



Artículo Científico

## El género *Orthospovirus* en Costa Rica: Un caso centroamericano

**Mauricio Montero-Astúa\***, **Natasha Dejuk-Protti**, **David Bermúdez-Gómez**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR), 11501-2060 San José, Costa Rica; Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica (UCR), 11501-2060 San José, Costa Rica; **Elena Vásquez Céspedes**, **Izayana Sandoval-Carvajal**, **Laura Garita-Salazar**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR); **Federico J. Albertazzi**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR) y Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica (UCR); **Scott Adkins**, USDA-ARS, Fort Pierce, FL 34945, US; **Lisela Moreira-Carmona**, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica (UCR), y Escuela de Agronomía, Universidad de Costa Rica (UCR).

\*Autor de  
correspondencia:

Mauricio Montero-Astúa  
mauricio.monteroastua  
@ucr.ac.cr

Sección:

Número Especial

Recibido:

23 Agosto, 2023

Aceptado:

10 Diciembre, 2023

Publicado:

28 Diciembre, 2023

Cita:

Montero-Astúa M, Dejuk-Protti N, Bermúdez-Gómez D, Vásquez Céspedes E, Sandoval-Carvajal I, Garita-Salazar L, Albertazzi FJ, Adkins S y Moreira-Carmona L. 2023. El género *Orthospovirus* en Costa Rica: Un caso centroamericano. Revista Mexicana de Fitopatología 41(4): 4.  
DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-6>

### RESUMEN

**Objetivo/Antecedentes.** El género *Orthospovirus*, conocido por impacto significativo en una variedad de cultivos de importancia global, se manifiesta en virus emergentes con plantas económicamente perjudiciales. Aunque estos virus fitopatógenos están bien documentados en América del Norte y del Sur, su presencia y dinámica en América Central, particularmente en Costa Rica, un punto crítico entre los dos continentes, siguen siendo menos comprendidos. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de los orthospovirus en Costa Rica y obtener secuencias parciales del genoma para analizar la variabilidad genética.

**Materiales y Métodos.** El estudio consistió en un análisis exhaustivo de 295 muestras de plantas utilizando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), una técnica sensible para detectar antígenos específicos, para evaluar la prevalencia de INSV, IYSV, TSWV y el serogrupo GRSV/TCSV. Una caracterización molecular más profunda de 20 muestras se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), utilizando cebadores tanto de amplio espectro como específicos de especie para aumentar la precisión de la detección.

**Resultados.** Los resultados de ELISA revelaron la no detección de TSWV y el serogrupo GRSV/TCSV, divergiendo de informes de diagnóstico previos. La confirmación de INSV en Costa Rica a través de ELISA, RT-PCR y secuenciación parcial subraya su prevalencia tanto en campos abiertos como en invernaderos. A pesar de los informes diagnósticos anteriores que sugerían la presencia de TSWV en



Costa Rica, nuestro estudio no detectó este virus. El análisis RT-PCR con cebadores degenerados tampoco encontró evidencia de otras especies de orthotospovirus en nuestras muestras. La identificación de un haplotipo dominante de INSV, junto con tres variantes adicionales, sugiere la probabilidad de al menos dos introducciones independientes del virus en la región.

**Conclusión.** Estos hallazgos subrayan la necesidad de realizar muestreos e investigaciones más exhaustivas sobre los orthotospovirus en América Central para comprender mejor su epidemiología e impacto en la agricultura.

**Palabras clave:** síntomas virales, ELISA, RT-PCR, diversidad genética, INSV, IYSV.

## INTRODUCCIÓN

El género *Orthotospovirus* (familia *Tospoviridae*, orden *Bunyvirales*) (Kuhn *et al.*, 2022) representa un grupo emergente de virus con una distribución global que afecta a diversas especies de plantas (Pappu *et al.*, 2009). Los miembros de este género han ampliado su distribución o ámbito de hospederos vegetales (Londoño *et al.*, 2012; Naidu *et al.*, 2005; Webster *et al.*, 2015). Varias especies de orthotospovirus son reconocidas como patógenos vegetales económicamente significativos, limitando la producción de cultivos o afectando la calidad del rendimiento. Por ejemplo, diversos informes mencionan pérdidas de rendimiento de hasta el 100 % y pérdidas económicas que oscilan entre decenas de miles hasta millones de dólares estadounidenses (Daughtrey *et al.*, 1997; Hasegawa y Del Pozo-Valdivia, 2023; Mandal *et al.*, 2012).

