

Detección de crinivirus y begomovirus en plántulas de tomate y arvenses asociadas a semilleros¹

Crinivirus and begomovirus detection in tomato plantlets and weeds associated to nurseries

Ántony Solórzano-Morales², Ruth Castro-Vásquez², Natalia Barboza-Vargas³, Eduardo Hernández-Jiménez⁴, Rosemarie W. Hammond⁵, Pilar Ramírez-Fonseca²

Resumen

El objetivo de este trabajo fue detectar infecciones causadas por el *Tomato chlorosis virus* (ToCV) y begomovirus en plántulas de tomate, y en las arvenses de los alrededores de los invernaderos. En el período de un año, a partir de abril de 2008, se recolectaron 168 muestras de tejido foliar, 90 de plántulas de tomate y 78 de arvenses en tres distintos semilleros en la provincia de Cartago, Costa Rica. Por medio de una transcripción reversa ligada a una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), se determinaron infecciones con ToCV en un 18,9% de plántulas de tomate y en un 7,7% de las arvenses. Los begomovirus se detectaron por medio de hibridación con sonda de ADN no radioactiva. Los resultados de hibridación se confirmaron con una amplificación por el círculo rodante (RCA), seguida de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando dos pares de iniciadores degenerados. Ninguna muestra de tomate resultó positiva para los virus estudiados, mientras que seis arvenses estaban infectadas; dos de ellas *Phytolacca icosandra* y *Brassica* sp., mostraron coinfección con el ToCV. Los resultados sugieren que si las plántulas de tomate infectadas con ToCV se comercializan, este podría ser introducido en otras regiones del país. Las arvenses alrededor de los invernaderos mostraron ser potenciales fuentes de inóculo tanto del ToCV como de begomovirus.

Palabras claves: *Tomato chlorosis virus* (ToCV), geminivirus, *Solanum lycopersicum*, moscas blancas.

Abstract

The aim of this work was to detect plant infections caused by *Tomato chlorosis virus* (ToCV) and begomovirus in tomato plantlets, and in growing weeds around nursery greenhouses. During one year, starting in April 2008, 168 leaf tissue samples were collected, 90 tomato plantlets and 78 weeds from three different nurseries in Cartago province, Costa Rica. Reverse transcription and real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to determine that 18,9% of tomato plantlets and 7,7% of weeds were infected with ToCV virus. Begomoviruses were detected using

¹ Recibido: 22 de agosto, 2016. Aceptado: 23 de noviembre, 2016. Este trabajo formó parte de la tesis de licenciatura de Ántony Solórzano Morales, realizada en el marco del proyecto VI-801-B1-650 inscrito en Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (UCR), San José, Costa Rica.

² Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Apdo. postal 11501-2060, San José, Costa Rica. antonyms_7@yahoo.es, bioruthi@gmail.com, pramirez99@hotmail.com

³ Universidad de Costa Rica, Escuela de Tecnología de Alimentos y Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Apdo. postal 11501-2060, San José, Costa Rica. natalia.barboza@ucr.ac.cr

⁴ Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular. Apdo. postal 11501-2060, San José, Costa Rica. eduardo.hernandez@ucr.ac.cr

⁵ Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, USDA-ARS. Apdo. postal MD20705, Beltsville, EUA. rose.hammond@ars.usda.gov



Dot Blot hybridization and non-radioactive probe. Next, hybridization results were confirmed using Rolling Circle Amplification (RCA) followed by PCR, using universal primers. None tomato plantlet resulted positive when tested, but there were six weeds infected; in fact, *Phytolacca icosandra* and *Brassica* sp. were both coinfecting with ToCV virus. These results suggest that ToCV infected tomato plantlets when commercialized, could serve as way of virus introduction to other country regions. Finally, weeds growing around greenhouses have shown to be potential viral sources of ToCV and begomovirus.

Keywords: *Tomato chlorosis virus* (ToCV), geminivirus, *Solanum lycopersicum*, whiteflies.

Introducción

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo de alto valor económico para productores, y nutricional para consumidores, en muchos países del mundo. Es afectado por varias plagas de origen entomológico, entre las que se destacan las moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae), debido a su capacidad de transmitir virus (Navas-Castillo et al., 2011; 2014). Las infecciones de los virus que transmiten las moscas blancas pueden llegar a provocar daños fisiológicos severos, especialmente si ocurren en las primeras semanas del desarrollo de una planta (periodo crítico) (Schuster et al., 1996). Es por esto, que realizar diagnósticos tempranos puede reducir su transmisión dentro de la plantación (Hilje y Stansly, 2008) y su dispersión a otras regiones (Tzanetakis et al., 2013).

El virus del amarillamiento del tomate (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) del género *Crinivirus* (familia *Closteroviridae*), es uno de los virus emergentes de mayor impacto en la producción mundial de tomate (Fortes et al., 2012). Los crinivirus poseen un genoma bipartito de ARN monocatenario sentido positivo (Liu et al., 2000). Fue descrito por primera vez en Estados Unidos (Wisler et al., 1998), pero hoy en día está presente en Europa, Medio Oriente, África, el Sureste de Asia y América Latina (Navas-Castillo et al., 2011), incluyendo Costa Rica (Castro et al., 2009). Se distingue de otros crinivirus, porque es transmitido por diferentes especies de moscas blancas, tales como *Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* (anteriormente MED o biotipo Q), *B. argentifolii* (anteriormente MEAM1 o biotipo B) y *B. inconspicua* (anteriormente NW o biotipo A) (Navas-Castillo et al., 2000; Wintermantel y Wisler, 2006; Boykin, 2014; Polston et al., 2014).

