (CPm) (Wintermantel *et al.* 2005; Lozano *et al.* 2006) (Fig. 3).



Figura 2. Esquema de la organización del genoma ARN1 de un aislado español AT80/99 del crinivirus ToCV (Tomado de Lozano *et al.* 2007).

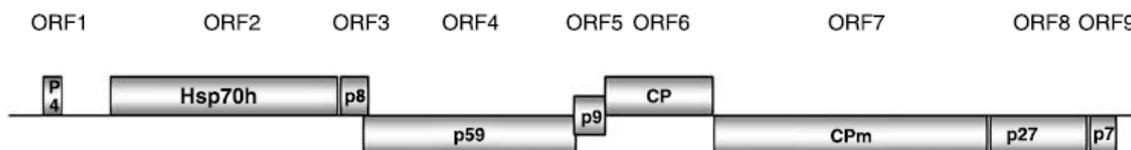


Figura 3. Esquema de la organización del genoma ARN2 de un aislado español AT80/99 del crinivirus ToCV (Tomado de Lozano *et al.* 2006).

El ToCV, muestra una sintomatología en el cultivo de tomate caracterizada por un amarillamiento internervial o clorosis en la zona baja e intermedia de la planta, y en algunos casos con desarrollo de manchas color púrpura, rojizas o necróticas; también se puede observar un enrollamiento de las hojas basales que se tornan quebradizas. (Navas-Castillo *et al.* 2000, Lozano *et al.* 2006, Wintermantel y Wisler 2006). El principal inconveniente que presenta el diagnóstico visual de los crinivirus es precisamente que sus

síntomas pueden ser confundidos con desórdenes fisiológicos o nutricionales (Lozano *et al.* 2006).

Existe poca información sobre pérdidas en cosechas debidas al ToCV, sin embargo se han reportado detrimentos en el rendimiento debido a un crecimiento reducido, maduración tardía y menor cantidad de los frutos (Navas-Castillo *et al.* 2000, García-Cano *et al.* 2010). Hanafi (2002) comunicó que el ToCV ha causado daños significativos en invernaderos de tomate. La severidad de los síntomas y el deterioro varía según el cultivo (OEPP/EPPO 2005). Ha demostrado ser un virus emergente, pues se ha identificado en varios países de África, Asia, Europa, América y el Caribe (Cuadro 1) e infecta 27 especies de plantas (principalmente al tomate) distribuidas en 8 familias (Cuadro 2), incluyendo cultivos, ornamentales y malezas (OEPP/EPPO 2005, Morris *et al.* 2006, Wintermantel y Wisler 2006, Trenado *et al.* 2007).

Cuadro 1. Distribución espacial del ToCV a nivel mundial.

País	Referencia
Estados Unidos	Simone <i>et al.</i> 1996
España	Navas-Castillo <i>et al.</i> 2000
Portugal	Louro <i>et al.</i> 2000
Suráfrica	Wisler y Cortez 2001
Puerto Rico	Wintermantel <i>et al.</i> 2001
Italia	Accotto <i>et al.</i> 2001
Grecia	Dovas <i>et al.</i> 2002
Israel	Segev <i>et al.</i> 2004
Chipre	Papayiannis <i>et al.</i> 2004
Taiwán	Tsai <i>et al.</i> 2004
Francia	Dalmon <i>et al.</i> 2005
Isla Réunion	Delatte <i>et al.</i> 2005
Líbano	Abou-Jawdah <i>et al.</i> 2006
México	Alvarez-Ruiz <i>et al.</i> 2007
Turquía	Çevik y Eras 2008
Isla Mayotte	Massé <i>et al.</i> 2008
Cuba	Martínez-Zubiaur <i>et al.</i> 2008
Brasil	Barbosa <i>et al.</i> 2008
Costa Rica	Castro <i>et al.</i> 2009
Hungría	Bese <i>et al.</i> 2011

Cuadro 2. Familias y especies que actúan como hospedantes de ToCV.

Familia	Especies
Aizoacea	<i>Tetragonia expanda</i> Murr.
Amaranthaceae	<i>Gomphrena globosa</i> L.
Apocynaceae	<i>Vinca rosea</i> L.
Chenopodiaceae	<i>Beta macrocarpa</i> Guss., <i>Chenopodium capitatum</i> (L.) Asch., <i>C. Murale</i> L., <i>Spinacia oleracea</i> L.
Compositae	<i>Callistephus chinensis</i> (L.) Nees, <i>Calendula officinalis</i> L., <i>Zinnia elegans</i> Jacq
Plumbaginaceae	<i>Limonium latifolium</i> (J. E. Sm.) Kuntze. <i>Cyphomandra betacea</i> (Cav.) Sendt., <i>Lycopersicon esculentum</i> Mill., <i>Nicotiana benthamiana</i> Domin, <i>N. clevelandii</i> Gray, <i>N. edwardsoni</i> Christie & D. W. Hall, <i>N. glutinosa</i> L., <i>N. megalosiphon</i> Huerch & Muell., <i>N. tabacum</i> L., <i>Petunia hybrida</i> Vilm., <i>Physalis alkekengi</i> L., <i>P. ixocarpa</i> Brot., <i>P. wrightii</i> Gray., <i>P. peruviana</i> , <i>Solanum nigrum</i> L., <i>S. acaule</i> Bitter.
Solanaceae	
Umbelliferae	<i>Anthriscus cereifolium</i>

Crecimiento de los cultivos de tomate y chile dulce

El desarrollo de plantas se presenta como un fenómeno discontinuo, se compone de diferentes fenofases caracterizadas por un patrón de organogénesis y por una sensibilidad específica a factores ambientales. Al reemplazarse una fase por otra, se genera un estado de transición denominado periodo crítico (Amzallag 2004).

El tomate (*Lycopersicon esculentum*), en los primeros 15-30 días alcanza su máxima tasa de crecimiento y se presenta una disminución en las dos semanas siguientes (CATIE 1990). Ésta se debe al estrés por la adaptación posterior al trasplante y a que al extraer del semillero se rompen algunas raíces, lo cual origina un aumento de la respiración y que los factores de desarrollo sean empleados principalmente en la restitución de estos órganos (Geraud *et al.* 1995). Además se reduce la absorción de agua, lo cual se traduce en descenso de la tasa de desarrollo (Taiz y Zeiger 2006). El arrime de tierra y fertilización se da entre los 45-60 días, y es cuando la planta se hace nuevamente eficiente (CATIE 1990). Después de los 60 días, el crecimiento disminuye y se estabiliza al completarse la fase juvenil o vegetativa e iniciar la reproductiva (Rojas y Castillo 2007).

El chile dulce (*Capsicum annuum*), posee un periodo de preemergencia entre los 8 y 12 días (más corto a temperaturas mayores) durante el cual surge primero una pequeña raíz pivotante (radícula) y poco después, un par de hojas alargadas (cotiledonares) (CATIE 1993). A partir de este momento se evidencia un crecimiento lento de la parte aérea, mientras se sigue incrementando el sistema radical, por lo cual es de vital importancia la protección, pues destina sus recursos al establecimiento. La raíz crece continuamente y su proliferación depende de la disponibilidad de agua y nutrientes del suelo (Taiz y Zeiger 2006). Hacia el final de la etapa de plántula, la tasa de desarrollo empieza a disminuir (CATIE 1993), sin embargo continua el aumento del follaje, invirtiendo su energía para ampliar el área fotosintética en preparación hacia la fase reproductiva (Jiménez *et al.* 2007).

Importancia de los cultivos en estudio

L. esculentum es uno de los vegetales de mayor importancia económica en el mundo por ser parte de la canasta básica familiar en la mayoría de países. Esto se evidencia en un incremento del 3.5 % en la producción mundial entre los años 2000 y 2005, para un total de 4.599.000 hectáreas cosechadas (Martínez *et al.* 2008). En América Latina, constituye el 8.83% del área cultivada (Puertas *et al.* 2003) y en Centroamérica, representa una de las hortalizas primordiales (CATIE 1990). En Costa Rica, los rendimientos durante el año 2009 fueron de 50 000 toneladas lo que generó un ingreso de ₡10,000.000.000 (diez mil millones de colones) (MAG 2010) y se estima que se cultivan alrededor de unas 870 hectáreas al año (Rojas y Castillo 2007).

En nuestro país es una de las hortalizas de fruto de mayor consumo, no sólo fresco, sino también como producto elaborado (Rojas y Castillo 2007). Es fuente de vitaminas, minerales, fibra y antioxidantes (Carrari y Fernie 2006) y tiene importantes aplicaciones en medicina: estimula el aparato digestivo, es desinfectante y antiescorbútico (Rojas 2004).

C. annuum, es la especie de chile más importante a nivel económico mundial y se cultiva en la mayoría de los países tropicales y subtropicales (Jiménez *et al.* 2007). Los frutos son consumidos frescos o procesados como condimento, brindando vitaminas y minerales para

el consumo humano (Saborio 1994). Similar al tomate, el chile dulce es una actividad que demanda mucha mano de obra durante la cosecha y venta, lo que genera oportunidades de empleo (Rojas y Castillo 2007). En nuestro país, existen condiciones agroclimáticas apropiadas para su cultivo y posterior comercio (Azofeifa y Moreira 2005). A nivel nacional no existe información actualizada y precisa sobre las áreas de siembra (Jiménez *et al.* 2007), sin embargo para la región central oriental (que incluye Cartago) se generaron ingresos de ₡17.920.000 (diecisiete millones novecientos veinte mil colones) por hectárea para el 2010 (MAG 2010).

Efecto de la infección viral dentro del periodo crítico de desarrollo de los cultivos de tomate y chile dulce

Acuña (1993) e Hilje (2001), describen el periodo crítico de susceptibilidad de las plantas a los virus, como el tiempo en el cual la infección provoca mayores pérdidas sobre el rendimiento y producción del cultivo. Este se establece como los primeros 50-60 días desde la emergencia, lo cual está relacionado con el desarrollo inicial de los cultivos de tomate y chile dulce.

La infección por virus ha afectado el cultivo del tomate en todo el mundo, en Centroamérica, México y el Caribe ha sido necesario buscar nuevas áreas para su producción y establecer medidas legales, como la veda, en el caso de la República Dominicana (Bonilla 1995). Un ejemplo importante de este problema lo comunican Rosset *et al.* (1987) en Bonilla (1995), donde un geminivirus redujo hasta en un 100% los rendimientos en tomate, cuando se infectaba en las primeras semanas, pero si la inoculación ocurría en el estado de floración y formación de frutos, la enfermedad era menos severa y disminuía el rendimiento en un 40%.