El género *Orthotospovirus* comprende 26 especies aceptadas (Kuhn *et al.*, 2022). El virus de la marchitez manchada del jitomate (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) es la especie tipo y ocasiona un alto impacto económico en diversos cultivos (Pappu *et al.*, 2009). Otra especie significativa dentro del género es el virus de la mancha necrótica del impatiens (*Impatiens necrotic spot virus*, INSV) (Daughtrey *et al.*, 1997). Históricamente, INSV fue inicialmente reconocido como un serotipo distinto de TSWV, identificado como TSWV-I (De Ávila *et al.*, 1992). También es destacable el virus de la mancha amarilla del iris (*Iris yellow spot virus*, IYSV), un orthotospovirus de origen eurasiático que se ha convertido en una limitación en la producción de bulbos y semillas de cebolla, extendiéndose rápidamente por todo el mundo (Bag *et al.*, 2015; Gent *et al.*, 2006).

A pesar de la extensa investigación sobre la biología, manejo e interacción de los orthotospovirus con los trips vectores (Montero-Astúa *et al.*, 2016), la infor-

mación sobre la ocurrencia y los datos de secuencias es bastante limitada en todos los países de América Central. En Costa Rica, durante principios de la década de 1990, TSWV e INSV (entonces TSWV-I) fueron identificados mediante serología en plantas de impatiens (*Impatiens* spp.) y lisianteo (*Eustoma* sp.) (Hsu y Lawson, 1991; Rivera *et al.*, 1990). IYSV fue reportado en Guatemala (Nischwitz *et al.*, 2007) y Costa Rica (Montero-Astúa *et al.*, 2017). Además de estas publicaciones científicas, se encontró información (publicaciones locales, tesis o informes de proyectos institucionales disponibles en línea) sobre la presencia de TSWV en Guatemala y Honduras (Cumes Mantanico, 2008; Dardón *et al.*, 1994; Doyle *et al.*, 2002; Espinoza Rivera, 2012; Palmieri, 2012), aunque no se hallaron datos de secuencias de aislamientos de TSWV de América Central en bases de datos públicas.

A diferencia de la situación en América Central, varios informes han actualizado la presencia de orthospovirus en las islas del Caribe. Se han registrado brotes del virus de la mancha clorótica del jitomate (*Tomato chlorotic spot virus*, TCSV), una especie diferente de orthospovirus descrita originalmente en Brasil (De Ávila *et al.*, 1993), en toda la cuenca del Caribe: Cuba (Martinez-Zubiaur *et al.*, 2016), República Dominicana (Almeida *et al.*, 2014; Batuman *et al.*, 2014), Haití (Adegbola *et al.*, 2016), Puerto Rico (De Jensen y Adkins, 2014; Webster *et al.*, 2013); y adicionalmente en Florida (EE.UU.) (Londoño *et al.*, 2012; Webster *et al.*, 2015). Además, se confirmó la presencia de TSWV mediante RT-PCR en la República Dominicana en 2013 (Martínez *et al.*, 2014).

La obtención de datos de secuencias de orthospovirus es esencial en todas las regiones geográficas y en diversos hospederos vegetales por tres razones fundamentales: (i) analizar la diversidad viral a nivel global, (ii) identificar aislamientos genéticamente distintos y (iii) contribuir a la comprensión epidemiológica. Esta información resulta crítica para los programas de mejora de cultivos y de resistencia a enfermedades. Por ejemplo, existen aislamientos de TSWV que pueden superar la resistencia conferida por los genes Sw-5 y Tsw en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) y pimiento (*Capsicum annum*), respectivamente. Conocer los aislamientos presentes en una zona y realizar comparaciones de secuencias para identificar las mutaciones que permiten romper la resistencia son aportes vitales para los programas de mejora genética (Batuman *et al.*, 2017; Sharman y Persley, 2006).