El tomate también es hospedero natural de los begomovirus (familia *Geminiviridae*), los cuales son transmitidos por la mayoría de las especies que se incluyen dentro del complejo de *B. tabaci* (Rojas y Gilbertson, 2008; Boykin, 2014; Polston et al., 2014). La mayoría de los begomovirus tienen genomas bipartitos (componentes A y B) de ADN circular y simple banda (ADNsb), pero dentro del género existen especies monopartitas (Rojas et al., 2005). En Costa Rica, los begomovirus que infectan el tomate son el virus del enrollamiento de la hoja de tomate de Sinaloa (*Tomato leaf curl Sinaloa virus*, ToLCSinV) (Nakhla et al., 1994; Idris et al., 1999); el virus del moteado amarillo del tomate (*Tomato yellow mottle virus*, TYMoV) (Hilje et al., 1993; Nakhla et al., 1994; Polston y Anderson, 1997) y el virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) (Barboza et al., 2014). Este último es el único representante monopartita reportado para el país, y es considerado de alto riesgo, pues entre otros síntomas, puede provocar aborto foliar (Moriones y Navas-Castillo, 2010).

En Costa Rica en los últimos años no hay estudios de las pérdidas económicas en la producción de tomate atribuidas a estos virus, sin embargo, puede presentarse una disminución severa en la producción si las infecciones virales ocurren a nivel de plántulas antes de su venta y distribución a diferentes regiones del país. El objetivo de este trabajo fue detectar infecciones causadas por el ToCV y por begomovirus en plántulas de tomate, y en las arvenses ubicadas en los alrededores de los invernaderos.

Materiales y métodos

En abril de 2008, se recolectó tejido foliar de quince plántulas de tomate (35-45 días de desarrollo), seleccionadas al azar de una bandeja con 96 compartimentos, la cual fue tratada cada doce días con el insecticida imidacloprid (500 g/ha); otras quince plántulas de tomate se tomaron de una bandeja sin este tratamiento. Lo anterior se realizó para plántulas ubicadas en tres invernaderos que se nombraron A, B y C en distintas zonas geográficas de la región de Cartago, Costa Rica, a altitudes de 1281, 1361 y 1609 msnm, respectivamente. Las condiciones estructurales entre los invernaderos B y C, comparados con A, eran muy diferentes. Por ejemplo, en los primeros no se contaba con doble puerta y se pudo observar la presencia de defectos en el cerramiento del plástico, tanto del techo como de las paredes y a alturas variables.

En cada uno de los invernaderos se realizó la recolecta de arvenses, en octubre de 2008 y en abril de 2009, que corresponden respectivamente con la época lluviosa y la época seca, respectivamente. Las arvenses se seleccionaron con base en la presencia de mosca blanca o síntomas asociados a infecciones con ToCV (Wisler et al., 1998) o con begomovirus (Rojas et al., 2005). Estas plantas se incluyeron en el estudio para analizar su potencial como hospedantes alternos.

En total se colectaron 90 muestras de tejido foliar de tomate y 78 de arvenses, las cuales se liofilizaron y almacenaron a -70 °C para su posterior análisis. La totalidad de las muestras de arvenses se identificaron a nivel de género y en algunos casos a especie.

Detección del virus de la clorosis del tomate

Se extrajo el ARN total de las muestras de tomate y arvenses recolectadas, para esto se empleó el protocolo de extracción de tiocianato de guanidina-fenol-cloroformo, según las indicaciones del fabricante. Con el ARN extraído se realizó una transcripción reversa ligada a una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, utilizando el kit Qtaq One-Step qRT-PCR SYBR, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se utilizaron los iniciadores previamente descritos por Wintermantel et al. (2008), diseñados para amplificar un fragmento del gen que codifica por el homólogo de la proteína de choque térmico 70 (HSP70h) del crinivirus ToCV. Los iniciadores utilizados correspondieron a TocQ 875F 5'-AACCATTCGCTAGACGCAGTT-3' y TocQ 998R 5'-TCTGCTCTATTCTGAATCGGTCTAA-3' a la concentración final de 0,2 μ M. Se utilizaron aproximadamente 500 ng de ARN total. El C_t (ciclos críticos o "cycle threshold") fue determinado con el software Multiplex Quantitative PCR Systems (MxPro-3000P, Stratagene). Luego de la amplificación se elaboraron las curvas de disociación.

Detección de begomovirus

Los ácidos nucleicos totales de las muestras de tomate y arvenses se extrajeron según el protocolo descrito por Dellaporta et al. (1983), con las modificaciones detalladas por Hernández et al. (2012). La presencia de begomovirus fue evaluada inicialmente utilizando la técnica de hibridación molecular por dot blot según lo detallan Hernández et al. (2012).

Con la finalidad de aumentar la sensibilidad de los análisis posteriores, las muestras positivas por hibridación se sometieron a la técnica de amplificación por el círculo rodante (RCA) (Haible et al., 2006), con el empleo de Illustra TempliPhi Amplification Kit (Amersham Biosciences, UK) y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. A partir de los productos de RCA se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final con dos diferentes pares de iniciadores: el primer par PAR1c715 y PAL1v1978 permitieron amplificar una región de aproximadamente 1,4 kb de la parte superior del componente A (Top-A) del genoma del virus (Rojas et

al., 1993), y los iniciadores PAV494 y PAC1048 que amplificaron la región más conservada del gen que codifica la proteína de cubierta (gen *cp*) (Wyatt y Brown, 1996). Las reacciones de PCR se realizaron según las condiciones descritas por Hernández et al. (2012).

Análisis de datos

Utilizando los resultados obtenidos de los análisis de detección, se realizó un cuadro de contingencia, con la intención de registrar y analizar la asociación entre las variables. Se contabilizó el número total de muestras positivas de plántulas de tomate y arvenses de acuerdo con el tratamiento (con o sin insecticida), y se compararon contra el total de muestras. Estos datos fueron analizados con base en la prueba de Fisher (GraphPad Software, Inc.) para determinar la existencia de diferencias significativas entre ambos ensayos.