Se ha determinado que cuando la infección es temprana durante el desarrollo, las plantas presentan un tamaño más reducido, baja producción y calidad (Rubio *et al.* 2002, Martínez *et al.* 2008, Lett *et al.* 2009) e inclusive pueden impedir la formación de flores y frutos (Moffat 1999). Puertas *et al.* (2003), quienes evaluaron el comportamiento de las plantas

ante la infección causada por geminivirus, determinaron que en el periodo de cinco semanas después de la etapa de germinación la enfermedad viral afecta seriamente los rendimientos de *L. esculentum*. Por su parte, López-Martínez *et al.* (2004), al estimar el efecto de inocular en diferentes fases fenológicas de *C. annumm*, encontraron una mayor severidad de los síntomas al poseer de 4 a 8 hojas verdaderas. Resultados similares fueron obtenidos de Marcenaro y Rayo (2002), pues al inicio de la floración y fructificación de tomate, se poseía un 60% de severidad de la enfermedad, al inocularse a los 28 días después de la siembra (DDS) y un 40% de severidad al contagiarse a los 35 DDS. Más recientemente, Levi y Lapidot (2008), comprobaron que la edad de la planta de esta especie tiene un efecto significativo en la resistencia al *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) y que si la transmisión se da a los 14 días después de la germinación las pérdidas en producción alcanzan valores del 50% al 100%.

II. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La agricultura en Costa Rica representa una actividad esencial principalmente en el cultivo de hortalizas, granos y oleaginosas. Sin embargo, uno de los factores que han limitado su producción son las enfermedades provocadas por virus, las cuales se presentan con mayor frecuencia y severidad cada vez. El tomate y chile dulce son de alto valor para los consumidores y agricultores de nuestro país, que en su mayoría corresponden a pequeños y de escasos recursos económicos. Estos frutos también son exportados, sin embargo cada día el mercado internacional se vuelve más exigente con el manejo y control de las plagas (Badii y Abreu 2006), así como con la cantidad de residuos de plaguicidas existentes en los productos de consumo humano.

Es primordial una detección temprana, por las consecuencias generadas de una infección viral dentro del periodo crítico de susceptibilidad. Es preciso conocer, si los cultivos se infectan con virus durante su estancia en el almácigo, mediante el diagnóstico molecular con alta especificidad y sensibilidad, pues son útiles para determinar infecciones presintomáticas e identificar enfermedades (Faría y Nava 2009).

Según Castle *et al.* (2009), en el desarrollo de la enfermedad intervienen varios factores, entre ellos los vectores, virus y cultivos. Dichos agentes forman relaciones complejas, dinámicas y cambiantes (Zúñiga y Ramírez 2003), lo cual dificulta controlar la diseminación. Otro factor podrían ser las malezas u hospederos alternos que crecen dentro del área de siembra y en sus alrededores, al funcionar como fuentes de inóculo primario y difusión de los virus (Apablaza *et al.* 2003, Ormeño y Sepúlveda 2005, Wintermantel y Wisler 2006). Duffus (1971), señala que éstas pueden cumplir tres papeles epidemiológicos: servir como reservorio viral, de vectores, o de ambos a la vez.

En el control de las enfermedades virales es importante la vigilancia de las autoridades, el cuidado y la cooperación entre los agricultores, año con año. Al conocer los daños económicos originados por la utilización de plantas de viveros y bancos de yemas de mala calidad (en otros cultivos), tanto en distintos países como en el nuestro, surgieron disposiciones fitosanitarias dirigidas a constituir los procedimientos técnicos de observancia obligatoria para los productores de almácigos y para el control de la calidad de sus productos, que corresponden al “Reglamento de Viveros, Almácigos, Semilleros y Bancos de Yemas” mediante el decreto N° 33927-MAG, publicado en el diario oficial La Gaceta N° 208 del 30 de octubre 2007.

El mismo establece que el Servicio Fitosanitario del Estado debe diagnosticar la presencia de enfermedades, siendo necesario una tipificación de la plaga. Es esencial detectar de manera rápida, precisa y temprana el o los virus que infectan un cultivo particular. Esta identificación no se puede realizar solamente a partir de observaciones de plantas sintomáticas, también se requiere del análisis molecular en el laboratorio. El conocimiento generado contribuirá al diseño de estrategias de manejo del cultivo y de la plaga.

III. OBJETIVO GENERAL

Diagnosticar la presencia de *Begomovirus* en chile dulce, tomate y malezas, así como del *Tomato chlorosis virus* (ToCV) en los dos últimos, en almácigos durante el periodo crítico, en Cartago.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar begomovirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y chile dulce (*Capsicum annuum* L.) durante el periodo crítico del desarrollo de estos cultivos.
- Detectar begomovirus en malezas asociadas a los almácigos en estudio.
- Identificar el crinivirus ToCV durante el periodo crítico del desarrollo de tomate (*Lycopersicom esculentum* Mill.).
- Identificar el crinivirus ToCV en malezas asociadas a los almácigos en estudio.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Estrategia Metodológica

Se recolectaron plántulas en tres viveros dedicados al desarrollo y venta de almácigo de tomate y chile dulce, situados en tres distintas zonas geográficas de Cartago (1361 msnm, 1609 msnm y 1281 msnm), respectivamente (Fig. 4). Cada plántula permanece en los viveros de 35-45 días hasta alcanzar un tamaño específico para la venta, durante los cuales se les aplica una serie de tratamientos químicos para eliminar plagas y fertilizar la planta (com. pers. técnicos e ingenieros del MAG).

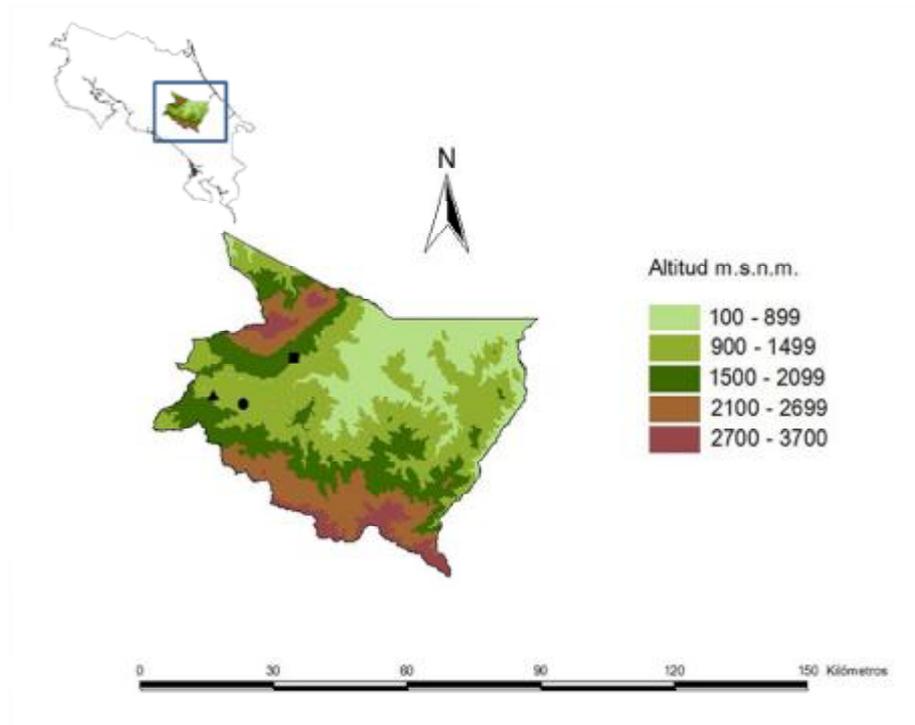


Figura 4. Mapa de Cartago, Costa Rica. Se resaltan en negro la localización de los tres invernaderos de almácigos de tomate y chile dulce.

Se seleccionaron 15 plántulas al azar de una bandeja con 96, a la cual se le aplicó tratamiento químico (insecticida: imidacloprid (Confidor; Bayer CropScience).) y otras 15 de una bandeja sin éste. Lo anterior se realizó para dos diferentes cultivos, a saber, tomate y chile dulce, en cada uno de los 3 ambientes protegidos. Además se realizaron muestreos en

dos diferentes épocas (lluviosa y seca), de las malezas u hospederos alternos de los virus. En una primera estación lluviosa (setiembre 2008) se recolectaron alrededor de 10 muestras vegetales que se encontraban en los alrededores de cada invernadero con posibles síntomas para begomovirus/crinivirus y/o presencia de moscas blancas. En enero 2009 se repitió el procedimiento anterior. El taxónomo, Dr. rer. nat. Carlos Morales O., identificó la especie o género de cada planta.

En total fueron etiquetadas y analizadas 258 ejemplares de tejido foliar. Cada vivero fue georeferenciado utilizando un "Sistema de Posicionamiento Geográfico" (GPS por sus siglas en inglés). Se determinaron los porcentajes de plantas infectadas y no infectadas por cada almacigal, cultivo y/o maleza.

Las muestras se analizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Virus, del Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, donde se realizó la extracción de los ácidos nucleicos (ADN ó ARN). La detección de *Begomovirus* se llevó a cabo inicialmente por hibridación molecular. Los resultados positivos se confirmaron mediante amplificación por círculo rodante (RCA por sus siglas en inglés) del ADN viral y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Además se realizó una identificación preliminar de las especies virales por secuenciación parcial. La identificación de crinivirus se realizó de manera directa mediante la Retrotranscripción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (qRT-PCR) en tiempo real.

B. Muestras vegetales

Consistieron en círculos de hojas jóvenes, cortados con un sacabocados de 7.0 mm de diámetro. Éste se almacenó en un tubo de plástico de 15ml (Falcon® Becton Dickinson, NJ, EUA), los cuales contenían sílica gel en forma de perlas (Merck, cat. 7735) para absorber la humedad. Cada muestra fue etiquetada y almacenada a temperatura ambiente.

C. Liofilización del tejido vegetal

Las muestras se sometieron a condiciones de bajas temperaturas de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ y vacío de 50 pascales por 48 horas en un liofilizador Labconco, serie 66131, distribuido por Labconco Corporation, Kansas City, Missouri.