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de los orthospovirus en Costa Rica y obtener secuencias parciales del genoma para analizar la variabilidad genética. Esta información actualiza la presencia y variabilidad de estos virus vegetales en América Central. Llevamos a cabo un estudio mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA) de plantas con síntomas similares a los causados por virus, con el fin de aumentar las posibilidades de detectar orthospovirus. Un subconjunto de muestras positivas en ELISA fue posteriormente examinado mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR).

No se detectaron plantas positivas para TSWV en nuestras muestras. Por lo tanto, también realizamos un análisis longitudinal de la detección de TSWV e INSV en Costa Rica basado en informes del diagnóstico clínico del Laboratorio de Patógenos Vegetales Obligatorios y sus Vectores (LaFOV), Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, disponibles desde el año 2000. Este estudio proporciona una actualización fundamental sobre la presencia y variabilidad de los orthotospovirus en Costa Rica, contribuyendo a una comprensión más amplia de estos virus en América Central. Los hallazgos sugieren un cambio en la prevalencia de los virus y destacan la importancia de mantener una vigilancia y una investigación continuas. Los esfuerzos futuros deben centrarse en estudios detallados de vigilancia y genéticos para gestionar de manera más efectiva estos virus vegetales y abordar los desafíos agrícolas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

**Metodología de recolección de muestras.** Recopilamos un total de 295 muestras de plantas que representan 20 familias botánicas diferentes (como se detalla en el Cuadro 1). Estas muestras se obtuvieron de 47 ubicaciones independientes, que incluyeron campos, invernaderos, parques y jardines en cinco de las siete provincias de Costa Rica. Nuestros objetivos principales para el análisis mediante Ensayo Inmunoenzimático (ELISA) fueron INSV, IYSV, TSWV y el serogrupo compuesto por el virus del anillo de la mancha del maní (GRSV) y el virus de la mancha clorótica del tomate (TCSV). El período de recolección abarcó desde 2013 hasta 2014, y las muestras se obtuvieron principalmente de agricultores que las enviaron al laboratorio de diagnóstico debido a la manifestación de síntomas virales en sus plantas. Además, se realizaron visitas proactivas a campos, invernaderos, jardines o parques con antecedentes conocidos de ocurrencia de orthotospovirus o informes de plantas sintomáticas. Los síntomas observados que motivaron la recopilación de muestras incluyeron patrones de mosaico, anillos concéntricos o líneas cloróticas o necróticas, deformación de hojas, superficie irregular de hojas o frutos (como ampollas o arrugas) y enanismo. En nuestro proceso de selección, se prestó especial atención a especies de plantas conocidas como hospederas de estos virus, como tomates, cebollas y pimientos. Estos cultivos hortícolas estuvieron más representados en nuestro conjunto de muestras debido a su importancia agrícola y a la mayor probabilidad de detectar los virus de interés en ellos. Además de éstos, también se incluyeron en nuestro estudio plantas ornamentales y diversas especies hortícolas para ofrecer una visión integral de la presencia y diversidad de orthotospovirus en Costa Rica.

**Cuadro 1.** Muestras recolectadas en cinco provincias de Costa Rica para analizar la presencia de especies de *Orthotospovirus*.

