

# Reporte de Caso: detección y caracterización del virus del acucharamiento del tomate (TYLCV) en plantas de tomate del cantón de Sarchí, Costa Rica

## Case Report: detection and characterization of the tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato plants from Sarchí, Costa Rica

Alexandra Castro-Estrada<sup>1</sup>, Estefanía Chavarría-Jiménez<sup>2</sup>, Mareling García-Madrugal<sup>3</sup>, Verónica Ramos-Salazar<sup>4</sup>, Elsie Lorena Gorostiola-Martínez<sup>5</sup>, Randall Chacón-Cerdas<sup>6</sup>, Luis Alvarado-Marchena<sup>7</sup>

Castro-Estrada, A; Chavarría-Jiménez, E; García-Madrugal, M; Ramos-Salazar, V; Gorostiola-Martínez, E.L; Chacón-Cerdas, R; Alvarado-Marchena, L. Reporte de caso: detección y caracterización del virus del acucharamiento del tomate (TYLCV) en plantas de tomate del cantón de Sarchí, Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 167-178.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7621>

- 1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [alecaest@estudiantec.cr](mailto:alecaest@estudiantec.cr)  
 <https://orcid.org/0000-0003-2051-6963>
- 2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [emchavarría21@estudiantec.cr](mailto:emchavarría21@estudiantec.cr)  
 <https://orcid.org/0009-0009-2234-465X>
- 3 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [maregarciam1109@estudiantec.cr](mailto:maregarciam1109@estudiantec.cr)  
 <https://orcid.org/0009-0008-2905-4770>
- 4 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [vrs31@estudiantec.cr](mailto:vrs31@estudiantec.cr)  
 <https://orcid.org/0009-0004-5933-7887>
- 5 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [egorostiola@estudiantec.cr](mailto:egorostiola@estudiantec.cr)  
 <https://orcid.org/0009-0008-5915-7236>
- 6 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [rchacon@itcr.ac.cr](mailto:rchacon@itcr.ac.cr)  
 <https://orcid.org/0000-0002-5364-4649>
- 7 Centro de investigación en Biotecnología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.  
 [lalvarado@itcr.ac.cr](mailto:lalvarado@itcr.ac.cr)  
 <https://orcid.org/0000-0002-1867-4543>

## Palabras clave

*Solanum lycopersicum*; reacción en cadena de la polimerasa; microscopía electrónica de transmisión; *Geminiviridae*.

## Resumen

El presente estudio se enfocó en investigar la presencia del virus del acucharamiento de la hoja del tomate (TYLCV) en plantas de tomate en el cantón de Sarchí, Costa Rica. Se recolectaron muestras de plantas con síntomas de la enfermedad, así como una muestra sin síntomas, y se realizaron análisis moleculares y microscópicos para detectar y caracterizar el virus. Se demostró la presencia del TYLCV en las muestras analizadas mediante PCR, y comparando con otras secuencias mediante un BLAST y un árbol filogenético. Además, se observaron diferencias en la gravedad de los síntomas entre las plantas expuestas al sol y a la sombra. En el análisis por microscopía electrónica de transmisión, se identificaron síntomas citopatológicos en los cloroplastos de las plantas infectadas, tales como deformación, presencia de gránulos de almidón, y cambios en la estructura y organización de los tilacoides. Estos hallazgos confirman la presencia del TYLCV en los cultivos de tomate analizados. Estos resultados pueden ser de utilidad para los agricultores y científicos que buscan desarrollar estrategias de manejo y control de esta enfermedad en los cultivos de tomate en Costa Rica.

## Abstract

The present study focused on investigating the presence of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato plants in Sarchí, Costa Rica. Samples from plants with symptoms of the disease, as well as a sample without symptoms, were collected, and molecular and microscopic analysis were performed to detect and characterize the virus. The results confirmed the presence of TYLCV in the analyzed samples by PCR amplification and by comparison with other sequences using a BLAST and a phylogenetic tree. In addition, differences in the severity of symptoms were observed between plants exposed to sun or in the shade. Cytopathological symptoms were identified by transmission electron microscopy in the chloroplasts of infected plants, such as deformation, presence of starch granules, and changes in the thylakoid structure. These findings confirm the presence of TYLCV in the tomato crops analyzed in this study. These results may be useful for farmers and scientists seeking to develop management and control strategies for this disease in tomato crops in Costa Rica.

## Keywords

*Solanum lycopersicum*; polymerase chain reaction; transmission electron microscopy; *Geminiviridae*.

## Introducción

En Costa Rica, el tomate (*Solanum lycopersicum*) ha ocupado lugares relevantes dentro de los cultivos anuales de mayor área de siembra; en el 2019 ocupó el tercer lugar de la categoría de hortalizas con 1001 ha (14%) [1] y actualmente se continúa monitoreando dentro de los cultivos de mayor importancia en el país según la última Encuesta Agrícola Nacional del 2022 [2]. El tomate se caracteriza por ser un cultivo intensivo realizado durante todo el año por pequeños y medianos productores [3]. Alrededor de mil agricultores están dedicados a la producción de tomate en diferentes lugares del país; sin embargo, el 90% de la producción se concentra en el Valle Central [4].

El cultivo del tomate se ve afectado por gran cantidad de plagas y enfermedades, causadas principalmente por insectos (*Heliothis virescens*), ácaros (*Tetranychus urticae*), hongos (*Botrytis cinerea*), bacterias (*Pseudomonas syringae* pv *tomato*) y virus [5], [6]. Dentro de este último grupo de fitopatógenos destacan los *Begomovirus*, pertenecientes a la familia *Geminiviridae*. Estos se caracterizan por su alta tasa de recombinación y tener un amplio rango de plantas hospederas, ocasionando dificultades en su manejo [7].