D. Detección de *Begomovirus*

D.1. Extracción de ácidos nucleicos totales (ANt)

Se llevó a cabo siguiendo el método de Dellaporta *et al.* (1983), con algunas modificaciones:

Se maceraron aproximadamente 15 mg de tejido foliar liofilizado en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml, con 0.5 ml de solución amortiguadora (Tris-HCl 100 mM de pH: 8.0, EDTA 50 mM pH: 8.0, NaCl 100 mM y β -Mercaptoetanol 10 mM). Se agregaron 33 μl de SDS al 20% y se incubó por 10 minutos a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se agregaron 160 μl de acetato de potasio 5M y agitó en vórtex por 5 minutos. Después de centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo para microcentrífuga y posteriormente se le agregaron 500 μl de PCI (fenol: cloroformo: alcohol isoamílico, 25:24:1) y agitó en el vórtex 5 minutos. Luego se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos. Se transfirieron 450 μl del sobrenadante a un nuevo tubo y adicionó 1 volumen de isopropanol, y luego se agitó suavemente. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó dos veces con 500 μl de alcohol al 70 %. Se resuspendió en 50 μl de agua bidestilada estéril y se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta que se utilizó para las hibridaciones y las PCR.

D.2. Cuantificación de los ANt

Para cuantificar la concentración y pureza de los ANt extraídos, se midió la absorbancia utilizando espectrofotometría de luz UV (ultravioleta) a 260/280 nm. Se utilizó un

espectrofotómetro Unicam UV-Visible (Thermo Spectronic Heλios γ spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc)). Las lecturas se realizaron con 2 μ l de cada muestra diluídas en 498 μ l de agua bidestilada para tener una concentración 1:250 v/v de muestra. Asimismo se visualizaron en geles horizontales de agarosa al 1% (TAE 1X, 100 Voltios por 40 minutos), teñidos con bromuro de etidio (0.5 μ g/ml).

D.3. Hibridación molecular

Se utilizó el sistema de hibridación no radiactivo Alk Phos Direct™ (Amersham Pharmacia Biotech Labelling, Piscataway, NJ), que utiliza la enzima fosfatasa alcalina para marcar el ADN sonda (100ng de ADN total de fragmentos de PCR) directamente en aproximadamente 45 minutos (Potter *et al.* 2003). La visualización de las muestras positivas se hizo en membranas de nylon anfotéricas (Biodyne A, Pall-Gelman Ann Arbor, MI).

La sonda general utilizada para la identificación inicial de geminivirus, se hibrida en condiciones de baja astringencia (permite el 25% de apareamientos erróneos) con secuencias altamente conservadas en el extremo 3' del gen de la proteína de cubierta de BGYMV-GT. Ésta se preparó a partir de productos de PCR (400pb: pares de bases) obtenidos con los iniciadores específicos (Potter *et al.* 2003) (Cuadro 3, Fig. 5) y marcados con la enzima fosfatasa alcalina. La sonda marcada se puso en contacto con las muestras de ADN que se fijaron con luz ultravioleta en la membrana. Se realizaron dos lavados poshibridación.

Para la detección final se utilizó el reactivo CDP-star™ que es el sustrato de fosfatasa alcalina. Esta reacción tiene una rápida producción de luz en corto tiempo, la cual se detectó por autoradiografía. La especificidad y sensibilidad de las sondas fueron probadas por su habilidad de hibridar sólo con su respectivo ADN blanco a diferentes concentraciones (1 ng, 10 pg y 100 pg).

Como control cruzado, los ANt de los cultivos en estudio y de las malezas, se enviaron a analizar por hibridación radioactiva (marcaje con P^{32}) al Departamento de Patología Molecular de Plantas de la Universidad de Davis, California, USA. En este sistema se utilizó una mezcla de clones completos del ADN-A de los virus TYLCV, BGYMV, CuLCrV, PHYVVA y ToMoV. Esta sonda se marcó con $[\alpha^{32}P]$ -dCTP por “nick-translation” (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). La hibridación se llevó a cabo a baja astringencia ($37^{\circ}C$) según Gilbertson *et al.* (1991).

D.4. Amplificación por RCA del ADN viral

Las muestras positivas por hibridación fueron confirmadas utilizando el RCA (TempliPhi DNA Sequencing Template Amplification Kit (Amersham Biosciences, USA)) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este procedimiento emplea la polimerasa del bacteriófago Phi29 y cebadores al azar para la amplificación de moléculas de ADN circulares (Haible *et al.* 2006).

D.5. Confirmación por PCR del ADN viral

Se utilizaron iniciadores generales que reconocen las secuencias geminivirales presentadas en el cuadro 3, para el componente A (Rojas *et al.* 1993, Wyatt y Brown 1996) y para el componente B (Rojas *et al.* 1993).

Cuadro 3. Secuencias de nucleótidos de los iniciadores utilizados para detección de geminivirus. D=A,G,T; H=T,A,C; K=G,T; M=A,C; N=A,C,G,T; R=A,G; Y=C,T; W=A,T. La nomenclatura de los iniciadores generales es codificada de la siguiente forma P (Iniciadores); BL y CR (encuadres abiertos de lectura); c (sentido complementario); v (sentido viral); el número (nucleótido al que se une el iniciador) y la secuencia subrayada es la que reconoce la enzima de restricción PstI. La nomenclatura de los iniciadores específicos: P (Iniciador), BGGT (Virus del mosaico dorado amarillo del frijol aislado de Guatemala), v (sentido viral), c (sentido complementario) y el número (nucleótido al que se une el iniciador).

Iniciadores	Secuencias	Región amplificada
PBGGTv647	5'TATGTGTATATCCGATGTCACACGTGG3'	Extremo 3' del gen de proteína cubierta ADN-A
PBGGTc1048	5'CGAATTTTCAATGTCGCATATACAGGG3'	
PAR1c715	5'GATTTCTGCAGTTDATRTTYTCRTCCATCCA3'	Parte superior
PAL1v1978	5'GCATCTGCAGGCCACATYGTCTTYCCNGT3'	del ADN-A (Top-A)
PAV494	5'GCCYATRTAYACRAAGCCMAG3'	Núcleo del gen de proteína cubierta ADN-A (<i>cp</i>)
PAC1048	5'GGRTTDGARGCATGHGTACATG3'	
PBL1v2039	5'GCCTCTGCAGCARTGRTCKATY TTCATAC3'	Región hipervariable
PCRc2	5'CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCC3'	(RHV) del ADN-B

La mezcla de reacción se preparó, en un tubo para microcentrífuga, con cloruro de magnesio, enzima ADN polimerasa, dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatos), iniciadores (seleccionados para amplificar una región específica) y el ADN molde (amplificado por RCA) (Cuadro 4, Fig. 5).

Cuadro 4. Descripción de las concentraciones y cantidades de reactivos utilizados en una reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad en μ l
Buffer 10X	2.5
MgCl ₂ 25 mM	2.5
dNTP's 2,5 mM	2.5
P1 10 μ M	0.5
P2 10 μ M	0.5
Taq 5 U/ μ l	0.1
ADN molde (RCA)	1
H ₂ O	15.4
Total	25

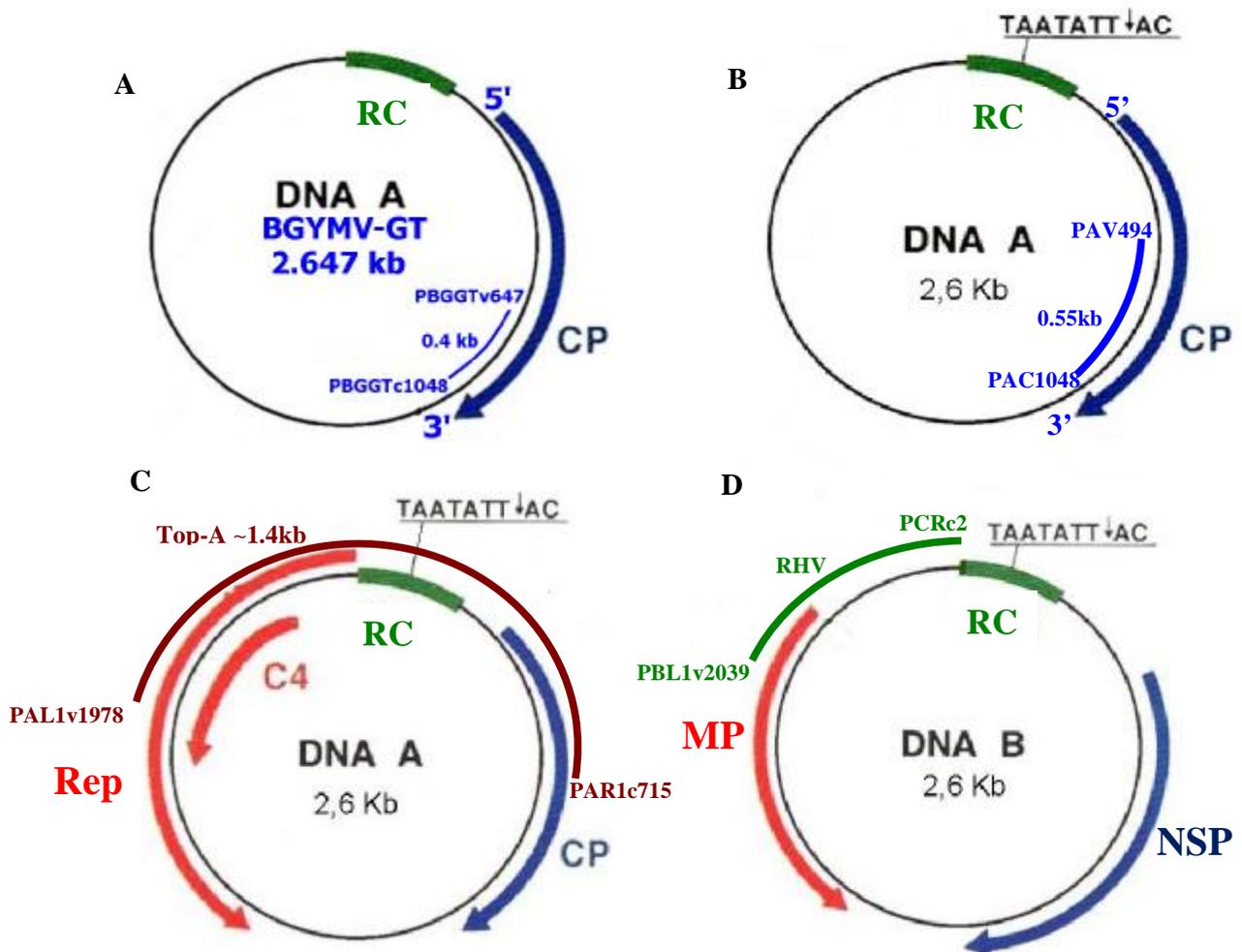


Figura 5. Esquemas de genomas geminivirales donde se ubican los iniciadores utilizados y las tallas aproximadas de los productos de PCR obtenidos. **A.** Componente A en el cual se muestran los sitios en los que se unen los iniciadores **PBGGTv647/PBGGTc1048** y las tallas aproximadas de los productos de PCR usados como sonda general. **B.** ADN-A en el que se denotan los sitios de unión de los iniciadores **PAV494/PAC1048**. **C.** Representación esquemática de la amplificación de aproximadamente 1.4kb con los iniciadores **PAR1c715/PAL1v1978**. **D.** Componente B donde se muestran los sitios de unión de los iniciadores **PBL1v2039/PCRe2** que amplifican diferentes tallas (0.3-0.6kb).