Familia de planta	N° muestras / provincia <sup>z</sup>	Total muestras	N° Sitios	IDs muestras	Tejido
Amaryllidaceae	2 A, 23 C, 17 SJ	42	13	T161-T163, T170-T175, T177-T180, T182, T183, T192, T195-T199, T283-T285, T288-T296, T298-T301, T305, T316, T317, T321	Hoja
Anacardiaceae	1 SJ	1	1	T335	Fruto
Apocynaceae	1 A, 5 C	6	3	T076, T159, T241, T346-T348	Hoja
Asparagaceae	1 A	1	1	T329	Hoja
Asteraceae	6 A	6	2	T051, T053, T325-T328	Hoja
Balsaminaceae	4 A, 3 C	7	2	T028-T031, T061, T261, T262	Hoja
Caricaceae	5 P	5	1	T330-T334	Fruto
Cucurbitaceae	7 A, 3 C, 1 G, 9 P	20	8	T091, T160, T268, T270, T280, T135-T140, T265, T266	Hoja
Fabaceae	4 A, 2 C, 1 SJ	7	5	T034, T079, T118, T124, T148, T243, T258	Hoja
Gentianaceae	3 C	3	1	T322-T324	Hoja
Iridaceae	4 C	4	1	T184-T187	Hoja
Lamiaceae	3 C	3	1	T156-T158	Hoja
Liliaceae	2 C	2	1	T188-T189	Hoja
Malvaceae	3 A, 1 G, 1 SJ	5	3	T066-T068, T081, T350	Hoja
Orchidaceae	18 A, 27 C	45	2	T012-T027, T055, T056, T214-T240	Hoja
Oxalidaceae	2 A	2	1	T120, T121	Hoja
Plantaginaceae	2 C	2	1	T057, T058	Hoja
Rosaceae	2 A	2	1	T128, T131	Hoja
Solanaceae	71 A, 37 C, 11 P, 12 SJ	131		T001-T011, T032, T033, T038-T045, T048-T050, T054, T059-T060, T062-T065, T069-T075, T077, T078, T082-T089, T092-T104, T106-T112, T114-T116, T119, T122, T134, T165-T169, T176, T181, T194, T202-T205, T209-T213, T245-T251, T253, T263, T264, T267, T271-T279, T302-T304, T306-T313, T320, T336-T338, T341-T345	Hoja y/o Fruto
Zingiberaceae	1 A	1	1	T339	Hoja

<sup>z</sup>Provincias muestreadas; A, Alajuela; C, Cartago; G, Guanacaste; P, Puntarenas; SJ, San José.

**Preparación de muestras y detección ELISA.** Para la detección de INSV, IYSV, TSWV y el serogrupo GRSV/TCSV, utilizamos reactivos comerciales de ELISA de Agdia, Elkhart, IN, siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso comenzó triturando aproximadamente 0.5 gramos de tejido vegetal en 1 mL de un tampón de extracción general. La composición de este tampón incluyó 136 mM de NaCl, 8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM de KCl, 10 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 2 % (v/v) de Tween-20, 2 % (w/v) de Polivinilpirrolidona MW 40,000, 0.2 % (w/v)

de albúmina de huevo de gallina y se ajustó el pH a 7.4. Cada muestra se preparó en tres réplicas y se almacenó a -35 °C hasta su uso en las pruebas de ELISA. Para el procedimiento de ELISA, las muestras se probaron en pozos duplicados. Cada placa incluía dos pozos de controles positivos comerciales certificados (Agdia) y cuatro pozos de controles negativos. La absorbancia se midió a 405 nm después de una hora y se extendió a dos horas específicamente para IYSV, utilizando un lector de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific, China). Una muestra se consideró positiva si su valor promedio de absorbancia era mayor que el doble del promedio de los pozos de control negativo correspondientes, según el criterio establecido por Sutula *et al.* (1986). En casos de resultados dudosos, las muestras se volvieron a analizar siguiendo el mismo protocolo, pero utilizando un tampón de conjugado enzimático (tampón ECI, protocolo de Agdia) tanto con como sin la adición de un 5 % de leche en polvo descremada. Este paso se incluyó para mitigar los falsos positivos, un método respaldado por Smith *et al.* (2006).

**Análisis longitudinal de la detección de INSV y TSWV en Costa Rica.** Los informes del laboratorio de diagnóstico para la detección de INSV y TSWV en Costa Rica, realizados en el Laboratorio de Patógenos Vegetales Obligatorios y sus Vectores (LaFOV), Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, disponibles desde el año 2000, constituyen nuestra principal fuente de datos. Este período de 23.5 años de registros (de 2000 a julio de 2023) proporciona la visión más completa que tenemos sobre la frecuencia de detección de INSV y TSWV en el país. Las muestras enviadas al laboratorio de diagnóstico se dividen en dos categorías: (i) material vegetal asintomático destinado a la exportación, que requiere certificación fitosanitaria y probablemente está libre de virus, y (ii) material vegetal sintomático, generalmente enviado por agricultores y agentes de extensión, que probablemente esté infectado por virus, aunque no exclusivamente por orthotospovirus. Estos registros, que abarcan muestras tanto asintomáticas como sintomáticas de diversas dimensiones de fincas e invernaderos, ofrecen una estimación valiosa de la frecuencia relativa de la ocurrencia de virus en Costa Rica a lo largo de los años.