Resultados y discusión

En las plántulas de tomate se encontraron muestras infectadas con el ToCV solamente en los invernaderos B y C. La infección ocurrió en ambos sitios independientemente de la aplicación o no de insecticida a las bandejas. Los porcentajes de infección totales por invernadero y por tratamiento fueron menores a 25%; sin embargo, de forma individual, en algunos invernaderos el porcentaje fue mayor al 30% (Cuadro 1). Cuando se realizó la prueba de Fisher, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,5$) entre los tratamientos.

Cuadro 1. Número de muestras de tomate de tres invernaderos (A, B y C) ubicados en distintas zonas geográficas de la región de Cartago, Costa Rica, a altitudes de 1281 (A), 1361 (B) y 1609 msnm (C), infectadas con el virus de la clorosis del tomate (ToCV), y distribución porcentual (%) con respecto al total durante 2008-2009.

Table 1. Number of tomato samples, taken from three different nurseries (A, B and C) located in different geographical regions in Cartago, Costa Rica, at altitudes of 1281 (A), 1361 (B) and 1609 (C) masl, infected with tomato chlorosis virus (ToCV) compared to the total and its corresponding percentage (%) during 2008-2009.

Tratamientos	Invernadero		
	A	B	C
Con insecticida	0/15 (0,0)	7/15 (46,7)	3/15 (20,0)
Sin insecticida	0/15 (0,0)	2/15 (13,3)	5/15 (33,3)
Total por invernadero	0/30 (0,0)	9/30 (30,0)	8/30 (26,7)

No se detectaron plántulas de tomate infectadas por begomovirus mediante los análisis de hibridación molecular. Para descartar la posibilidad de falsos negativos, las muestras se examinaron también mediante preamplificación por RCA y posterior PCR con iniciadores degenerados del gen *cp* (Wyatt y Brown, 1996) y ninguna muestra amplificó. Plántulas de chile dulce fueron analizadas para estos virus, mediante la misma técnica, y los resultados fueron negativos (los datos no se muestran).

Los porcentajes de infección del ToCV fueron similares a los reportados en invernaderos por productores de tomate en otros países como: Líbano, Grecia y España (Abou-Jawdah et al., 2006; Fortes et al., 2012; Orfanidou et al., 2013), pero el número de muestras infectadas por este crinivirus puede aumentar dependiendo de la especie

de mosca blanca presente y la carga viral inoculada (Navas-Castillo et al., 2000; Dovas et al., 2002). Según Wintermantel y Wisler (2006), el ToCV es transmitido de forma eficiente por *T. abutilonea* y *B. argentifolii*, las cuales retienen el virus por cinco y cuatro días, respectivamente. Mientras que cuando *T. vaporariorum* es el vector, su capacidad de transmisión dura solamente un día.

Tanto *B. tabaci*, *B. argentifolii* y *T. vaporariorum* han sido reportadas en Costa Rica (Hilje et al., 1993; Guevara-Coto et al. 2011). Sin embargo, un estudio iniciado en 2008 en la región de Cartago, concluyó que la especie *T. vaporariorum* predomina en los invernaderos que cultivan tomate y chile dulce (Vargas-Asencio et al., 2013); estos ambientes protegidos parecen ser propicios para el desarrollo de esta mosca blanca (Wintermantel, 2004; 2010). De este modo, si *T. vaporariorum* es el vector principal en los invernaderos estudiados, eso explicaría la baja incidencia del ToCV y la ausencia de begomovirus en las plántulas analizadas.

En ocasiones, otros factores pueden alterar la cantidad de moscas blancas y la incidencia de los virus que transmiten, entre ellos, las prácticas de manejo utilizadas (Hilje y Stansly, 2002; Kakati y Nath, 2014) y las condiciones estructurales de los invernaderos (Mears y Both, 2000). Tal es el caso del invernadero A, donde no se detectaron infecciones virales y cuya estructura incluía características ideales (malla de tamaño 50-mesh, buena aireación, doble puerta y un techo sin perforaciones) para evitar la entrada de moscas blancas (Hilje y Morales, 2008). No obstante, en todos los invernaderos (incluyendo el A) se realizaba una práctica conocida como “endurecimiento”, que consiste en una aclimatación de las plántulas a condiciones similares a las del campo, colocándolas fuera del semillero cuando estas tienen entre 45 y 50 días de germinadas. El problema de esta práctica es la exposición innecesaria de las plántulas a moscas potencialmente virulíferas, y el riesgo de un ingreso accidental de los insectos a la estructura. Además, los daños fisiológicos que ocurren debido a infecciones virales tempranas podrían afectar el crecimiento e incluso propiciar una muerte acelerada de la planta (Schuster et al., 1996).

La presencia del ToCV en las plántulas podría representar un riesgo para la producción de tomate del país, debido a que los síntomas de infección se expresan de tres a cuatro semanas luego de la inoculación inicial (Wintermantel y Wisler, 2006), por lo que, muchas de ellas se llegan a comercializar estando infectadas pero sin tener síntomas visibles. De manera que, al pasar desapercibidas estas plántulas podrían facilitar la diseminación del ToCV a otras regiones del país. Es por esto que mantener las plantas libres de virus durante el periodo crítico del desarrollo debe ser prioridad, en especial en este tipo de invernaderos donde hay material vegetal disponible, para que potencialmente el inóculo viral persista a lo largo del año (Hilje y Stansly, 2008).

Con respecto a los tratamientos con insecticida aplicados en los ensayos, se pretendía determinar si habría una diferencia en el número de plántulas infectadas asumiendo que los tratamientos podrían reducir la cantidad de vectores. Sin embargo, las infecciones virales detectadas ocurrieron tanto en las plántulas que recibieron el tratamiento químico como en las que no. La aplicación de insecticidas sigue siendo una herramienta muy utilizada (Perring et al., 1999) y en algunos casos la única forma de manejo. La literatura señala que las aplicaciones frecuentes y prolongadas de imidacloprid promueven la aparición de individuos resistentes tanto de *B. tabaci* y *B. argentifolii* (Elbert y Nauen, 2000; Li et al., 2001, Nauen et al., 2002), como de *T. vaporariorum* (Gorman et al., 2007), lo que prueba que un único método de control puede ser evadido de muchas maneras, por lo que para un manejo eficaz puede ser necesario implementar varias estrategias a la vez (Gilbertson et al., 2011).