La amplificación se realizó utilizando un termociclador programable (PTC-100™, MJ Research, Inc.) (Walker y Gingold 1997), con un primer ciclo de desnaturalización a 95 °C durante un minuto, seguido de 30 ciclos de un minuto a 94°C, dos minutos de anillamiento a 55°C y tres minutos de extensión a 72°C; luego siete minutos a 72°C y por último a 18°C hasta su análisis (Rojas *et al.* 1993).

Los productos de la PCR se visualizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% de TAE 1x (Tris Base, Ácido acético glacial, EDTA pH 8, 0.5 M), a un voltaje de 100 V. Las bandas de ADN se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), para visualizar las bandas en una fotografía de luz ultravioleta.

D.6. Secuenciación parcial

Los productos de PCR para las tres parejas de iniciadores se purificaron con el kit QIAquick® (QIAGEN, cat. 28106), según las indicaciones del proveedor. El análisis de secuencias se realizó utilizando el equipo ABI Prism 3130 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las secuencias parciales se alinearon con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor® y compararon mediante el algoritmo BLASTn con la base de datos del NCBI (*Nacional Center for Biotechnology Information*) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Se obtuvo los índices de identidad nucleotídica del Top-A, gen *cp* y la RHV del virus encontrado con respecto a otros geminivirus.

Se empleó el valor del umbral (90%) para distinguir especies de *Begomovirus*; establecido por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) (Fauquet *et al.* 2008).

E. Detección de Crinivirus

E.1. Extracción de ARN total de muestras vegetales

La extracción de ARN total se realizó en las muestras de tomate y en las malezas colectadas alrededor de los tres ambientes protegidos. Se utilizó el kit “TRI Reagent Extraction” (Molecular Research Center, Inc.) del siguiente modo:

Se maceraron aproximadamente 15 mg de tejido foliar liofilizado en un tubo para microcentrífuga de 1.5 ml con 0.5 ml de TRI Reagent. Se agregó 0.5 ml más de TRI Reagent, se dejó reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se añadió 0.2 ml de cloroformo, se agitó por 15 segundos, se dejó reposar 5 minutos y se centrifugó por 15 minutos a 12000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo y se añadieron 0.5 ml de isopropanol, se mezcló y dejó reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó por 8 minutos a 12000 rpm, se removió el sobrenadante, se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 70%, se mezcló y se centrifugó por 5 minutos a 7500 rpm, se removió el etanol y dejó secar. Se resuspendió en 50 µl de agua estéril. Finalmente las muestras se precipitaron con 5 µl de acetato de sodio (1/10 volumen) y 125 µl de etanol absoluto (2.5 volúmenes) y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

E.2. Cuantificación de los ARN totales

Se cuantificó y estimó la calidad del ARN total por espectrofotometría y la integridad en geles horizontales de agarosa, en las mismas condiciones descritas para el ADN.

E.3. Amplificación por qRT-PCR de ARN del crinivirus ToCV

Se utilizó el kit “Qtaq One-Step qRT-PCR SYBR® (Clontech Laboratories) según protocolo y condiciones del fabricante. Los iniciadores utilizados amplificaron el fragmento de gen homólogo de la proteína de choque calórico 70 (HSP70) del ToCV. Sus secuencias corresponden a TocQ 875F 5' AACCATTCGCTAGACGCAGTT 3' y TocQ 998R 5'

TCTGCTCTATTCTGAATCGGTCTAA 3'. Los ciclos críticos (“threshold”) fueron determinados con el software Multiplex Quantitative PCR Systems (MxPro-3000P; Stratagene). La amplificación fue seguida por análisis de las curvas de fusión.

VI- RESULTADOS

A. Detección de *Begomovirus*

A.1. Extracción, cuantificación y análisis electroforético de los ANt:

En total se realizó la recolecta y extracción de ácidos nucleicos totales de 258 muestras vegetales en los tres invernaderos de almácigos de la zona de Cartago, de las cuales 90 fueron de tomate, 90 de chile dulces y 78 de malezas. Al evaluar los valores obtenidos de la pureza e integridad de los ANt con electroforesis en geles de agarosa y la concentración por cuantificación espectrofotométrica (datos no mostrados), se determinó que la gran mayoría presentaban las condiciones requeridas (buena cantidad sin la presencia de sustancias en solución junto con los ácidos nucleicos extraídos, como proteínas, fenoles y trazas de reactivos). Los que no, se repitieron hasta ser aptos para proseguir con las demás pruebas moleculares (hibridaciones y PCR).

A.2. Hibridación molecular, RCA y PCR en tomate y chile dulce:

Con el análisis por hibridación molecular, no se detectó infección causada por *Begomovirus* en el cultivo de solanáceas, en ninguno de los almácigos muestreados (Cuadro 5). Para comprobar que estos datos no correspondían a falsos negativos, se examinaron varias de las muestras mediante pruebas de PCR, lo cual permitió ratificar los resultados.

Cuadro 5. Detección de *Begomovirus* en invernaderos de almácigos de Cartago durante el 2008-2009. Número total de muestras analizadas e infectadas por almácigo y por especie.

Especie	Almácigo A 1361 msnm		Almácigo B 1609 msnm		Almácigo C 1281 msnm		Total general	
	Nº muestras	Positivas	Nº muestras	Positivas	Nº muestras	Positivas	Nº muestras	Positivas
<i>Lycopersicon esculentum</i>	30	0	30	0	30	0	90	0
<i>Capsicum annuum</i>	30	0	30	0	30	0	90	0
Malezas	29	4	25	1	24	1	78	6
Total	89	4	85	1	84	1	258	6

A.3. Hibridación molecular, RCA y PCR en malezas:

Fueron identificadas taxonómicamente la especie o género para las 78 malezas recolectadas alrededor de los tres ambientes protegidos (datos no mostrados). De éstas, 21 se detectaron positivas por hibridación molecular para begomovirus. Sin embargo al verificar estos resultados mediante RCA del ADN viral y PCR solo se confirmaron seis muestras, que correspondieron al 7,7% del total de ejemplares muestreados (Cuadro 5).

Cuatro muestras pertenecían al almácigo A, de ellas, dos se recolectaron en la primera época lluviosa (setiembre 2008), éstas correspondieron a *Phytolacca icosandra* (Phytolacaceae) y *Phaseolus* sp. (Fabaceae), mientras para la estación seca (enero 2009) las dos malezas pertenecían al mismo género *Phaseolus* sp. (Fabaceae). En el almácigo B, solamente se identificó a *Brassica* sp. (Brassicaceae) con virus en el 2009. Para el almácigo C, la especie *Solanum quitoense* (Solanaceae) fue la única positiva, esto en el 2008. La mayoría de los hospederos alternos se caracterizaron por ser de hábito anual, sólo *S. quitoense* y *P. icosandra* son plantas con crecimiento perenne.

Los fragmentos de PCR de la RHV para *P. icosandra*, mostró dos tallas diferentes (~0.35 kb y ~0.45 kb), lo cual indica inicialmente la presencia de dos tipos de virus, es decir una infección mixta. *Brassica* sp. y dos de las muestras de *Phaseolus* sp. presentaron amplicones de ~0.35 kb; una de *Phaseolus* sp. y *S. quitoense* de ~0.45 kb, que

correspondieron a infecciones simples. En todas las malezas los productos de PCR del gen *cp* fueron de la talla esperada de ~0.55 kb, como los de la parte superior del componente A tuvieron aproximadamente 1.4 kb, excepto en una muestra de *Phaseolus* sp., la cual no se obtuvo.

A.4. Análisis de las secuencias parciales de *Begomovirus* en malezas:

Se obtuvieron las secuenciaciones parciales de las dos parejas de iniciadores que amplifican regiones específicas del componente A, con porcentajes de similitud superiores al 90%. El mismo virus se determinó para ambos pares de imprimadores. Sin embargo para el ADN-B los valores de identidad nucleotídica fueron menores del umbral y en ciertas muestras el begomovirus con el que se tiene mayor similitud difiere del obtenido para el ADN-A (Cuadro 6).

Cuadro 6. Especies de malezas infectadas por begomovirus y porcentajes de identidad nucleotídica de la parte superior-A (Top-A) y núcleo gen *cp* (*cp*) en el componente A y de la región hipervariable (RHV) en el componente B.

Especie (Muestra)	<i>Begomovirus</i> (N° accesión)	Top-A (%)	<i>Begomovirus cp</i> (N° accesión)	<i>Begomovirus cp</i> (%)	<i>Begomovirus</i> (N° accesión)	RHV (%)
<i>Phytolacca icosandra</i> (08-3754)	SYMMoV-[CR] (AY064391)	94	SYMMoV (AJ842151)	92	ToSRV (GU358449)	80
					SYMMoV (AY818734)	80
<i>Phaseolus</i> sp. (08-3756)	SYMMoV-[CR] (AY064391)	93	SYMMoV (AJ842151)	97	SiGMV (EF537046)	76
<i>Solanum quitoense</i> (08-3984)	BGYMV-[GA] (M91604)	99	BGYMV-[GA] (M91604)	93	JMV (AF324411)	76
<i>Brassica</i> sp. (09-4362)	SYMMoV-[CR] (AY064391)	94	SYMMoV (AJ842151)	90	SYMMoV-[CR] (AF440790)	85
<i>Phaseolus</i> sp. (09-4370)	SYMMoV-[CR] (AY064391)	93	SYMMoV (AJ842151)	95	SYMMoV-[CR] (AF440790)	84
<i>Phaseolus</i> sp. (09-4377)	-	-	SYMMoV (AJ842151)	94	SYMMoV-[CR] (AF440790)	82

Se identificó la presencia del *Squash yellow mild mottle virus* (SYMMoV) en la mayoría de muestras positivas para *Begomovirus*, en una infección mixta e incluso para las diferentes épocas de muestreo. *S. quitoense* fue recolectada alrededor del almácigo C y no presentaba síntomas visibles de este virus, contrario a los otros hospederos alternos que fueron sintomáticos.