El TYLCV, también conocido como virus de la cuchara (o del acucharamiento, enrollamiento, o rizado de la hoja), causa el amarillamiento, reducción en el área de superficie, y el enrollamiento hacia arriba de los márgenes de las hojas de las plantas de tomate, retrasando su crecimiento y reduciendo la productividad del cultivo [8], [9]. El TYLCV es un begomovirus monopartito [10], [11] de ADN de cadena sencilla sentido positivo (+ssADN), lo que lo coloca en el Grupo II según la clasificación Baltimore [12], [13]. Este virus fue detectado en Costa Rica en el 2012 en cultivos de tomate [14] y desde entonces se han realizado estudios para la detección de razas, para conocer su efecto sobre estos cultivos, y para determinar la relación con su principal vector *Bemisia tabaci* (mosca blanca) [10], [11], [15], [16], ya que es considerado uno de los virus más importantes en el sector agrícola por el daño que se le atribuye a nivel mundial [17], [18], [19].

En América Central, los *Begomovirus* que infectan tomate han ocasionado pérdidas que sobrepasan el 60% de su producción; por esta razón, países como Guatemala y Nicaragua dejaron de cultivarlo por temporadas [20]. En cuanto a Costa Rica, ya desde el 2014 se reportan pérdidas desde el 50 al 80% en algunas de las zonas productoras [21]. En el estudio de Valverde-Méndez et al. [11], reportaron que las secuencias de los haplotipos encontradas en el país durante 2015-2016 presentaron similitud con haplotipos de China, Australia, Japón, México y Corea del Sur, validando la variabilidad y capacidad de dispersión del virus. Para el 2023, el virus se había detectado prácticamente en todo el país, y los agricultores continúan reportando pérdidas de hasta el 75% de la producción de tomate [22].

Debido a esta problemática, se hace importante la detección y caracterización de este virus y sus variables, para que se puedan identificar y tomar las medidas respectivas. Estudios previos realizados en Australia [23] y China [24] han realizado pruebas moleculares para la detección de este virus, así como su debida caracterización mediante herramientas bioinformáticas y árboles filogenéticos. Por lo tanto, el presente reporte de caso tuvo como objetivo documentar la implementación de un protocolo para la detección molecular del virus del acucharamiento de la hoja del tomate (TYLCV) en plantas de tomate en una finca específica de Sarchí, Costa Rica. Además, se buscó caracterizar y estudiar los síntomas causados por la infección en estas plantas, proporcionando datos valiosos que pueden contribuir al desarrollo de estrategias de manejo localizadas para esta enfermedad en Costa Rica.

## Metodología

Los experimentos del presente estudio fueron realizados como parte de las prácticas del curso "Virología Molecular de Plantas" de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica en el 2023.

### Recolección de muestras

La zona de muestreo corresponde a una finca de producción de tomate en la Región Central Occidental de Costa Rica, específicamente en el cantón de Sarchí en la provincia de Alajuela, durante el mes de marzo del año 2023.



Para la colecta de las muestras vegetales se seleccionaron de forma no aleatoria, nueve plantas individuales de tomate de la variedad 'Milano', ocho de las cuales presentaban síntomas potenciales de la enfermedad (amarillamiento y acucharamiento de las hojas), y una que no presentaba dicha sintomatología. Las muestras consistieron en tejido foliar próximo al meristemo apical, y específicamente en áreas con síntomas atribuibles al TYLCV. De cada planta se tomaron dos secciones de aproximadamente 1.0 cm<sup>2</sup>, una de las cuales se colocó en bolsas estériles y se almacenó a -18 °C para las pruebas moleculares, mientras que la otra sección se introdujo en tubos con solución fijadora de Karnovsky [25] y se almacenó a 4 °C para su análisis por microscopía electrónica de transmisión (MET).

### Extracción de ADN

Las muestras se congelaron con nitrógeno líquido, luego se molieron con un mortero previamente enfriado con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. De este polvo se tomaron aproximadamente 40 mg para realizar la extracción de ADN. Para esta extracción se utilizó el Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega, Estados Unidos). Las muestras de ADN se almacenaron a -20° C hasta su uso.

### Detección del virus por PCR

Para la amplificación por PCR se utilizaron los cebadores reportados por Park *et al.* [26] para la detección de distintas variantes del virus TYLCV (*forward* 5'-TTTCCTGAATCTGTTACACGGATT-3' y *reverse* 5'-AACTAATGCCTGTTCCCTTCATTC-3'), los cuales amplifican un producto de aproximadamente 740 pb e incluyen parte de la región intergénica, el gen de la proteína de cubierta (CP o V2), y parte de la proteína de movimiento (MP o V1). Además, el programa de termociclado corresponde a una modificación del propuesto por Park *et al.* [26]. El programa utilizado fue el siguiente: 30 s a 98 °C desnaturalización inicial, seguido de 35 ciclos térmicos (10 s a 98 °C de desnaturalización, 10 s a 60 °C de apareamiento, y 45 s a 72 °C de extensión) y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los amplicones fueron luego analizados en un gel de agarosa con amortiguador 1x TAE (Tris-acetato-EDTA). La corrida se realizó durante 30 minutos a 100 voltios.