Seis muestras de las 78 arvenses examinadas, estaban infectadas con ToCV, lo que representa un 7,7% del total. En el invernadero A, la especie *Plantago major* (Plantaginaceae) fue la única positiva. Mientras que en el invernadero B, tres muestras resultaron infectadas, estas correspondieron a *Ruta chapelensis* (Rutaceae), *Phytolacca icosandra* (Phytolacaceae) y *Cucurbita moschata* (Cucurbitaceae), que crecía como planta voluntaria. Para el invernadero C, se identificaron dos plantas del género *Brassica* (Brassicaceae) positivas para el crinivirus. Además, se identificaron muestras de arvenses positivas para begomovirus con la técnica de hibridación molecular. Estos resultados se confirmaron por medio de RCA y PCR con dos pares de iniciadores degenerados. Excepto por una muestra de *Phaseolus* sp, todas las muestras amplificaron con ambos iniciadores (Cuadro 2).

Cuadro 2. Detección del virus de la clorosis del tomate (ToCV) y begomovirus en especies de arvenses colectadas en los alrededores de tres invernaderos (A, B y C) ubicados en distintas zonas geográficas de la región de Cartago, Costa Rica, a altitudes de 1281 (A), 1361 (B) y 1609 msnm (C), durante el 2008-2009.

Table 2. Tomato chlorosis virus (ToCV) and begomovirus detection in weeds species collected at three nurseries surroundings (A, B and C), located in different geographical regions in Cartago, Costa Rica, at altitudes of 1281 (A), 1361 (B) and 1609 (C) masl, during 2008-2009.

Invernadero	Arvense	Época de recolecta	ToCV	Begomovirus	
				gen CP*	Top-A**
A	<i>Solanum quitoense</i>	Lluviosa	-	+	+
	<i>Plantago major</i>	Seca	+	-	-
B	<i>Phytolacca icosandra</i>	Lluviosa	+	+	+
	<i>Phaseolus</i> sp.	Lluviosa	-	+	+
	<i>Phaseolus</i> sp.	Seca	-	+	+
	<i>Phaseolus</i> sp.	Seca	-	+	NA
	<i>Ruta chapelensis</i>	Lluviosa	+	-	-
C	<i>Cucurbita moschata</i>	Lluviosa	+	-	-
	<i>Brassica</i> sp.	Seca	+	-	-
	<i>Brassica</i> sp.	Seca	+	+	+
	<i>Brassica</i> sp.	Seca	+	+	+

NA: no amplificó / NA: no amplification.

*CP: proteína de la capsida / *CP: capsid protein.

**Top-A: región que comprende las secuencias que codifican para la proteína de replicación (Rep), la región común y CP / **Top-A: Region comprising the sequences encoding the replication protein (Rep), the common region and CP.

Dos de las seis arvenses positivas para begomovirus, también estaban infectadas con el ToCV (Cuadro 2). En total, se han encontrado catorce especies de plantas distribuidas en nueve familias, susceptibles a infecciones del ToCV en Costa Rica; convirtiéndolo en el crinivirus con mayor amplitud de hospedantes del país (Cuadro 3).

En cuanto a los begomovirus, ya se han reportado once especies virales distintas en el país, una de ellas, el virus del enrollamiento de la hoja del camote (*Sweet potato leaf curl virus*, SPLCV) el cual fue detectado solamente por hibridación molecular (Valverde y Moreira, 2004). La mayoría de estos virus se han identificado en una sola especie de planta, un hecho que no les resta importancia y deben ser vigilados para evitar futuras epidemias. No obstante, el número de hospedantes del virus del mosaico dorado del chile (*Pepper golden mosaic virus*, PepGMV) parece ir en aumento, al igual que el del MCLCuV-CR, ambos capaces de infectar cuatro o más hospedantes diferentes (Cuadro 3).

Las infecciones por begomovirus detectadas en las arvenses son evidencia de que *Bemisia* está presente en el agroecosistema. No obstante, se desconoce la especie de *Bemisia* que se haya establecido en las cercanías de los invernaderos, los niveles poblacionales a lo largo del año y su comportamiento de selección hacia los hospedantes disponibles. Algunos factores como el clima o las características de las hojas podrían influenciar la colonización preferencial de estos insectos por ciertas plantas. En ocasiones, el número de moscas blancas tiende a disminuir durante la época lluviosa por la reducción de la temperatura y el daño mecánico de las precipitaciones sobre las plantas (Hilje y Morales, 2008). Además, varios autores afirman que las hojas jóvenes, con gran vellosidad, presencia de glándulas y gran densidad de venas vasculares (Janssen et al., 1989; Lei et al., 1998; Chu et al., 2000), son

Cuadro 3. Familias y especies de cultivos y arvenses que se han determinado como hospedantes naturales de crinivirus y begomovirus en Costa Rica.

Table 3. Families and species for crops and weeds determined as natural host for crinivirus and begomovirus in Costa Rica.