B. Detección del crinivirus ToCV

B.1. Extracción, cuantificación y análisis electroforético de los ARN totales:

En total se examinaron 168 muestras vegetales para el ToCV, 90 plántulas de tomate y 78 muestras de malezas alrededor de los invernaderos de almácigos de Cartago. El análisis electroforético y por espectrofotometría, de la integridad y cantidad de ARN totales resultantes de las extracciones, mostró que los mismos poseían valores de pureza y concentración (datos no mostrados) adecuados para proseguir con las reacciones de qRT-PCR.

B.2. Amplificación por qRT-PCR de ARN del ToCV en tomate

Fue posible identificar un 28,3% del total de plántulas, positivas para este crinivirus. Las mismas se caracterizaron por estar presentes en el almácigo A y el B. Contrario a lo esperado, se determinó un 33,3% de las plantas con el virus a las que se aplicó el tratamiento químico, mientras que solamente se encontró un 23,3% positivas para los almácigos sin el mismo. Esta misma tendencia se halló en el primero de los invernaderos, con un 46,7% de las plantas tratadas con insecticida positivas, frente a un 13,3% sin éste. En el segundo, si se determinó un mayor cantidad de muestras positivas (33,3%) que no fueron fumigadas comparadas a las que si (20%) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Detección del crinivirus ToCV en invernaderos de almácigos de Cartago durante el 2008-2009. Número total de muestras analizadas e infectadas por almácigo y por especie.

Especie	Almácigo A 1361 msnm		Almácigo B 1609 msnm		Almácigo C 1281 msnm		Total general	
	Nº muestras	Positivas	Nº muestras	Positivas	Nº muestras	Positivas	Nº muestras	Positivas
<i>Lycopersicon esculentum</i>	30	9	30	8	30	0	90	17
Con insecticida	15	7	15	3	15	0	45	10
Sin insecticida	15	2	15	5	15	0	45	7
Malezas	29	3	25	2	24	1	78	6
Total	59	12	55	10	54	1	168	23

B.3. Amplificación por qRT-PCR de ARN del ToCV en malezas

Se diagnosticó infección en cinco muestras de plantas silvestres analizadas y en una especie de cultivo, la cual fue recolectada como una única planta creciendo cerca de las otras malezas, lo cual representa un 7,7% del total de ejemplares examinados (Cuadro 7). Las especies de estas malezas y este cultivo corresponden a nuevos reportes de hospederos alternos del ToCV (Solórzano-Morales *et al.* 2011) y se aumenta de ocho a trece el número de familias con miembros hospedantes de este crinivirus, es decir cinco nuevas (Cuadro 8).

Cuadro 8. Especies de malezas infectadas por el crinivirus ToCV.

Muestra	Especie	Familia
08-3746	<i>Ruta chalepensis</i>	Rutaceae
08-3753	<i>Cucurbita moschata</i>	Cucurbitaceae
08-3754	<i>Phytolacca icosandra</i>	Phytolacaceae
09-4348	<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae
09-4355	<i>Brassica sp</i>	Brassicaceae
09-4362	<i>Brassica sp</i>	Brassicaceae

De las seis malezas positivas para el ToCV, dos también presentaban infección por begomovirus (*P.icosandra* y *Brassica. sp.*). Tres muestras pertenecían al almácigo A, que

se recolectaron en la época lluviosa (setiembre 2008), éstas correspondieron a *R. chapelensis*, *P. icosandra*, y el cultivo *C. moschata* sp. En el almacigo B, se identificaron dos ejemplares de *Brassica* sp. con virus en el 2009. Para el almacigo C, la especie *P. major* fue la única positiva, también en la estación seca del 2009. La mayoría de los hospederos alternos son de hábito caducifolio, sólo *R. chapelensis* y *P. icosandra* son plantas que se caracterizaron por tener crecimiento perenne.

DISCUSIÓN

A. Detección de begomovirus.

Algunas de las posibles causas de que no se diagnosticaran como positivas las muestras obtenidas de plántulas, podrían ser que las mismas se encontraban no infectadas debido a que durante la época de muestreo existió poco inóculo viral, aunque si se observó la presencia de moscas blancas en las tres zonas evaluadas (Hull 2002). También existe la posibilidad de que la carga viral presente en los tejidos foliares en ese momento fuera muy baja para ser detectada mediante la sensibilidad de la técnica de hibridación molecular.

Seis muestras correspondientes a malezas resultaron ser positivas para begomovirus. Desde el punto de vista epidemiológico estas plantas desempeñan un papel muy importante al convertirse en hospederos alternos y por ende fuente de inóculo primario, al persistir y propagar virus a otras plantas incluyendo cultivos de importancia económica (Agrios 2005, Yang *et. al.* 2008).

Es importante resaltar que tres de las muestras antes citadas pertenecen al género *Phaseolus* sp. Esto probablemente se podría haber debido a la cercanía entre las fincas productoras de los almacigos y el cultivo de frijol (susceptible a begomovirus), así como a la presencia de restos de cosecha y/o plantas que se convierten en importantes fuentes de inóculo viral. Estudios realizados por Monci *et al.* (2002) en el cultivo de tomate, demostraron que plantas de frijol se pueden desempeñar como reservorios de virus que son transmitidos a plantas jóvenes de *L. esculentum*. Las malezas con hábito de crecimiento perenne, pueden

funcionar como fuente constante para transmitir el virus e inclusive cerrar periodos entre estaciones de cultivo, si así se establecieran (Jovel *et al.* 2007).

P. icosandra presentó una infección mixta con SYMMoV y *Tomato severe rugose virus* (ToSRV). Resultados similares fueron obtenidos por Jovel *et al.* (2004), el cual señala que las infecciones múltiples pueden persistir por largos períodos, y cita el ejemplo del mosaico de la *Sida micrantha*, asociado al complejo de dos begomovirus (*Sida micrantha mosaic virus* y *Abutilon mosaic virus*) que han coexistido por más de dos décadas en esta maleza. Infecciones de este tipo pueden facilitar la recombinación entre geminivirus y generar patologías más severas (Pita *et al.* 2001, Jovel *et al.* 2007). En el área Centroamericana, se han llevado a cabo pocos estudios sobre este tipo de infecciones, a pesar de la importancia que por si mismas ellas presentan (Rojas *et al.* 2005b).

Varios factores han incidido en la emergencia de geminivirus, incluyendo la aparición de mutantes y recombinantes, movimiento de material vegetal infectado alrededor del mundo, introducción de especies o genotipos susceptibles a virus endémicos en una región, cambios relacionados con insectos vectores, sistemas de cultivos y factores climáticos (Lett *et al.* 2009, Nawaz-ul-Rehman y Fauquet 2009, Graham *et al.* 2010).

El análisis de secuencias del Top-A, *cp* y la RHV de la maleza *S. quitoense*, indica la presencia del BGYMV (ICTV 2006a) y de *Jatropha mosaic virus* (JMV) (ICTV 2006b). Los datos obtenidos al analizar esta muestra pueden ser debidos a una recombinación, fenómeno frecuente que permite la evolución y variación viral, que está relacionada con la constante emergencia de nuevas enfermedades provocadas por diversas especies de geminivirus (Navas-Castillo *et al.* 2000, Vadivukarasi *et al.* 2007, Davino *et al.* 2009). Los virus que infectan malezas podrían contribuir a esta evolución vía recombinación con los begomovirus presentes en los cultivos (Castillo-Urquiza *et al.* 2008, Graham *et al.* 2010).

Las malezas infectadas posiblemente por el SYMMoV presentaron leve moteado amarillo y/o arrugamiento foliar, síntomas característicos de éste (Karkashian *et al.* 2002). Se encontró en la mayoría de muestras positivas para begomovirus, y en una infección mixta,

en las diferentes épocas de recolecta, lo cual demuestra su amplia adaptación a diferentes hospederos. También se ha encontrado asociado a enfermedades en cucurbitáceas, *Carica papaya* (papaya) (Karkashian *et al.* 2002), *Phaseolus vulgaris* (Ramos-Reynoso 2004) y *C. annuum* (Vargas *et al.* datos no publicados). El SYMMoV representa una amenaza fitosanitaria para varios cultivos de importancia económica a nivel nacional, puesto que se ha localizado en varios puntos del país, con una amplia distribución que incluye la totalidad de provincias de Costa Rica (Mora-Umaña *et al.* en prensa).

En esta investigación, *S. quitoense* no presentó síntomas típicos de infecciones causadas por virus, es un hospedero asintomático, razón por la cual no se reconoce en el campo; no obstante, posee importancia epidemiológica (Morris *et al.* 2006). Apablaza *et al.* (2003) menciona otros ejemplos: *Solanum gracile* asociada a la ocurrencia del *Pepper veinbanding mosaic virus*, *Solanum nigrum* hospedero asintomático del *Tobacco etch virus* (TEV) y del *Potato virus Y* (PVY); y *Asclepia syriaca*, maleza perenne portadora del *Cucumber mosaic virus* (CMV). Las plantas infectadas con virus y que no presentan sintomatología visible, podrían ser poseedoras de genes que muestren algún grado de resistencia o tolerancia a infecciones virales, mismas que eventualmente funcionarían como fuente de estudio en el mejoramiento genético de tomate y chile dulce. De acuerdo con Hanseen *et al.* (2010), la mejor estrategia de control contra una enfermedad viral es la introducción de resistencia genética en la planta hospedera. No obstante, para que esta práctica tenga éxito se debe tener suficiente información del grado de diversidad genética existente en los virus.

Los resultados anteriores indican que estas plantas son hospederos alternos de begomovirus, constituyéndose en reservorios de inóculo viral (Salati *et al.* 2002, Barbosa *et al.* 2009, Paprotka *et al.* 2010), que eventualmente podrían infectar cultivos de importancia económica como el tomate (afectado por el ToSRV y *Sida golden mosaic virus* (SiGMV)), chile dulce (ToSRV (Bezerra-Agasie *et al.* 2006) y SYMMoV), frijol (SYMMoV, BGYMV (Gálvez y Castaño 1976)), JMV (ICTVb 2006) y cucurbitáceas (SYMMoV). Por consiguiente, estrategias de manejo integrado deben considerar seriamente las poblaciones de estas malezas, que constituyen una amenaza latente para la sanidad de cultivos en

almácigos y consecuente efecto de dispersión hacia sembradíos a campo abierto y/o ambientes protegidos.

B. Detección del crinivirus ToCV.

El ToCV demuestra ser emergente para Costa Rica, por su incremento en incidencia, propagación y aumento del ámbito de hospederos, lo cual obedece a posibles cambios en el ambiente, del vector o en el genoma viral (Rojas y Gilbertson 2008, Hanseen *et al.* 2010). Su detección en invernaderos de almácigos de tomate es de suma importancia, porque este material es comercializado a agricultores que cultivan a campo abierto y en ambientes protegidos, con la consecuente propagación de este virus a nuevas áreas productoras del país. Posiblemente y debido al tamaño de las plántulas en el almácigo, éstas no presentan sintomatología visible, por lo tanto los agricultores desconocen el problema y con ello el manejo que se debe dar a éste. Este virus podría causar graves pérdidas económicas en el cultivo del tomate en Costa Rica.