### Análisis bioinformático

Luego de realizar la secuenciación de Sanger del amplicón obtenido de la muestra 9, se envió la muestra a secuenciar a MacroGen USA. Posteriormente, se realizó un ensamblaje de secuencias mediante CAP3® [27]. Luego, se realizó una comparación de los nucleótidos utilizando la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a través de una búsqueda Nucleoide BLAST. Se realizó una reconstrucción filogenética de Máxima Verosimilitud (ML) [28], usando las accesiones del GenBank más estrechamente emparentadas, seleccionadas mediante un análisis BLAST para identificar las secuencias con mayor similitud. El análisis filogenético se realizó utilizando el software MEGA v11.0.13 [29]. Para calcular la distancia genética entre aislamientos considerando el número de sustituciones de bases y eliminando posiciones con datos faltantes se utilizó el modelo Tamura-Nei [30] y un bootstrap de 3000. Adicionalmente, se identificó la variante viral de TYLCV mediante *in silico* RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, por sus siglas en inglés), utilizando el software SnapGene 7.2.0. Se utilizaron las enzimas de restricción BssSI, Faul, Ddel y Avall las cuales ya se han utilizado en otros estudios de este tipo [26], [31], [32], [33]. En el Cuadro 1 se encuentran las secuencias utilizadas tanto para la reconstrucción filogenética como para la identificación mediante *in silico* RFLP.

**Cuadro 1.** Acciones consultadas en el NCBI para variantes del virus TYLCV y su lugar de origen.

Variante viral	País	Accesión de GeneBank	Referencia
TYLCV-IL (SR)	Siria	ON864376.1	[34]
TYLCV-IL (US-F10-04)	Estados Unidos	AY530931	[35]
TYLCV-KR	Corea	JN680149	[36]
TYLCV-Mdl (Jo-Cuc)	Jordania	EU143745	[37]
GRBaV*	Canadá	JX559642	[38]

\**Grapevine red blotch virus*; grupo externo de referencia.

### Análisis citopatológicos mediante MET

Segmentos de tejido sintomáticos de infección con TYLCV y colectados de hojas de tomate (0.5 cm<sup>2</sup>) fueron procesadas de acuerdo con lo propuesto por Alvarado *et al.* [25]. Esto consistió en una fijación durante 2 días a 4 °C en glutaraldehído y paraformaldehído al 2% v/v disuelto en tampón fosfato 0.1 M a pH 7.2 (solución de Karnovsky), seguido de una fijación en tetraóxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) al 2 % por 2 horas. Finalmente, las muestras fueron deshidratadas en diluciones graduales de acetona y fueron luego polimerizadas en resina de baja viscosidad Spurr<sup>®</sup>. Las muestras ultrafinas se tiñeron con 2% acetato de uranilo y una solución saturada de SATO plomo durante 10 minutos, respectivamente. Finalmente, las muestras se visualizaron en un MET Jeol JEM 2010 (JEOL, Japón).

### Resultados y discusión

Al realizar el muestreo, se observó una mayor gravedad de la sintomatología en las plantas expuestas mayoritariamente al sol respecto a las que se encontraban a la sombra en el tomatal muestreado (Figura 1). Para descartar la posibilidad de que estos síntomas se debieran a una simple falta de agua, se verificó que todas las plantas recibieran un riego adecuado y uniforme durante el periodo de estudio. Además, los síntomas observados, como el amarillamiento y el acucharamiento de las hojas, son característicos de la infección por TYLCV y no de la deshidratación, lo que refuerza la conclusión de que la sintomatología se debe a la presencia del virus [11].



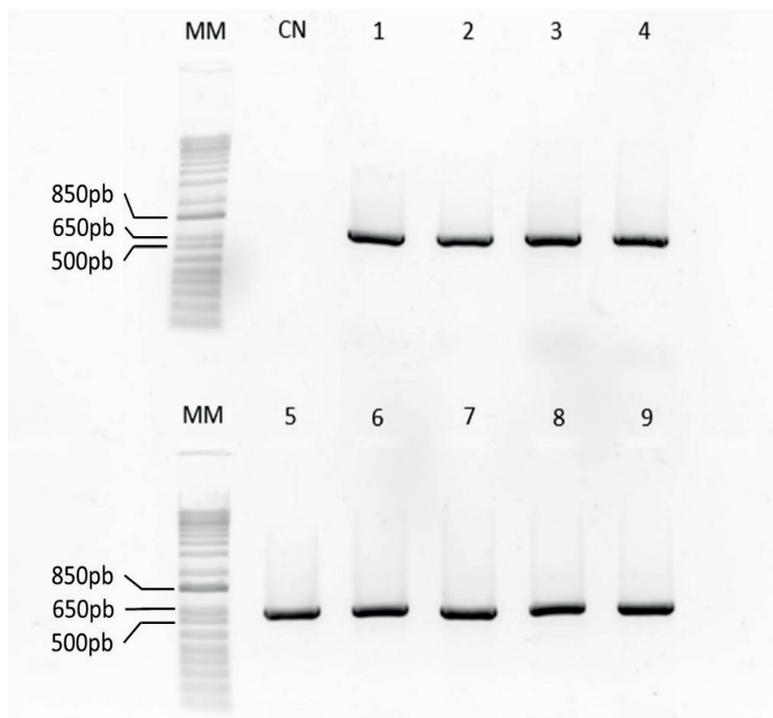
**Figura 1.** Muestra representativa de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectadas en Sarchí, Costa Rica. A, hoja de planta expuesta al sol y presuntamente infectada con el virus TYLCV; B, hoja de planta en sombra y presuntamente infectada con el virus TYLCV.