Familia	Especie	Acrónimo		Referencia
		Crinivirus	Begomovirus	
Amaranthaceae	<i>Amaranthus scariosus</i>	ToCV	-	Vargas-Asencio et al., 2013
	<i>Iresine diffusa</i>	ToCV	-	Vargas-Asencio et al., 2013
Asteraceae	<i>Crassocephalum crepidioides</i>	ToCV	-	Vargas-Asencio et al., 2013
	<i>Bidens pilosa</i>	ToCV	-	Vargas-Asencio et al., 2013
Brassicaceae	<i>Brassica</i> sp.	ToCV	MCLCuV-CR	Solórzano-Morales et al., 2011
Caricaceae	<i>Carica papaya</i>	-	MCLCuV-CR	Karkashian et al., 2002
Convulvulaceae	<i>Ipomoea batatas</i>	SPCSV	SPLCV	Valverde y Moreira, 2004
Cucurbitaceae	<i>Cucurbita moschata</i>	BPYV	MCLCuV-CR	Karkashian et al., 2002; Ramírez et al., 2008
	<i>Cucurbita pepo</i>	BPYV	MCLCuV-CR, PepGMV	Ramírez et al., 2008; Castro et al., 2013
	<i>Sechium edule</i>	-	PepGMV	Castro et al., 2013
	<i>Citrullus lanatus</i>	-	MCLCuV-CR	Karkashian et al., 2002
Euphorbiaceae	<i>Euphorbia heterophylla</i>	-	EuMV	Kim y Flores, 1979
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgaris</i>		BGMV, BGYMV, CalGMV	Gámez, 1971; Hilje et al., 1993; Díaz et al. 2002; Morales, 2010
	<i>Phaseolus</i> sp.	ToCV	-	Solórzano-Morales et al., 2011
	<i>Erythrina</i> sp.	-	PepGMV	Castro et al., 2013
Malvaceae	<i>Sida rhombifolia</i>	-	SiGMCRV	Höfer et al., 1997
Phytolacaceae	<i>Phytolacca icosandra</i>	ToCV	MCLCuV-CR	Solórzano-Morales et al., 2011
Plantaginaceae	<i>Plantago major</i>	ToCV	-	Solórzano-Morales et al., 2011
Rutaceae	<i>Ruta chalepensis</i>	ToCV	-	Solórzano-Morales et al., 2011
Solanaceae	<i>Solanum lycopersicum</i>	ToCV	MCLCuV-CR, TYMoV, ToLCSinV, TYLCV	Castro et al., 2009; 2013; Nakhla et al., 1994; 2005; Barboza et al., 2014
	<i>Solanum americanum</i>	ToCV	-	Vargas-Asencio et al., 2013
	<i>Solanum quitoense</i>	ToCV	-	Vargas-Asencio et al., 2013
	<i>Solanum nigrum</i>	ToCV	-	Vargas-Asencio et al., 2013
	<i>Capsicum annum</i>	ToCV	MCLCuV-CR, PepGMV	Lotrakul et al., 2000; Vargas et al., 2011

ToCV: virus de la clorosis del tomate, MCLCuV-CR: virus de la clorosis y del enrollamiento de la hoja de melón-Costa Rica, SPCSV: virus del trastorno clorótico-enano del camote, SPLCV: virus del enrollamiento de la hoja del camote, BPYV: virus del amarillamiento falso de la remolacha, PepGMV: virus del mosaico dorado del chile, EuMV: virus del mosaico de la *Euphorbia*, BGMV: virus del mosaico dorado del frijol, BGYMV: virus del mosaico dorado amarillo del frijol, CalGMV: virus del mosaico dorado del *Calopogonium*; SiGMCRV: virus de Costa Rica del mosaico dorado de la *Sida*, TYMoV: virus del moteado amarillo del tomate, ToLCSinV: virus del enrollamiento de la hoja de tomate de Sinaloa, TYLCV: virus del amarillamiento y enrollamiento de la hoja de tomate / ToCV: tomato chlorosis virus, MCLCuV-CR: melon chlorotic leaf curl virus-Costa Rica, SPCSV: sweet potato chlorotic stunt virus, SPLCV: sweet potato leaf curl virus, BPYV: beet pseudo-yellows virus, PepGMV: pepper golden mosaic virus, EuMV: *Euphorbia* mosaic virus, BGMV: bean golden mosaic virus, BGYMV: bean golden yellow mosaic virus, CalGMV: *Calopogonium* golden mosaic virus, SiGMCRV: sida golden mosaic Costa Rica virus, TYMoV: tomato yellow mottle virus, ToLCSinV: tomato leaf curl Sinaloa virus, TYLCV: tomato yellow leaf curl virus.

preferidas por estos insectos para establecerse. De modo que, faltan estudios para concluir sobre los motivos por los cuales este vector transmitió begomovirus en las arvenses y no en las plántulas.

Desde el punto de vista epidemiológico, las arvenses infectadas por ToCV o begomovirus representan potenciales hospedantes alternos de estos virus. Se destacan aquellas plantas con hábito de crecimiento perenne (*S. quitoense* y *P. icosandra*) que pueden ser reservorios de inóculo viral a lo largo del año (Jovel et al., 2007). Los hospedantes alternos son particularmente importantes para el insecto en ausencia de los cultivos (Norris y Kogan, 2005) y también para los crinivirus y begomovirus, pues no se replican dentro del vector (Acotto y Sardo, 2010). En Costa Rica, durante décadas, los begomovirus identificados se establecían en los cultivos y las arvenses no tenían un papel relevante para los investigadores (Hilje et al., 2001). En la actualidad, esa idea ha cambiado y ahora se reconoce que estas plantas podrían funcionar como puentes entre los virus, el vector y los cultivos cercanos (Solórzano-Morales et al., 2011; Castro et al., 2013; Vargas-Asencio et al., 2013).

Otro aspecto relevante, es la oportunidad de emergencia de nuevas especies virales y de enfermedades distintas debido a las coinfecciones, es decir, por la presencia de dos o más virus en una misma planta. Infecciones mixtas entre el ToCV y begomovirus detectadas en cultivos de tomate, con frecuencia provocan daños más severos y por ende mayores pérdidas en la producción (Martínez-Zubiar et al., 2008; Velasco et al., 2008). De la misma forma, diferentes especies de begomovirus se han encontrado infectando la misma planta, debido a hospedantes en común (Ala-Poikela et al., 2005; García-Andrés et al., 2007). Esta convergencia puede promover la variación genética y biológica de las especies preexistentes, a través de la aparición de mutantes, recombinantes y pseudorecombinantes (Seal et al., 2006; Jones, 2009; Nawaz-ul-Rehman y Fauquet, 2009).