Mediante el sistema de “ambientes protegidos” en Costa Rica, el tomate se siembra durante todo el año, lo que evidentemente beneficia la permanencia de inóculo viral tanto en el cultivo como en los hospederos alternos (Salati *et al.* 2002). Esto contribuye a que durante la mayor parte del año se encuentre tejido vegetal disponible como fuente de alimento para la mosca blanca, lo que favorece el incremento de los niveles poblacionales del vector (Rojas *et al.* 2005a).

Para este estudio no se realizó una determinación de la especie de mosca blanca presente en los almácigos, no obstante; podría existir resistencia por parte de éstas, al producto químico aplicado a las plántulas. Estudios recientes realizados con *Bemisia tabaci* y *Trialeurodes vaporariorum* han desarrollado resistencia a diferentes grupos de insecticidas, incluyendo los neonicotinoides (imidacloprid), compuestos ampliamente utilizados para el control de esta plaga (Gorman *et al.* 2010, Karatolos *et al.* 2010).

Aplicaciones excesivas de los insecticidas han generado problemas bien conocidos: resistencia, resurgencia, contaminación del medio ambiente, aparición de residuos en los alimentos y riesgos a la salud de los productores y consumidores (Pimentel 1986). Es necesario disminuir la dependencia de los insecticidas y realizar un verdadero Manejo Integrado de Plagas (MIP), que consiste en utilizar diversos sistemas de control para reducir las poblaciones de la plaga a niveles inferiores a aquellos que causan daño económico (com. pers. técnicos e ingenieros del MAG).

Aunque los insecticidas reducen la población de mosca blanca, este método es ineficiente frente a los virus, ya que el vector puede transmitirlo antes de ser eliminado; además, este crinivirus produce síntomas hasta 3 o 4 semanas después de que ocurre la infección y por consiguiente puede ser ampliamente diseminado por su insecto vector mientras no se observen los síntomas (Wintermantel 2004).

Un manejo primordial para limitar la dispersión, es su detección oportuna en invernaderos, plantas ornamentales y en campo abierto, donde no se sospeche su presencia. El ToCV posee un ámbito de hospedantes amplio, por lo cual, es muy importante el analizar el material a plantar en el campo definitivo, ya que una vez introducidos, los virus pueden establecerse en malezas y propagarse por medio de vectores (Navas-Castillo *et al.* 2000, Wintermantel 2004).

La forma de propagación de este virus es por medio de un insecto vector, por lo que el objetivo primordial en su manejo es minimizar las poblaciones de la mosca blanca, mediante el uso de agentes de biocontrol e insecticidas sintéticos. Entre los agentes biológicos, se menciona a la avispa parásita (*Encarsia formosa*), que controla eficientemente la población de *T. vaporariorum*, un poco menos la de *B. tabaci*; no obstante, el escarabajo predador (*Delphastus pusillus*) es efectivo contra *B. tabaci* (OEPP/EPPO 2005). Así mismo, *Eretmocerus californicus*, *Encarsia porteri* y *Chrysoperla carnea* se han distinguido entre los más importantes (Avilés-González *et al.* 2004). Actualmente, la mayoría de los métodos contra ToCV se centran en programas de manejo de la mosca blanca basados en insecticidas sintéticos; éstos, deben rotarse constantemente, para que no se genere resistencia en el insecto (Wintermantel 2004).

La forma más eficaz y económica frente a cualquier infección causada por virus fitopatógeno, es la resistencia genética; sin embargo, no se conocen cultivares de tomate que presenten ésta hacia ToCV (OEPP/EPPO 2005). García-Cano *et al.* (2010) realizaron estudios en plantas silvestres relacionadas al tomate, identifican dos fuentes de resistencia a ToCV, una procedente de un híbrido de tomate con *S. peruvianum* y otra en la especie silvestre *S. chmielewskii*. La resistencia fue expresada por una reducción de la acumulación del virus y de la expresión de síntomas de la enfermedad, tanto en infección natural, como en evaluaciones controladas.

Aún cuando el ToCV se diagnosticó por primera vez en tomate, se han detectado infecciones naturales de este crinivirus en otros cultivos, plantas ornamentales y malezas en diferentes partes del mundo. En esta investigación, fue posible informar la presencia del virus en hospederos alternos, los cuales eventualmente podrían convertirse en reservorios y medio de dispersión (Wintermantel y Wisler 2006).

La información que se genere sobre el ámbito de hospedantes es valiosa, no sólo para la caracterización de los virus, sino que tiene implicaciones significativas en la epidemiología y manejo de los mismos (Agrios 2005). Se incrementó el número de familias hospederas e incluso una muestra correspondió a una planta de cultivo, que se reporta como nuevo cultivo susceptible al ToCV (Solórzano-Morales *et al.* 2011). Se diagnosticó en dos hospederos perennes, hecho de gran relevancia epidemiológica debido a que se mantiene el inóculo constante durante todo el año.

El ámbito de hospederos y las relaciones con el vector del virus deben de ser estudiadas y entendidas para desarrollar efectivas y eficientes prácticas de manejo, dado el incremento a nivel mundial de este patógeno.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los resultados indican que se deben de intensificar las prácticas de manejo, control de los cultivos y malezas asociadas a los almácigos en estudio, con el objeto de evitar la infección y propagación del ToCV en tomate, y disminuir la posibilidad de infección de sus cultivos por begomovirus, que como consecuencia posee un efecto negativo hacia los compradores (productores a campo abierto y/o invernaderos). Para implementar un MIP, específicamente de enfermedades virales, se debe comprender ampliamente las interacciones del complejo virus-moscas blancas-cultivo, además, es necesario conocer sus reservorios, puesto que pueden intervenir en su dispersión.

Se recomienda realizar un análisis completo de los ADN-A y ADN-B, para dilucidar realmente los begomovirus que infectaron las muestras de malezas. Es importante conocer la identidad y distribución de estos virus mediante técnicas moleculares y cercanía de los virus entre sí utilizando métodos parsimónicos y de filogenia, pues permitirá identificar nuevas variedades (incluyendo más agresivas) con lo cual se puedan implementar nuevas y mejores estrategias de control.

Las malezas funcionan como hospederas alternas de virus, para que éstos sobrevivan en el tiempo. Es necesario realizar más estudios sobre la ocurrencia y variabilidad de begomovirus y crinivirus en otras plantas y el papel de éstas en la epidemiología y evolución; así como ejecutar controles más estrictos por parte de los productores y las autoridades fitosanitarias, para evitar que este problema se pueda acrecentar.

VIII- LITERATURA CITADA

- Abou-Jawdah, Y., Mohtar, C. E, Atamian, H. & Sobh, H. 2006. First report of *Tomato chlorosis virus* in Lebanon. *Plant Dis.* 90: 378.
- Accotto, G. P., Vaira, A. M. & Vecchiati, M. 2001. First report of *Tomato chlorosis virus* in Italy. *Plant Dis.* 85: 1208.
- Acuña, W. 1993. Efecto de la infección de un geminivirus sobre el rendimiento del tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) en diferentes estados de desarrollo de la planta. Tesis Lic. Agr. Turrialba. Sede Universitaria Regional del Atlántico. Universidad de Costa Rica. 73 p.
- Agrios, G. N. 2005. *Plant Pathology*. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. 922 p.
- Ala-Poikela, M., Svensson E., Rojas A., Horko T., Paulin L., Valkonen J. & Kvarnhedén A.. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathol.* 54: 448–459.
- Álvarez-Ruiz, P., Gámez-Jimenez, C., Leyva-López, N. E. & Méndez-Lozano, J. 2007. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Sinaloa, Mexico. *Plant Pathol.* 56: 1043.
- Amzallag, G. N. 2004. *Plant Response to Stress: Critical Periods in Plant Development*. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. p.p. 981-983.
- Apablaza, G., Apablaza, J., Reyes, P., & Moya, E. 2003. Determinación de virosis e insectos vectores en malezas aledañas a cultivos hortícolas. *Cien. Inv. Agr.* 30: 175-186.
- Avilés-González, M. C., Nava-Camberos, U., Garzón-Tiznado, J. A., Wong-Pérez, J. J. & Pérez-Valdez, J. J. 2004. Manejo integrado de la mosquita blanca *Bemisia* spp., en tomate para consumo fresco. Folleto Técnico No. 28. INIFAP-MÉXICO. 76 p.
- Azofeifa A. & Moreira M. 2005. Absorción y distribución de nutrientes en plantas de chile dulce (*Capsicum annuum* L. cv. UCR 589), en Alajuela, Costa Rica. *Agron. Costarric.* 29: 77-84.
- Badii, M. H. & Abreu, J. L. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience.* 1: 82-89.
- Barbosa, J. C., Teixeira, A. P. M., Moreira, A. G., Camargo, L. E. A., Filho, A. B., Kitajima, E. W. & Rezende, J. A. M. 2008. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato crops in Brazil. *Plant Dis.* 92: 1709.