Investigaciones previas han demostrado que las temperaturas superiores a 25°C pueden agravar los síntomas de la infección viral en las hojas, lo cual concuerda con el hecho de que algunos tipos de estrés abiótico están relacionados con el debilitamiento de los mecanismos de defensa de la planta, aumentando la susceptibilidad a la infección de patógenos [35], [37], [39], [40]. Por ejemplo, en la interacción entre el virus SCMV y el maíz se ha demostrado que los síntomas de la infección son más graves en luminosidad que en sombra [41].

En el tomate, algunos de los genes afectados por las temperaturas elevadas son los codificantes de proteínas de choque térmico (HSP) [35], [40]. Algunas de las funciones de las HSP incluyen prevenir agregados proteicos, así como degradación y plegamiento inadecuado de proteínas; no obstante, pueden ser secuestradas por virus de plantas que buscan asociarse con chaperonas del huésped para potenciar su infección [42], [43]. De hecho, el desarrollo de agregados proteicos formados por proteínas de la cápside viral, ADN del virus y proteínas de estrés celular como las HSP, se considera como un signo de una invasión viral exitosa de parte del TYLCV [28], [43]. Además, al mantener las chaperonas en agregados se disminuye la eficiencia de la respuesta al estrés, incluso ante una eventual recuperación de la planta [35].

### Detección de TYLCV mediante PCR

En la electroforesis realizada para el análisis de los amplicones producto del PCR, se obtuvo como resultado una banda en todas las muestras con síntomas y en la muestra sin síntomas. Según el marcador molecular, estas bandas se encuentran entre las 650-850 pb (Figura 2). Lo anterior coincide con el tamaño del producto de PCR esperado para los cebadores de ADN utilizados, el cual se encuentra entre 739-740 pb [26], lo que sugiere que la totalidad de las muestras analizadas, incluyendo la muestra asintomática, fueron positivas con respecto a la presencia de TYLCV. Esto indica que la muestra asintomática también estaba infectada con el virus, a pesar de no presentar síntomas visibles.



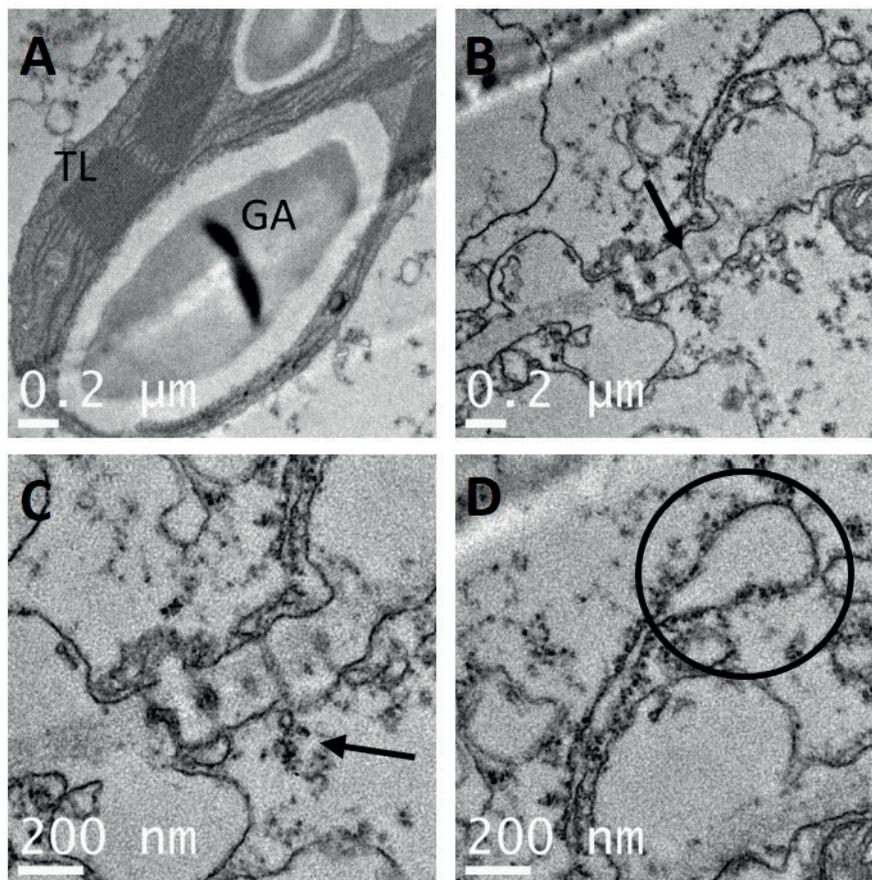
**Figura 2.** Análisis de ADN viral del TYLCV en gel de agarosa con los productos de la amplificación de PCR. MM, marcador molecular (Invitrogen 1kb plus DNA ladder Thermofisher); CN, control negativo (agua); 1-9, muestras de hoja de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectadas en Sarchí, Costa Rica, con y sin sintomatología aparente de infección por TYLCV.

### Análisis citopatológico mediante MET

Con el fin de realizar el estudio de citopatología con MET, se seleccionó la muestra 9 debido al resultado positivo en la detección por PCR (Figura 2) y dado que durante la recolección se observó que la planta de origen presentaba síntomas más evidentes en comparación con las demás.

En la Figura 3 se observan los posibles síntomas citopatológicos generados por TYLCV en los cloroplastos de las hojas de tomate analizadas. El cloroplasto tiene apariencia hinchada, presenta reducción en las granas, y una organización anormal de los tilacoides; además, hay presencia de plastoglóbulos y gránulos de almidón anormalmente grandes (Figura 3A). La presencia de estos últimos puede ocurrir por la expresión constitutiva de MP virales, las cuales pueden llegar a desencadenar síntomas típicos como acumulación anormal de azúcar, clorosis, enanismo y fotosíntesis reducida [36].