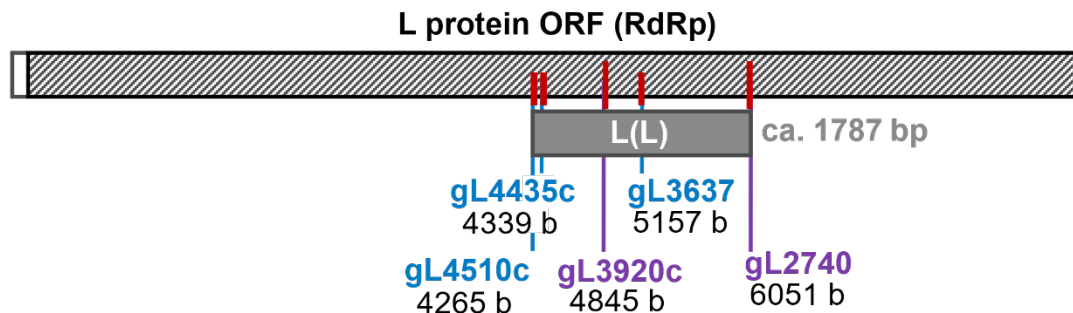
**Refinamiento de la detección del virus de la mancha necrótica de *Impatiens* mediante RT-PCR:** Para mejorar la precisión de la identificación de INSV, llevamos a cabo un análisis específico mediante RT-PCR en 20 muestras que resultaron positivas para INSV mediante ELISA. Este análisis detallado incluyó el uso de cebadores tanto de ortotospovirus de amplio espectro como de cebadores específicos diseñados para INSV, según se detalla en Cuadro 2 y Figura 1. El ARN se extrajo de cada muestra utilizando el RNeasy Plant Minikit (Qiagen, Alemania). Posteriormente, cuantificamos el ARN total utilizando un espectrofotómetro Na-

**Cuadro 2.** Pares de cebadores y perfiles térmicos usados para la detección de orthotospovirus.

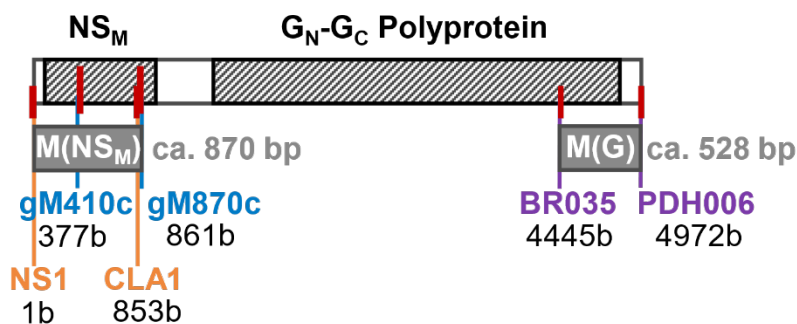
Cebadores	Secuencia 5' a 3'	Tamaño de amplicón (bp)	Perfil térmico	Referencia
<b>Detección de Orthotospovirus (Varias especies)</b>				
BR60	CCCGGATCCTGCAGAGCAAATGTGTCA	453	95 °C x 1 min; 30 x (94 °C x 30 s, 48 °C x 1 min, 72 °C); 72 °C x 7 min	Eiras <i>et al.</i> , 2001
BR65	ATCAAGCCTTCTGAAAGTCAT			
BR035	GAATATATGACACCATTG	514	95 °C x 1 min; 30 x (94 °C x 30 s, 48 °C x 1 min, 72 °C); 72 °C x 7 min	Eiras <i>et al.</i> , 2001
PDH006	CCCAGAGCAATCAGTGCA			
NS1	CCCTGCAGGATCCAGAGCAATCAGTGCA	865	95 °C x 1 min; 30 x (94 °C x 30 s, 48 °C x 1 min, 72 °C x 1 min); 72 °C x 7 min	Eiras <i>et al.</i> , 2001
CLA1	GCAGGCTTCAATGAATGC			
gM410	AACTGGAAAAATGATTYNYTTGTTGG	500	95 °C x 1 min; 35 x (94 °C x 30 s, 52 °C x 30 s, 72 °C x 30 s); 72 °C x 10 min	Chen <i>et al.</i> , 2012
gM870c	ATTAGYTTGCAKGCCTCAATNAARGC			
gL2740	ATGGGDATNTTTGATTTCATGRTATGC	1200	95 °C x 2 min; 30 x (94 °C x 30 s, 50 °C x 30 s, 72 °C x 2 min); 72 °C x 5 min	Chen <i>et al.</i> , 2012
gL3920c	TCATGCTCATSAGRATAAATYTCTCT			
gL3637	CCTTTAACAGTDGAAACAT	810	95 °C x 2 min; 30 x (94 °C x 30 s, 50 °C x 30 s, 72 °C x 2 min); 72 °C x 5 min	Chu <i>et al.</i> , 2001
gL4435c	CATDGCRCGAAGARTGRTARACAGA			
gL3637	CCTTTAACAGTDGAAACAT	890	95 °C x 2 min; 30 x (94 °C x 30 s, 50 °C x 30 s, 72 °C x 2 min); 72 °C x 5 min	Chu <i>et al.</i> , 2001
gL4510c	TCATCRGARTGBACMATCCATCT			
<b>Detección específica de INSV</b>				
INSV-589	CCCAAGACACAGGATTTCA	589	95 °C x 2 min; 35 x (94 °C x 30 s, 54 °C x 30 s, 72 °C x 1 min); 72 °C x 5 min	Uga & Tsuda, 2005
TOS-R15	GGGAGAGCAATYGWGKYR			
<b>Subunidad 18S del ARN ribosómico de las plantas</b>				
18S-F	TCTGCCCGTTGCTCTGATGAT	193	95 °C x 1 min; 40 x (94 °C x 30 s, 55 °C x 30 s, 72 °C x 35 s); 72 °C x 5 min	Zhu <i>et al.</i> , 2012
18S-R	CCTTGGATGTGGTAGCCGTTT			