- Barbosa, J. C., Barreto, S. S., Inoue-Nagata, A. K., Reis, M. S., Firmino, A. C., Filho, A. B. & Marques, J. A. 2009. Natural infection of *Nicandra physaloides* by *Tomato severe rugose virus* in Brazil. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 440-443.
- Bese, G., Bóka, K., Krizbai, L., & Takács, A. 2011. First report of *Tomato chlorosis virus* in Tomato from Hungary. *Plant Dis.* 95(3): 363.
- Bezerra-Agasie, I. C., Ferreira, G. B., de Ávila, A. C. & Inoue-Nagata, A. K.. 2006. First report of *Tomato severe rugose virus* in chili pepper in Brazil. *Plant Dis.* 90: 114.
- Bonilla, F. 1995. Periodo de adquisición, latencia y transmisión de geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) por la mosca blanca (*Bemisia tabaci* Genn.) (Homoptera, Aleyrodidae). Tesis Lic. Agr. Turrialba. Sede Universitaria Regional del Atlántico. Universidad de Costa Rica. 70 p.
- Bridson R. W., Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M., Zhou, X., & Fauquet C. M. 2008. Recommendations for the classification and nomenclature of the DNA- β satellites of begomoviruses. *Arch. Virol.* 153: 763-781.
- Carrari, F. & Fernie, A. R. 2006. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *J. Exp. Bot.* 57: 1883-1897.
- Castillo-Urquiza, G. P., Beserra, J. E., Bruckner F. P., Lima A. T., Varsani A., Alfenas-Zerbini, P., & Zerbini, M. F. 2008. Six novel begomoviruses infecting tomato and associated weeds in Southeastern Brazil. *Arch. Virol.* 153: 1985-1989.
- Castle, S., Palumbo, J. & Prabhaker, N. 2009. Newer insecticides for plant virus disease management. *Virus Res.* 141: 131-139.
- Castro, R. M., Hernandez, E., Mora, F., Ramirez, P., & Hammond, R. W. 2009. First report of *Tomato chlorosis virus* in Tomato in Costa Rica. *Plant Dis.* 93: 970.
- Chen, H., Zhang, Z., Teng, K., Lai, J., Zhang, Y., Huang, Y., Li, Y., Liang, L., Wang, Y., Chu, C., Guo, H. & Xie, Q. 2010. Up-regulation of *LSBI/GDU3* affects geminivirus infection by activating the salicylic acid pathway. *Plant J.* 62: 12-23.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. Turrialba, C.R. Serie Técnica/CATIE, No. 151. 138 p.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 1993. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de chile dulce. Turrialba, C.R. Serie Técnica/CATIE. 143 p.
- Cevik, B. & Eras, G. 2008. First report of *Tomato chlorosis virus* in Turkey. *Plant Pathol.* 57: 767.

- Cuellar, M. E. & Morales, F. J. 2006. La mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) como plaga y vectora de virus en frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Rev. Colomb. Entomol. 24: 23-28.
- Davino, S., Napoli, C., Dellacroce, C., Miozzi, L., Noris, E., Davino, M. & Accotto, G. P. 2009. Two new natural begomovirus recombinants associated with the tomato yellow leaf curl disease co-exist with parental viruses in tomato epidemics in Italy. Virus Res. 143: 15-23.
- Dalmon, A., Bouyer, S., Cailly, M., Girard, M. Lecoq, H., Desbiez, C. & Jacquemond, M. 2005. First report of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infections chlorosis virus* in Tomato Crops in France. Plant. Dis. 89: 1243.
- De La Torre-Almaráz, R., Monsalvo-Reyes, A., Romero-Rodriguez, A., Arguëllo-Astorga, G. R. & Ambriz-Granados, S. 2006. A new begomovirus inducing yellow mottle in okra crops in Mexico is related to *Sida yellow vein virus*. Plant Dis. 90: 378.
- Dellaporta, S. L., J. Woods, & J. B. Hicks. 1983. A plant minipreparations, version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.
- Delatte, H., Naze, F, Cottineau, J. S., Lefeuvre, P, Hostachy, B., Reynaud, B. & Lett, J. M. 2006. Occurrence of *Tomato chlorosis virus* on tomato in Réunion Island. Plant Pathol. 55: 289.
- Dovas, C. I., Katis, N. L. & Avgelis, A. D. 2002. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. Plant Dis. 86: 1345-1349.
- Duffus, J. 1971. Role of weeds in the incidence of virus diseases. Annu. Rev. Plant Pathol. 9: 319-340.
- Faría, A. E. & Nava, A. 2009. Detección por PCR de begomovirus en el cultivo del tomate en las áreas productoras de los Andes venezolanos. Rev. Fac. Agron. (LUZ). 26: 179-195.
- Fauquet, C. M., Briddon, R. W., Brown, J. K., Moriones, E., Stanley, J., Zerbini, M. & Zhou, X. 2008. Geminivirus strain demarcation and nomenclature. Arch. Virol. 153: 783-821.
- Gálvez, G. E. & Castaño, M. J. 1976. Purification of the whitefly-transmitted *Bean golden mosaic virus*. Turrialba 26: 205-207.
- García-Cano, E., Navas-Castillo, J., Moriones, E. & Fernández-Muñoz, R. 2010. Resistance to *Tomato chlorosis virus* in wild tomato species that impair virus accumulation and disease symptom expression. Phytopathol. 100(6): 582-592.

- Gilbertson, R. L., Hidayat, S. H., Martínez, R. T., Leong, S. A., Faria, J. C., Morales, F., & Maxwell, D. P. 1991. Differentiation of beaninfecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. *Plant Dis.* 75: 336-342.
- Geraud, F., Chirinos, D., Marín, M. & Chirinos, D. 1995. Desarrollo de la planta de tomate, *Lycopersicon esculentum*, cv. Río Grande en la zona del río Limón del Estado Zulia, Venezuela. II. Índice de crecimiento relativo, razón de peso foliar y gamma. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 12: 15-23.
- Gorman, K., Slater, R., Blande, J., Clarke, A., Wren, J., McCaffery, A. & Denholm I. 2010. Crossresistance relationships between neonicotinoids and pymetrozine in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag Sci.* 66: 1186-1190.
- Graham, A. P., Martin, D. P. & Roye, M. E. 2010. Molecular characterization and phylogeny of two begomoviruses infecting *Malvastrum americanum* in Jamaica: evidence of the contribution of inter-species recombination to the evolution of malvaceous weed-associated begomoviruses from the Northern Caribbean. *Virus Genes* 40: 256-266.
- Gutiérrez, C., Ramírez-Parra, P., Castellano, M., Sanz-Burgos, A., Luque, A. & Missich, R. 2004. Geminivirus DNA replication and cell cycle interactions. *Vet. Microbiol.* 98: 111-119.
- Haible D., Kober S. & Jeske H. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J. Virol. Methods.* 135:9-16.
- Hanafi, A. 2002. Invasive species: a real challenge to IPM in the Mediterranean region? *EWSN Newslett.* 13: 4.
- Hanley-Bowdoin, L., Settlege, S. B., Orozco, B. M., Nagar, S. & Robertson, D. 2000. Geminiviruses - models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 35: 105-140.
- Hanssen I. M., Lapidot M. & Thomma B. P. H. J. 2010. Emerging viral diseases of tomato crops. *MPMI.* 5: 539-548.
- Hilje, L. 2001. Avances hacia el manejo sostenible del complejo mosca blanca-geminivirus en tomate, en Costa Rica. *Revista MIP.* 61: 69-80.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. Fourth Edition. Academia Press. Boston, USA. 1001 p.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2006a. 29003086. *Bean golden mosaic virus*. www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm.

- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2006b. 29083021. *Jatropha mosaic virus*. www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/index.htm.
- Jiménez, U., Campos, H., Ramírez, J. V., Marín, S. Barrantes, L. & Carrillo, M. 2007. Agrocadena regional cultivo chile dulce. MAG. 76 p.
- Jovel, J., Reski, G., Rothenstein, D., Ringel, M., Frischmuth, T. & Jeske, H. 2004. *Sida micrantha* mosaic is associated with a complex infection of begomoviruses different from *Abutilon mosaic virus*. Arch. Virol. 149: 829-841.
- Jovel, J., Preiß, W. & Jeske, H. 2007. Characterization of DNA intermediates of an arising geminivirus. Virus Res. 130: 63–70.
- Karatolos, N., Denholm, I., Williamson, M., Nauen, R. & Gorman, K. 2010. Incidence and characterisation of resistance to neonicotinoid insecticides and pymetrozine in the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* Westwood (Hemiptera: Aleyrodidae). Pest Manag Sci. 66: 1304-1307.
- Karkashian, J. P., Maxwell, D. P. & Ramírez, P. 2002. *Squash yellow mottle geminivirus*: a new cucurbit-infecting geminivirus from Costa Rica. Phytopathol. 92: 125.
- Lazarowitz, S. G. 1992. Geminiviruses: Genome structure and gene function. Critic Rev. Plant Sci. 11: 327-349.
- Lett, J. M., Lefeuvre, P., Couston, L., Hoareau, M., Thierry, M., Reynaud, B., Martin, D. P. & Varsani, A. 2009. Complete genomic sequences of *Tomato yellow leaf curl Mali virus* isolates infecting tomato and pepper from the North province. Arch. Virol. 154: 535-540.
- Levi, D. & Lapidot, M. 2008. Effect of plant age at inoculation on expression of genetic resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. Arch. Virol. 153: 171-179.
- Liu, H. Y., Wisler, G. C. & Duffus, J. E. 2000. Particle lengths of whitefly-transmitted criniviruses. Plant Dis. 84: 803-805.
- López-Martínez, N. A., Torres-Pacheco, I., Guevara-González, R. G., González-Chavira, M. M., Mora-Avilés, M. A., Reynoso-Camacho, R., Garzón-Tiznado, J. A. & Rivera-Bustamante, R. 2004. Influencia de algunos factores en la interacción geminivirus-chile. First World Pepper Convention. 82-91.
- Louro, D., Accotto, g. P. & Vaira, A. M. 2000. Ocurrence and diagnosis of *Tomato chlorosis virus* in Portugal. Eur. J. Plant Pathol. 106: 589-592.
- Lozano, G.; Moriones, E. & Navas-Castillo, J. 2006. Complete nucleotide sequence of the RNA2 of the crinivirus *Tomato chlorosis virus*. Arch. Virol. 151: 581-587.

- Lozano, G., Moriones, E. & Navas-Castillo, J. 2007. Complete sequence of the RNA1 of a European isolate of *Tomato chlorosis virus*. Arch. Virol. 152: 839-841.
- MAG. 2010. Programa Nacional Sectorial de Tomate. Análisis de la situación 2009. Disponible en : www.mag.go.cr/oficinas/prog-nac-tomate.html
- Marcenaro, D. & Rayo, M. 2002. Caracterización biológica y molecular de geminivirus que afectan al cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en Nicaragua. Tesis Ing. Agr. Managua, Nicaragua. UNA. 68 p.
- Martelli, G. P., Agranovsky, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Falk, B. W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Minafra, A., Namba, S., Vetten, H. J., Wisler, G. C. & Yoshikawa, N. 2002. The family Closteroviridae revised. Arch. Virol. 147: 2039-2045.
- Martínez, A. K., Morales, F. J. & Vallejo, F. A. 2008. Caracterización molecular de un nuevo begomovirus del tomate en el Valle del Cauca y búsqueda de fuentes de resistencia para el mejoramiento de la variedad Unapal Maravilla. Acta Agron. 57: 167-173.
- Martínez, A.; Morales, F. & Vallejo C. 2009. Molecular characterization of *Begomovirus* affecting tomato in Colombia, South America, and identification of resistance sources. Acta Hort. 821: 73-80.
- Martínez-Zubiaur, Y., Fiallo-Olivé, E., Carrillo-Tripp, J. & Rivera-Bustamante, R. 2008. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting tomato in single and mixed infections with *Tomato yellow leaf curl virus* in Cuba. Plant Dis. 92: 836.
- Massé, D., Lefeuvre, P., Delatte, H., Abdoul-Karime, A. L., Hostachy, B., Reynaud, B. & Lett, J. M. 2008. *Tomato chlorosis virus*: first report in Mayotte Island. Plant Pathol. 57: 388.
- Moffat, A. S. 1999. Geminiviruses emerge as serious crop threat. Science 286: 1835.
- Monci, F., Sanchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., & Moriones, E. 2002. A natural recombinant between the geminiviruses *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Tomato yellow leaf curl virus* exhibits a novel pathogenic phenotype and is becoming prevalent in Spanish population. Virology. 303: 317-326.
- Morales, F. J. & Anderson, P. K. 2001. The emergence and dissemination of whitefly-transmitted geminiviruses in Latin America. Arch. Virol. 146: 415-441.
- Moriones, E. & Navas-Castillo, J. 2008. Review. Rapid evolution of the population of begomoviruses associated with the tomato yellow leaf curl disease after invasion of a new ecological niche. Span. J. Agric. Res. 6: 147-159.