Además, tentativamente se observaron partículas virales siendo transportadas a través del plasmodesmo (Figura 3B). Ya se ha reportado previamente una relación compleja entre los geminivirus y los cloroplastos para el movimiento intercelular a través del plasmodesmo [44]. Las anomalías de los cloroplastos son comunes durante la interacción huésped-virus, lo cual se asocia con la sintomatología [36], y genera disminución en la capacidad fotosintética de los cloroplastos [37], lo cual coincide con los síntomas reportados para TYLCV [8], [9].

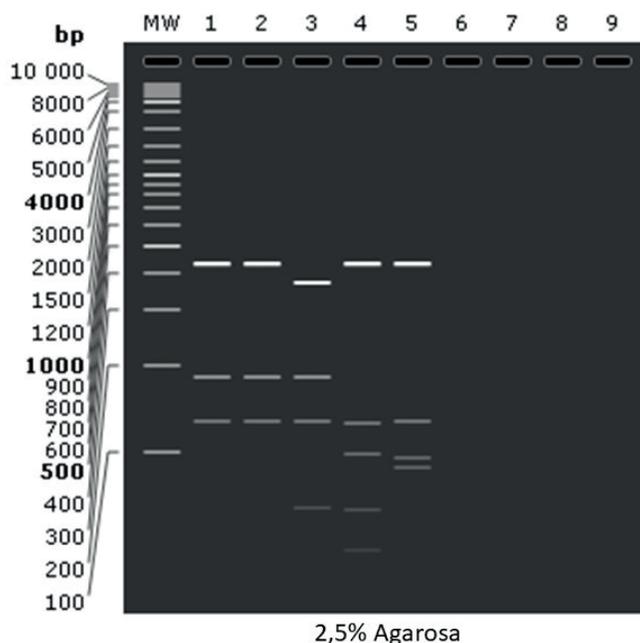


**Figura 3.** Microscopía electrónica de transmisión de hojas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectadas en Sarchí, Costa Rica, con sintomatología aparente de infección por TYLCV. A, deformación de cloroplasto debido a presencia de gránulos de almidón (TL, tilacoides presionados contra la membrana del cloroplasto debido a la presencia de gránulos de almidón; GA, gránulos de almidón

dentro del cloroplasto); B, plasmodesmos (flecha); C, presuntas partículas virales transportándose a través de los plasmodesmos (flecha); D, presunta acumulación de partículas virales (círculo).

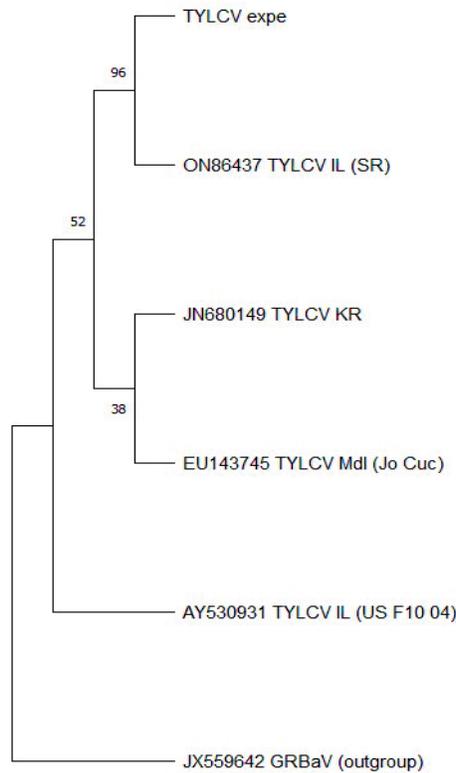
### Análisis bioinformático

Se realizó un BLAST en el NCBI que dio como resultado un 100% de similitud con la accesión ON864376.1 (TYLCV-IL (SR)), la cual corresponde a un estudio realizado en Siria en el año 2022 [34]. Esto se confirmó mediante el análisis de RFLP *in silico*, donde se puede observar que la secuencia TYCLV-IL (SR) presenta un patrón de restricción idéntico al amplicón obtenido experimentalmente, y los fragmentos son cortados por las mismas enzimas (BssSI, Avall) (Figura 4).



**Figura 4.** Resultados del RFLP *in silico* realizado al amplicón de PCR secuenciado a partir de una muestra de hoja de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectada en Sarchí, Costa Rica, con sintomatología aparente de infección por TYLCV. 1, amplicón del PCR; 2, TYLCV-IL(SR); 3, TYLCV-IL(US-F10-04); 4, TYLCV-KR; 5, TYLCV-Mdl (Jo-Cuc). (SnapGene 7.2.0).

En cuanto al árbol filogenético, este respalda el resultado obtenido con el RFLP, al mostrar el amplicón experimental en el mismo clado que la secuencia TYCLV-IL (SR); confirmando así la identidad del amplicón secuenciado (Figura 5). El uso de un árbol de máxima verosimilitud produce mejores estimaciones iniciales cuando hay muchas inserciones, eliminaciones y datos faltantes en las secuencias [45], tal como es el caso del amplicón experimental, el cual no es el genoma completo. Estudios anteriores han utilizado este árbol para determinar la presencia de la cepa Israel del TYLCV en dos sitios distintos de España [46], permitiendo confirmar la relación de los mismos gracias a su proximidad. También en el estudio de Valverde-Méndez [11] lograron establecer similitud entre las cepas costarricenses y haplotipos reportados en Corea del Sur, Japón, Estados Unidos, México y Australia, guardando algunas coincidencias con nuestro análisis.