Conclusiones

Este trabajo es el primero en detectar e informar la presencia del ToCV a nivel de plántulas de tomate en Costa Rica y no hay evidencia todavía de infecciones por begomovirus. Es importante resaltar que las plántulas infectadas, que son asintomáticas, podrían ser comercializadas fuera de la región de Cartago, favoreciendo la diseminación del ToCV al resto del país. Además, dado que las infecciones detectadas ocurren en el período crítico, la probabilidad de que desarrollen problemas fisiológicos es mayor, representando pérdidas económicas para el productor de tomate.

Los resultados sugieren que las arvenses podrían estar actuando como reservorio del ToCV, begomovirus e incluso de coinfecciones entre ambos. Ante esto, la práctica de aclimatación es riesgosa, ya que las plántulas sanas pueden infectarse de cualquiera de los virus detectados en las arvenses cercanas a los semilleros. Todavía se requiere mayor investigación sobre el papel que cumplen las arvenses alrededor de estos invernaderos, pero es claro que no se pueden ignorar y es necesario aplicar prácticas de control.

Un estudio adicional de las especies de mosca blanca presentes en el agroecosistema resultaría muy provechoso, ya que esto contribuirá a monitorear la evolución de los virus que transmiten y establecer estrategias de prevención ante potenciales especies virales emergentes.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Acción Social (VAS) de la Universidad de Costa Rica y al Consejo Nacional de Rectores (CONARE) por el financiamiento de esta investigación. A los productores de plántulas de tomate y chile dulce de la región de Cartago que nos permitieron el acceso a los invernaderos y donaron las bandejas con las muestras recolectadas.

Literatura citada

- Abou-Jawdah, Y., C. El Mohtar, H. Atamian, and H. Sobh. 2006. First report of *Tomato chlorosis virus* in Lebanon. *Plant Dis.* 90:378.
- Acotto, G.P., and L. Sardo. 2010. Tomato yellow leaf curl disease epidemics. In: P.A. Stanley, y S.E. Naranjo, editors, *Bemisia: Bionomics and management of a global pest*. Springer, HOL. p. 339-345.
- Ala-Poikela, M., E. Svensson, A. Rojas, T. Horko, L. Paulin, and J.P. Valkonen. 2005. Genetic diversity and mixed infections of begomoviruses infecting tomato, pepper and cucurbit crops in Nicaragua. *Plant Pathol.* 54:448-459.
- Barboza, N., M. Blanco-Meneses, M. Hallwass, E. Moriones, and A. Inoue-Nagata. 2014. First report of *Tomato yellow leaf curl virus* in tomato in Costa Rica. *Plant Dis.* 98:699.
- Boykin, L.M. 2014. *Bemisia tabaci* nomenclature: lessons learned. *Pest. Manag. Sci.* 70:1454-1459.
- Castro, R.M., E. Hernández, F. Mora, P. Ramírez, and R.W. Hammond. 2009. First report of *Tomato chlorosis virus* in tomato in Costa Rica. *Plant Dis.* 93:970.
- Castro, R.M., L. Moreira, M. Rojas, R. Gilbertson, E. Hernandez, F. Mora, and P. Ramírez. 2013. Occurrence of *Squash yellow mild mottle virus* (SYMMoV) and *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) in potential new hosts in Costa Rica. *Plant Pathol. J.* 29:285-293.
- Chu, C., T.P. Freeman, J.S. Buckner, T.J. Henneberry, D. Nelson, G.P. Walker, and E.T. Natwick. 2000. *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae) colonization on upland cotton and relationships to leaf morphology and leaf age. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93:912-919.
- Dellaporta, S.L., J. Wood, and J.B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1:19-21.
- Díaz, M., D.P. Maxwell, J.P. Karkashian, and P. Ramírez. 2002. *Calopogonium golden mosaic virus* identified in *Phaseolus vulgaris* from western and northern regions of Costa Rica. *Plant Dis.* 86:188.
- Dovas, C.I., N.I. Katis, and A.D. Avgelis. 2002. Multiplex detection of criniviruses associated with epidemics of a yellowing disease of tomato in Greece. *Plant Dis.* 86:1345-1349.
- Elbert, A., and R. Nauen. 2000. Resistance of *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) to insecticides in southern Spain with special reference to neonicotinoids. *Pest Manag. Sci.* 56:60-64.
- Fortes, I.M., E. Moriones, and J. Navas-Castillo. 2012. *Tomato chlorosis virus* in pepper: prevalence in commercial crops in southeastern Spain and symptomatology under experimental conditions. *Plant Path.* 61:994-1001.
- Gámez, R. 1971. Los virus del frijol en Centroamérica. I. Transmisión por moscas blancas (*Bemisia tabaci*) y plantas hospedantes del virus del mosaico dorado. *Turrialba* 21:22-27.
- García-Andrés, S., D.M. Tomás, S. Sánchez-Campos, J. Navas-Castillo, and E. Moriones. 2007. Frequent occurrence of recombinants in mixed infections of tomato yellow leaf curl disease associated begomoviruses. *Virology* 365:210-219.
- Gilbertson, R.L., M. Rojas, and E. Natwick. 2011. Development of integrated pest management (IPM) strategies for whitefly (*Bemisia tabaci*) transmissible geminiviruses. In: W.M. Thompson, editor, *The whitefly, Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) interaction with geminivirus infected host plants. Springer, HOL. p. 323-356.
- Gorman, K., G. Devine, J. Bennison, P. Coussons, N. Punchard, and I. Denholm. 2007. Report of resistance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.* 63:555-558.