- Morris, J., Steel, E., Smith, P., Boonham, N., Spence, N. & Barker, I. 2006. Host range studies for *Tomato chlorosis virus*, and Cucumber vein yellowing virus transmitted by *Bemisia tabaci* (Gennadius). *Eur. J. Plant Pathol.* 114: 265-273.
- Navas-Castillo, J., Camero, R., Bueno, M. & Moriones, E. 2000. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis.* 84: 835-837.
- Nawaz-ul-Rehman, M. S. & Fauquet C. M. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Lett.* 583: 1825-1832.
- Nelson, R. & Citovsky, V. 2005. Plant Viruses. Invaders of cells and pirates of cellular pathways. *Plant Physiol.* 138: 1809-1814.
- OEPP/EPPO. 2005. Data sheets on quarantine pests. *Tomato chlorosis virus*. *Bulletin OEPP/EPPO* 35: 439-441.
- Ormeño, J. & Sepúlveda, P. 2005. Presencia de diferentes virus de pimiento (*Capsicum annuum* L.) en especies de malezas asociadas al cultivo. *Agric. Téc.* 65: 343-355.
- Papayiannis, L. C., Ioannou, N., Dovas, C. I., Maliogka, V. I. & Katis, N. I. 2005. First report of *Tomato chlorosis virus* (ToCV) on tomato crops in Cyprus. *Plant Pathol.* 55: 567.
- Perea-Araujo, L. L. 2006. Diversidad genética de *Begomovirus* en cultivos de importancia agrícola en Sinaloa. Tesis de maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIR-IPN, Unidad Sinaloa. 118 p.
- Picó, B., Díez, M. J. & Nuez, F. 1999. Improved techniques for *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato breeding programs. *Plant Dis.* 83: 1006-1012.
- Pimentel, D. 1986. Population dynamics and the importance of evolution in successful biological control. pp. 3-18. In: Franz, J. M. (ed) *Biological Plant Health Protection*. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart.
- Pita, J.S., V.N. Fondong, A. Sangaré, G.W. Otim-Nape, S Ogwal & C.M. Fauquet. 2001. Recombination, pseudorecombination and synergism of geminiviruses are determinants keys to the epidemic of severe cassava mosaic disease in Uganda. *J. Gen. Virol.* 82: 655-665.
- Polston, J. & Anderson, P. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the western hemisphere. *Plant Dis.* 81: 1358-1369.
- Potter, J.L., Nakhla, M.K., Mejia, L. & Maxwell, D.P. 2003. PCR and DNA hybridization methods for specific detection of bean-infecting begomoviruses in the Americas and Caribbean. *Plant Dis.* 87: 1205-1212.

- Puertas, A., Sueiro, L., Gómez, O., Piñón, M., Guerrero, C., Blayas, R. & González, M. 2003. Comportamiento de cultivares de tomate portadores de genes de resistencia al TYLCV frente a geminivirus transmitidos por mosca blanca en condiciones de bajos insumos en la región oriental de Cuba. *Rev. Protec. Veg.* 18: 129-132.
- Ramos-Reynoso, E. D. 2004. Identificación de geminivirus que infectan frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en Nicaragua. Tesis de M.Sc. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- Ramos, P. L., Guevara-Gonzalez, R. G., Peral, R., Ascencio-Ibañez, J. T., Polston, J. E., Argüello-Astorga, G. R., Vega-Arreguín, J. C., & Rivera- Bustamante, R. F. 2003. *Tomato mottle Taino virus* pseudorecombines with PYMV but not with ToMoV: Implications for the delimitation of *cis*- and *trans*-acting replication specificity determinants. *Arch.Virol.* 148: 1697-1712.
- Rojas, M. R., Gilbertson, R. L, Russell, D. R., & Maxwell, D. P. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77: 340-347.
- Rojas, A. 2004. A complex of Begomoviruses affecting tomato crops in Nicaragua. Ph.D. Thesis, University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. 44 p.
- Rojas, M. R., Hagen, C., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. 2005a. Exploiting chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 361-394.
- Rojas, A., Kvarnaden, A., Marcenaro, D. & Valkkonen, J. P. T. 2005b. Sequence characterization of *tomato leaf curl Sinaloa virus* and *tomato severe leaf curl*: phylogeny of new world begomoviruses and detection of recombination. *Arch. Virol.* 150: 1281-1299.
- Rojas, J. & Castillo, M. 2007. Planeamiento de la agro-cadena del tomate en la región central sur de Costa Rica. MAG. Programa regional de hortalizas. 66 p.
- Rojas, M. R. & Gilbertson, R. L. 2008. Emerging plant viruses: a diversity of mechanisms and opportunities. *Plant Virus Evolution* (Roossink, M. J. ed.). Springer-Verlag. pp. 27-51.
- Rubio, L., Font, I., Jordá, C., Serra, J., Duran, N., Moreno, P. & Guerri, J. 2002. Incidencia de los virus del rizado amarillo del tomate en cultivos de tomate de la Comunidad Valenciana, España. *Bol. San. Veg. Plag.* 28: 599-607.
- Salati, R., Medhat, K. N., Rojas, M. R., Guzman, P., Jaquez, J., Maxwell, D. P. & Gilbertson, R. L. 2002. *Tomato yellow leaf curl virus* in the Dominican Republic: characterization of fan infectious clone, virus monitoring in whiteflies, and identification of reservoir host. *Phytopathol.* 92: 487-496.

- Segev, L., Wintermantel, W. M. & Lapidot, M. 2004. First report of *Tomato chlorosis virus* in Israel. *Plant Dis.* 88: 1160.
- Simone, G. W., Hochmuth, R. C., Wisler, G. C., Duffus, J. E., Liu, H.-Y. & Li, R. H. 1996. A new whitefly-vectored closterovirus of tomato in Florida. Pages 71-74 in: *Tomato Inst. Proc.* C. S. Vavrina, ed. Hart Science Department, IFAS, University of Florida, Gainesville.
- Solórzano-Morales A., N. Barboza, E. Hernández, F. Mora-Umaña, P. Ramírez and R. W. Hammond. 2011. Newly discovered natural hosts of *Tomato chlorosis virus* in Costa Rica. *Plant Dis.* 95(4): 497.
- Stenger, D. C., Duffus, J. E. & Villalon, B. 1990. Biological and genomic properties of a geminivirus isolated from pepper. *Phytopathol.* 80: 704-709.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology* Fourth Edition. Sinauer Associates. 764 p.
- Trenado, H. P., Fortes, I. M., Louro, D. & Navas-Castillo, J. 2007. *Physalis ixocarpa* and *P. peruviana*, new natural hosts of *Tomato chlorosis virus*. *Eur. J. Plant Pathol.* 118: 193-196.
- Tsai, W. S., Shih, S. L., Green, S. K. & Hanson, P. 2004. First report of the occurrence of *Tomato chlorosis virus* and *Tomato infectious chlorosis virus* in Taiwan. *Plant Dis.* 88: 311.
- Vadivukarasi, T., Girish, K. R., & Usha, R. 2007. Sequence and recombination analysis of the geminivirus replication initiator protein. *J. Biosci.* 32:1, 7-29.
- Walker, J. & E. Gingold. 1997. *Biología Molecular y Biotecnología*; 2ª. ed., Editorial ACRIBIA, S. A., Zaragoza, España. 475p.
- Wintermantel, W. M., Polston, J. E., Escudero, J. & Paoli, E. R. 2001. First report of *Tomato chlorosis virus* in Puerto Rico. *Plant Dis.* 85: 228.
- Wintermantel, W. M. 2004. Emergence of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) transmitted Criniviruses as threats to vegetable and fruit production in North America. APSnet. <http://www.apsnet.org/online/feature/whitefly/whitefly.pdf>
- Wintermantel, W. M.; Wisler, G. C.; Anchieta, A. G.; Liu, H. Y.; Karasev, A. V. & Tzanetakis, I. E. 2005. The complete nucleotide sequence and genome organization of *Tomato chlorosis virus*. *Arch. Virol.* 150: 2287-2298.
- Wintermantel, W. M. & Wisler, G. C. 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis.* 90: 814-819.

- Wisler, G. C., Duffus, J. E. & Liu, H.-L. 1999. Expansion of tomato-infecting criniviruses into new areas. In: Plant Virus Epidemiology: Current Status and Future Prospects. Abstracts VII Int. Plant Virus Epidemiology Symp. Almeria, Spain. 70p.
- Wisler, G. C. & Cortez, A. A. 2001. Differential transmission characteristics among four whitefly vectors of *Tomato chlorosis crinivirus*. In: USDA Whitefly Abstracts 2000-01. Section B: Virus, Epidemiology, & Virus-Vector Interaction-2000.
<http://ag.arizona.edu/crops/cotton/insects/wf/abstracts/usdabstrOO/usdabstOOB Jitml>
- Wyatt, S. D. & Brown, J. D. 1996. Detection of subgroup III geminiviruses isolates in leaf extracts by degenerate initiators and polymerase chain reaction. *Phytopathol.* 86: 1288-1293.
- Yang, C. X., Cui, G. J., Zhang, J., Weng, X. F., Xie, L. H. & Wu, Z. J. 2008. Molecular characterization of a distinct begomovirus species isolated from *Emilia sonchifolia*. *J. Plant Pathol.* 90: 475-478.
- Zúñiga, C. & Ramírez, P. 2003. Aportes al conocimiento del manejo del complejo mosca blanca-geminivirus en Costa Rica. *Revista MIP.* 68: 77-84.