**Figura 5.** Árbol filogenético de máxima verosimilitud comparando el amplicón de PCR secuenciado a partir de una muestra de hoja de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Milano) colectada en Sarchí, Costa Rica, con sintomatología aparente de infección por TYLCV, con las accesiones del GeneBank (NCBI) más estrechamente emparentadas (MEGA v11.0.13).

## Conclusiones

Se determinó la presencia del virus TYLCV correspondiente a la variedad de Israel (IL) en las muestras analizadas provenientes de cultivos de tomate colectadas el cantón de Sarchí, Costa Rica, confirmado mediante técnicas moleculares como la PCR, secuenciación y análisis bioinformáticos. Además, se observaron diferencias en la severidad de los síntomas entre las plantas expuestas al sol y a la sombra, lo cual sugiere la influencia de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad. Los análisis microscópicos revelaron síntomas citopatológicos en los cloroplastos de las plantas infectadas, lo cual sugiere alteraciones en el funcionamiento de estos orgánulos celulares clave para la fotosíntesis y el crecimiento vegetal, y coincide con la sintomatología característica de la infección viral.

El TYLCV ha sido monitoreado por la Universidad de Costa Rica y el gobierno costarricense desde hace varios años, utilizando diversos métodos moleculares. Sin embargo, la detección y caracterización del TYLCV en los cultivos de tomate en el cantón resalta la importancia de la vigilancia continua y la implementación de medidas de control para minimizar los impactos económicos y agrícolas de esta enfermedad. La colaboración entre agricultores, científicos y autoridades es fundamental para proteger la producción de tomate y garantizar la seguridad alimentaria en el país. Se recomienda la realización de estudios adicionales para comprender mejor y reforzar la interacción de los factores intrínsecos y extrínsecos asociados a la enfermedad, virulencia y patogenicidad. Esto permitirá desarrollar enfoques más eficientes y específicos para mitigar los efectos del TYLCV y proteger la producción de tomate en Costa Rica.

Rica. Cabe resaltar que investigadores de la Universidad de Costa Rica han desarrollado y distribuido una variedad de tomate (llamada *Acorazado*) resistente al TYLCV, la cual está disponible para los agricultores desde el 2023 [22].

## Referencias

- [1] I. N. de E. y C. INEC, "Encuesta Nacional Agropecuaria 2019 RESULTADOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD AGRÍCOLA Y FORESTAL," San José, Costa Rica, Sep. 2020. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: [https://admin.inec.cr/sites/default/files/media/reena-cultivos2019\\_2.pdf](https://admin.inec.cr/sites/default/files/media/reena-cultivos2019_2.pdf)
- [2] I. N. de E. y C. INEC, "Encuesta Nacional Agropecuaria 2022 RESULTADOS GENERALES DE LA ACTIVIDAD AGRÍCOLA Y FORESTAL," San José, Costa Rica, Sep. 2023. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: <https://admin.inec.cr/sites/default/files/2023-10/reagropecENAPECUARIO2022-01.pdf>
- [3] M. Blanco-Meneses, O. Castro-Zúñiga, and A. Calderón-Abarca, "Diagnóstico del uso de antibióticos en regiones productoras de tomate en Costa Rica," *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, vol. 47, no. 1, pp. 87-99, Feb. 2023, doi: 10.15517/RAC.V47I1.53967.
- [4] L. M. López-Marín, *Manual técnico del cultivo del tomate Solanum lycopersicum*, 1era ed., vol. 01. San José, Costa Rica: Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), 2017. Accessed: Jul. 14, 2024. [Online]. Available: <https://repositorio.iica.int/handle/11324/3143>
- [5] C. Ramírez-Vargas and J. Nienhuis, "Cultivo protegido de hortalizas en Costa Rica," *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 25, no. 2, p. pág. 10-20, Aug. 2012, doi: 10.18845/tm.v25i2.303.
- [6] F. E. Martínez-Ruiz, L. Cervantes-Díaz, C. E. Ail-Catzím, L. G. Hernández-Montiel, C. L. D. T. Sánchez, and E. O. Rueda-Puente, "Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En La Zona Árida Del Noroeste De México: La Importancia De Su Diagnóstico," *European Scientific Journal, ESJ*, vol. 12, no. 18, pp. 232-232, Jun. 2016, doi: 10.19044/ESJ.2016.V12N18P232.
- [7] N. Barboza, M. Blanco-Meneses, P. Esker, E. Moriones, and A. K. Inoue-Nagata, "Distribution and diversity of begomoviruses in tomato and sweet pepper plants in Costa Rica," *Annals of Applied Biology*, vol. 172, no. 1, pp. 20-32, Jan. 2018, doi: 10.1111/AAB.12398.
- [8] R. S. Ramos, L. Kumar, F. Shabani, and M. C. Picanço, "Risk of spread of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in tomato crops under various climate change scenarios," *Agric Syst*, vol. 173, pp. 524-535, Jul. 2019, doi: 10.1016/J.AGSY.2019.03.020.
- [9] A. H. El-Sappah *et al.*, "Natural resistance of tomato plants to Tomato yellow leaf curl virus," *Front Plant Sci*, vol. 13, no. 1, p. 1081549, Dec. 2022, doi: 10.3389/FPLS.2022.1081549/BIBTEX.
- [10] M. R. Maliano, M. R. Rojas, M. A. Macedo, N. Barboza, and R. L. Gilbertson, "The invasion biology of tomato begomoviruses in Costa Rica reveals neutral synergism that may lead to increased disease pressure and economic loss," *Virus Res*, vol. 317, p. 198793, Aug. 2022, doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2022.198793.
- [11] K. Valverde-Méndez, E. J. Hernández, D. Matamoros, and N. Barboza, "Begomovirus diversity in tomato crops in Costa Rica," *Annals of Applied Biology*, vol. 183, no. 3, pp. 231-243, Nov. 2023, doi: 10.1111/AAB.12850.
- [12] A. Varsani *et al.*, "Establishment of three new genera in the family Geminiviridae: Becurtovirus, Eragrovirus and Turncurtovirus," *Arch Virol*, vol. 159, no. 8, pp. 2193-2203, Mar. 2014, doi: 10.1007/S00705-014-2050-2/FIGURES/4.
- [13] A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz, "Family - Geminiviridae," in *Virus Taxonomy*, vol. 01, A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz, Eds., Elsevier, 2012, pp. 351-373. doi: 10.1016/B978-0-12-384684-6.00035-5.
- [14] N. Barboza, M. Blanco-Meneses, M. Hallwass, E. Moriones, and A. K. Inoue-Nagata, "First Report of Tomato yellow leaf curl virus in Tomato in Costa Rica," <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0881-PDN>, vol. 98, no. 5, p. 699, Apr. 2014, doi: 10.1094/PDIS-08-13-0881-PDN.
- [15] N. Barboza *et al.*, "Achievements in the epidemiology of begomoviruses and their vector Bemisia tabaci in Costa Rica," *Rev Biol Trop*, vol. 67, no. 3, pp. 419-453, Jun. 2019, doi: 10.15517/RBT.V67I3.33457.
- [16] L. Hilje and P. A. Stansly, "Preferencia de hospedantes por dos biotipos de Bemisia tabaci en Costa Rica y Florida," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 29, no. 3, pp. 585-595, 2018, doi: 10.15517/MA.V29I3.311742.
- [17] E. Moriones and J. Navas-Castillo, "Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide," *Virus Res*, vol. 71, no. 1-2, pp. 123-134, Nov. 2000, doi: 10.1016/S0168-1702(00)00193-3.
- [18] W. Ning *et al.*, "Transmission of Tomato Yellow Leaf Curl Virus by Bemisia tabaci as Affected by Whitefly Sex and Biotype," *Scientific Reports 2015 5:1*, vol. 5, no. 1, pp. 1-8, May 2015, doi: 10.1038/srep10744.