- Guevara-Coto, J.A., N. Barboza-Vargas, E. Hernandez-Jimenez, R.W. Hammond, and P. Ramirez-Fonseca. 2011. *Bemisia tabaci* biotype Q is present in Costa Rica. *Eur. J. Plant Pathol.* 131:167-170.
- Haible, D., S. Kober, and H. Jeske. 2006. Rolling circle amplification revolutionizes diagnosis and genomics of geminiviruses. *J. Virol. Methods* 135:9-16.
- Hernández, E., F. Mora-Umaña, F. Albertazzi, J.P. Karkashian, and P. Ramírez. 2012. Comparative analysis of three different total nucleic acid extraction protocols for the diagnosis of Geminiviruses in squash (*Cucurbita moschata*). *J. Phytopathol.* 160:19-25.
- Hilje, L., H.S. Costa, and P.A. Stansly. 2001. Cultural practices for managing *Bemisia tabaci* and associated viral diseases. *Crop Prot.* 20:801-812.
- Hilje, L., R. Lastra, T. Zoebisch, G. Calvo, L. Segura, L. Barrantes, D. Alpizar, y R. Amador. 1993. Las moscas blancas en Costa Rica. En: L. Hilje y O. Arboleda, editores, Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. CATIE, Turrialba, CRC. p. 58-63.
- Hilje, L., and P.A. Stansly. 2002. Living ground covers for management of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) and tomato yellow mottle virus (ToYMoV) in Costa Rica. *Crop Prot.* 27:10-16.
- Hilje, L., and F.J. Morales. 2008. Whitefly bioecology and management in Latin America. In: J.L. Capinera, editor, *Encyclopedia of entomology*. Springer, HOL. p. 4250-4260.
- Hilje, L., and P.A. Stansly. 2008. Living ground covers for management of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) and *Tomato yellow mottle virus* (ToYMoV) in Costa Rica. *Crop Prot.* 27:10-16. doi:10.1016/j.cropro.2007.04.003
- Höfer, P., M. Engel, H. Jeske, and T. Frischmuth. 1997. Nucleotide sequence of a new bipartite geminivirus isolated from the common weed *Sida rhombifolia* in Costa Rica. *J. Gen. Virol.* 78:1785-1790.
- Idris, A.M., G. Rivas-Platero, I. Torres-Jerez, and J.K. Brown. 1999. First report of *Sinaloa tomato leaf curl geminivirus* in Costa Rica. *Plant Dis.* 83:303.
- Janssen, J.A., W.F. Tjallingii, and J.C. van Lenteren. 1989. Electrical recording and ultrastructure of stylet penetration by the greenhouse whitefly. *Entomol. Exp. Appl.* 52:69-81.
- Jones, R.A. 2009. Plant virus emergence and evolution: Origins, new encounter scenarios, factors driving emergence, effects of changing world conditions and prospects for control. *Virus Res.* 141:113-130.
- Jovel, J., W. Preiss, and H. Jeske. 2007. Characterization of DNA intermediates of an arising geminivirus. *Virus Res.* 130:63-70.
- Kakati, N., and P.D. Nath. 2014. Sustainable management of *Tomato leaf curl virus* disease and *Bemisia tabaci* through integration of physical barrier with biopesticides. *Int. J. Innov. Res. Dev.* 3:32-140.
- Karkashian, J.P., D.P. Maxwell, and P. Ramírez. 2002. Squash yellow mottle geminivirus: a new cucurbit infecting geminivirus from Costa Rica. *Phytopathol.* 92:S125.
- Kim, K.S., and E.M. Flores. 1979. Nuclear changes associated with *Euphorbia mosaic virus* transmitted by the whitefly. *Phytopathol.* 69:980-984.
- Lei, H., W.F. Tjallingii, and J.C. van Lenteren. 1998. Probing and feeding characteristics of the greenhouse whitefly in association with host-plant acceptance and whitefly strains. *Entomol. Exp. Appl.* 88:73-80.
- Li, A.Y., T.J. Dennehy, S. Li, M.E. Wigert, M. Zarborac, and R.L. Nichols. 2001. Sustaining Arizona's fragile success in whitefly resistance management. In: P. Dugger, and D. Richter, editors, *Proceedings Beltwide Cotton Conferences*. National Cotton Council, Memphis, USA. p. 1108-1114.
- Liu, H.Y., G.C. Wisler, and J.E. Duffus. 2000. Particle length of whitefly-transmitted criniviruses. *Plant Dis.* 84: 803-805.