- [19] A. Prasad, N. Sharma, G. Hari-Gowthem, M. Muthamilarasan, and M. Prasad, "Tomato Yellow Leaf Curl Virus: Impact, Challenges, and Management," *Trends Plant Sci*, vol. 25, no. 9, pp. 897–911, Sep. 2020, doi: 10.1016/J.TPLANTS.2020.03.015.
- [20] M. K. Nakhla, A. Sorensen, D. P. Maxwell, L. Mejía, P. Ramírez, and J. P. Karkashian, "Molecular characterization of tomato-infecting begomoviruses in central America and development of DNA-based detection methods," *Acta Horti*, vol. 695, pp. 277–288, 2005, doi: 10.17660/ACTAHORTIC.2005.695.31.
- [21] C. A. Parral, "Virus de la cuchara amenaza producción de tomate del país," Portal de la Investigación-Vicerrectoría de Investigación UCR. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: <https://vinv.ucr.ac.cr/es/noticias/virus-de-la-cuchara-amenaza-produccion-de-tomate-del-pais>.
- [22] P. Mora-Vargas, "Nuevo tipo de tomate podría salvar hasta un 75 % de las cosechas," Portal de la Investigación-Vicerrectoría de Investigación UCR. Accessed: Jul. 16, 2024. [Online]. Available: <https://www.ucr.ac.cr/noticias/2023/12/12/nuevo-tipo-de-tomate-podria-salvar-hasta-un-75-de-las-cosechas.html>.
- [23] S. L. Van Brunschot, D. M. Persley, A. D. W. Geering, P. R. Campbell, and J. E. Thomas, "Tomato yellow leaf curl virus in Australia: Distribution, detection and discovery of naturally occurring defective DNA molecules," *Australasian Plant Pathology*, vol. 39, no. 5, pp. 412–423, 2010, doi: 10.1071/AP10083/METRICS.
- [24] Y. Xie, X. Jiao, X. Zhou, H. Liu, Y. Ni, and J. Wu, "Highly sensitive serological methods for detecting tomato yellow leaf curl virus in tomato plants and whiteflies," *Virology*, vol. 10, no. 1, pp. 1–9, May 2013, doi: 10.1186/1743-422X-10-142/FIGURES/9.
- [25] L. Alvarado-Marchena, C. Alvarado-Ulloa, R. Chacón Cerdas, A. Schmidt-Durán, and D. Flores-Mora, "Viral clearance for three varieties of *Ficus carica* L. infected with the Fig Mosaic Virus (FMV)," *Plant Cell Biotechnol Mol Biol*, vol. 18, no. 7–8, pp. 395–408, Oct. 2017, Accessed: Jul. 14, 2024. [Online]. Available: <https://ikpress.org/index.php/PCBMB/article/view/1727/1630>
- [26] J. Park, E. J. Kil, J. Kim, Y. G. Shin, N. Y. Heo, and S. Lee, "Rapid Detection and Identification of Six Tomato yellow leaf curl virus Isolates from Different Regions Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis," *Journal of Phytopathology*, vol. 162, no. 4, pp. 209–217, Apr. 2014, doi: 10.1111/JPH.12172.
- [27] X. Huang and A. Madan, "CAP3: A DNA Sequence Assembly Program," *Genome Res*, vol. 9, no. 9, pp. 868–877, Sep. 1999, doi: 10.1101/GR.9.9.868.
- [28] M. R. Hosseinzadeh, M. Shams-Bakhsh, S. K. Osaloo, and J. K. Brown, "Phylogenetic relationships, recombination analysis, and genetic variability among diverse variants of tomato yellow leaf curl virus in Iran and the Arabian Peninsula: Further support for a TYLCV center of diversity," *Arch Virol*, vol. 159, no. 3, pp. 485–497, Mar. 2014, doi: 10.1007/S00705-013-1851-Z/TABLES/4.
- [29] K. Tamura, G. Stecher, and S. Kumar, "MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11," *Mol Biol Evol*, vol. 38, no. 7, pp. 3022–3027, Jun. 2021, doi: 10.1093/MOLBEV/MSAB120.
- [30] K. Tamura and M. Nei, "Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees," *Mol Biol Evol*, vol. 10, no. 3, pp. 512–526, 1993, doi: 10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A040023.
- [31] G. P. Accotto, J. Navas-Castillo, E. Noris, E. Moriones, and D. Louro, "Typing of tomato yellow leaf curl viruses in Europe," *Eur J Plant Pathol*, vol. 106, no. 2, pp. 179–186, 2000, doi: 10.1023/A:1008736023293/METRICS.
- [32] A. Fanigliulo *et al.*, "Analysis of the spatial spread of two Begomoviruses, TYLCV and TYLCSV, in tomato hydroponics in Calabria region, Italy," *Acta Horti*, vol. 789, pp. 127–132, 2008, doi: 10.17660/ACTAHORTIC.2008.789.16.
- [33] I. Fekih-Hassan *et al.*, "Detection of Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in Tunisia," *EPPO Bulletin*, vol. 33, no. 2, pp. 347–350, Aug. 2003, doi: 10.1046/J.1365-2338.2003.00646.X.
- [34] A. A. Hasan and A. M. Mouhanna, "Efficiency of transmission of Tomato yellow leaf curl virus using single leaflet grafting," *Damascus University Journal of agriculture sciences*, vol. 39, no. 1, pp. 1–12, Mar. 2022.
- [35] A. Ghandi *et al.*, "Tomato yellow leaf curl virus infection mitigates the heat stress response of plants grown at high temperatures," *Scientific Reports* 2016 6:1, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep19715.
- [36] A. Singh and I. K. Singh, "Molecular aspects of plant-pathogen interaction," *Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction*, pp. 1–351, Feb. 2018, doi: 10.1007/978-981-10-7371-7/COVER.
- [37] J. Zhao, X. Zhang, Y. Hong, and Y. Liu, "Chloroplast in plant-virus interaction," *Front Microbiol*, vol. 7, no. OCT, p. 219889, Oct. 2016, doi: 10.3389/FMICB.2016.01565/BIBTEX.
- [38] B. Krenz, J. R. Thompson, M. Fuchs, and K. L. Perry, "Complete Genome Sequence of a New Circular DNA Virus from Grapevine," *J Virol*, vol. 86, no. 14, pp. 7715–7715, Jul. 2012, doi: 10.1128/JVI.00943-12.

- [39] T. G. Shibaeva, E. G. Sherudilo, E. Ikkonen, A. A. Rubaeva, I. A. Levkin, and A. F. Titov, "Effects of Extended Light/Dark Cycles on Solanaceae Plants," *Plants* 2024, Vol. 13, Page 244, vol. 13, no. 2, p. 244, Jan. 2024, doi: 10.3390/PLANTS13020244.
- [40] R. Gorovits, I. Sobol, M. Altaieb, H. Czosnek, and G. Anfoka, "Taking advantage of a pathogen: understanding how a virus alleviates plant stress response," *Phytopathology Research*, vol. 1, no. 1, pp. 1–6, Dec. 2019, doi: 10.1186/S42483-019-0028-4/FIGURES/2.
- [41] T. Jiang *et al.*, "Activated malate circulation contributes to the manifestation of light-dependent mosaic symptoms.," *Cell Rep*, vol. 42, no. 4, pp. 112333–112333, Apr. 2023, doi: 10.1016/J.CELREP.2023.112333.
- [42] T. Nusayr, "The role of heat-shock proteins, in vector-virus transmission," in *Applied Plant Virology: Advances, Detection, and Antiviral Strategies*, 01 ed., vol. 01, L. P. Awasthi, Ed., Academic Press, 2020, pp. 249–254. doi: 10.1016/B978-0-12-818654-1.00019-0.
- [43] R. Gorovits, A. Moshe, M. Ghanim, and H. Czosnek, "Recruitment of the Host Plant Heat Shock Protein 70 by Tomato Yellow Leaf Curl Virus Coat Protein Is Required for Virus Infection," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e70280, Jul. 2013, doi: 10.1371/JOURNAL.PONE.0070280.
- [44] B. C. Reagan and T. M. Burch-Smith, "Viruses reveal the secrets of plasmodesmal cell biology," *Molecular Plant-Microbe Interactions*, vol. 33, no. 1, pp. 26–39, Nov. 2020, doi: 10.1094/MPMI-07-19-0212-FI/ASSET/IMAGES/LARGE/MPMI-07-19-0212-FI\_F1.JPEG.
- [45] K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar, "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods," *Mol Biol Evol*, vol. 28, no. 10, pp. 2731–2739, Oct. 2011, doi: 10.1093/MOLBEV/MSR121.
- [46] F. Péréfarres *et al.*, "Occurrence of the Israel strain of Tomato yellow leaf curl virus in New Caledonia and Loyalty Islands," *New Dis Rep*, vol. 25, no. 1, pp. 6–6, Jan. 2012, doi: 10.5197/J.2044-0588.2012.025.006.