- Lotrakul, P., R.A. Valverde, R. De-La-Torre, S. Jeonggu, and A. Gómez. 2000. Occurrence of a strain of Texas pepper virus in Tabasco and Habanero pepper in Costa Rica. *Plant Dis.* 84:168-172.
- Martínez-Zubiaur, Y., E. Fiallo-Olive, J. Carrillo-Tripp, and R. Rivera-Bustamante. 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.
- Mears, D.R., and A.J. Both. 2000. Insect exclusion from greenhouses. <http://horteng.envsci.rutgers.edu/ppt/papers/ScreeningPaper.pdf> (accessed 11 aug. 2016).
- Morales, F.J. 2010. Distribution and dissemination of begomoviruses in Latin American and the Caribbean. In: P.A. Stansly, and S.E. Naranjo, editors, *Bemisia: Bionomics and management of a global pest*. Springer, HOL. p. 185-226.
- Moriones, E., and J. Navas-Castillo. 2010. Tomato yellow leaf curl disease epidemics. In: P.A. Stansly, and S.E. Naranjo, editors, *Bemisia: Bionomics and management of a global pest*. Springer, HOL. p. 259-282.
- Nakhla, M.K., M.D. Maxwell, S.H. Hidayat, D.R. Lange, A.O. Loniello, M.R. Rojas, D.P. Maxwell, E.W. Kitajima, A. Rojas, P. Anderson, and R.L. Gilbertson. 1994. Two geminiviruses associated with tomatoes in Central America. *Phytopathol.* 84:1155.
- Nakhla, M.K., A. Sorensen, D.P. Maxwell, L. Mejia, P. Ramírez, and J.P. Karkashian. 2005. Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in Central America and development of DNA-based detection methods. *Acta Hort.* 695:277-288.
- Nauen, R., N. Stump, and A. Elbert. 2002. Toxicological and mechanistic studies on neonicotinoid cross resistance in Q type *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Pest Manag. Sci.* 58:868-887.
- Navas-Castillo, J., R. Camero, M. Bueno, and E. Moriones. 2000. Severe yellowing outbreaks in tomato in Spain associated with infections of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis.* 84: 835-837.
- Navas-Castillo, J., E. Fiallo-Olivé, and S. Sánchez-Campos. 2011. Emerging virus diseases transmitted by whiteflies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 49:219-248.
- Navas-Castillo, J., J.J. López-Moya, and M.A. Aranda. 2014. Whitefly-transmitted RNA viruses that affect intensive vegetable production. *Ann. Appl. Biol.* 165:155-17.
- Nawaz-ul-Rehman, M.S., and C.M. Fauquet. 2009. Evolution of geminiviruses and their satellites. *FEBS Lett.* 583:1825-1832.
- Norris, R.F., and M. Kogan. 2005. Ecology of interactions between weeds and arthropds. *Annu. Rev. Entomol.* 50:479-503.
- Orfanidou, C.G., C. Dimitriou, L.C. Papayiannis, V.I. Maliogka, and N.I. Katis. 2013. Epidemiology and genetic diversity of criniviruses associated with tomato yellows disease in Greece. *Virus Res.* 186:120-129.
- Perring, T.M., N.M. Gruenhagen, and C.H. Farrar. 1999. Management of plant viral diseases through chemical control of insect vectors. *Annu. Rev. Entomol.* 44:457-481.
- Polston, J.E., and P.K. Anderson. 1997. The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* 81:1358-1369.
- Polston, J.E., P. De Barro, and L.M. Boykin. 2014. Transmission specificities of plant viruses with the newly identified species of the *Bemisia tabaci* species complex. *Pest. Manag. Sci.* 70:1547-1552.
- Ramírez, P., E. Hernández, F. Mora, R. Abraitis, and R.W. Hammond. 2008. Limited geographic distribution of *Beet pseudo-yellows virus* in Costa Rican cucurbits. *J. Plant Pathol.* 90:329-333.
- Rojas, M.R., and R.L. Gilbertson. 2008. Emerging plant viruses: a diversity of mechanisms and opportunities. In: M.J. Roossinck, editor, *Plant virus evolution*. Springer-Verlag, Berlín, GER. p. 27-51.

- Rojas, M.R., R.L. Gilbertson, D.R. Russell, and D.P. Maxwell. 1993. Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* 77:340-347.
- Rojas, M.R., C. Hagen, W.J. Lucas, and R.L. Gilbertson. 2005. Exploring chinks in the plant's armor: evolution and emergence of geminiviruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43:361-394.
- Schuster, D.J., P.A. Stansly, and J.E. Polston. 1996. Expressions of plant damage of *Bemisia*. In: D. Gerling, and R.T. Mayer, editors, *Bemisia: 1995, taxonomy, biology, damage, control and management*. Intercept, GBR. p. 153-165.
- Seal, S.E., F. van-den-Bosch, and M.J. Jeger. 2006. Factors influencing begomovirus evolution and their increasing global significance: implications for sustainable control. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25:23-46.
- Solorzano-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.* 95:497.
- Tzanetakis, I.E., R.R. Martin, and W.M. Wintermantel. 2013. Epidemiology of criniviruses: an emerging problem in world agriculture. *Front. Microbiol.* 4:119. doi:10.3389/fmicb.2013.00119
- Valverde, R., y M. Moreira. 2004. Identificación de virus en el cultivo de camote (*Ipomea batatas* L.) en Costa Rica. *Agron. Mesoam.* 15:1-7.
- Vargas, J.A., R.W. Hammond, E. Hernández, N. Barboza, F. Mora, and P. Ramírez. 2011. First report of *Tomato chlorosis virus* infecting sweet pepper in Costa Rica. *Plant Dis.* 95:1482.
- Vargas-Asencio, J.A., E. Hernández, N. Barboza, R. Hammond, F. Mora, and P. Ramírez. 2013. Detection of *Tomato chlorosis virus* and its vector *Trialeurodes vaporariorum* in greenhouse grown tomato and sweet pepper in the Cartago province, Costa Rica. *J. Plant Pathol.* 95:627-630.
- Velasco L., B. Simón, D. Janssen, and J.L. Cenis. 2008. Incidences and progression of *Tomato chlorosis virus* disease and *Tomato yellow leaf curl virus* disease in tomato under different greenhouse covers in southeast Spain. *Ann. Appl. Biol.* 153:335-344.
- Wintermantel, W.M. 2004. Emergence of greenhouse whitefly (*Trialeurodes vaporariorum*) transmitted criniviruses as threats to vegetable and fruit production in North America. *APSnet Features*. doi:10.1094/APSnetFeature-2004-0604.
- Wintermantel, W.M. 2010. Transmission efficiency and epidemiology of criniviruses. In: P.A. Stansly, and S.E. Naranjo, editors, *Bemisia: Bionomics and management of a global pest*. Springer, HOL. p. 319-331.
- Wintermantel, W.M., A.A. Cortez, A.G. Anchieta, A. Gulati-Sakhuja, and L.L. Hladky. 2008. Co-infection by two criniviruses alters accumulation of each virus in a host-specific manner and influences efficiency of virus transmission. *Phytopathol.* 98:1340-1345.
- Wintermantel, W.M., and G.C. Wisler. 2006. Vector specificity, host range, and genetic diversity of *Tomato chlorosis virus*. *Plant Dis.* 90:814-819.
- Wisler, G.C., R.H. Li, H.Y. Liu, D.S. Lowry, and J.E. Duffus. 1998. *Tomato chlorosis virus*: a new whitefly-transmitted, phloem limited, bipartite closterovirus of tomato. *Phytopathol.* 88:402-409.
- Wyatt, S.D., and J.D. Brown. 1996. Detection of subgroup III geminiviruses isolates in leaf extracts by degenerate initiators and polymerase chain reaction. *Phytopathol.* 86:1288-1293.