noDrop 2000C UV-Vis (ThermoScientific, EE. UU.) para garantizar una concentración adecuada para los pasos siguientes. Luego, preparamos el cADN de hebra simple a partir de 5 µL del ARN extraído para cada muestra, logrando un volumen final de reacción de 20 µL. Esta síntesis se realizó utilizando el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis o el kit Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, Lituania), utilizando hexámeros aleatorios. El cADN sintetizado se almacenó a -35 °C para su conservación. Para asegurar la integridad del cADN y verificar posibles inhibidores de la amplificación o degradación del ARN, utilizamos cebadores que apuntaban a un fragmento de 193 pb de la subunidad ribosomal ARN 18S de plantas, que sirve como gen de referencia para estudios

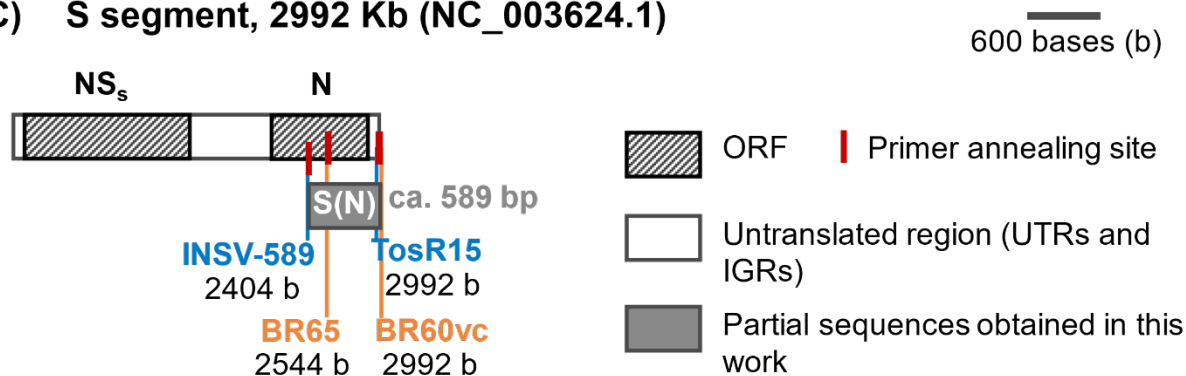
**A) L segment, 8776 Kb (NC\_003625.1)**



**B) M segment, 4972 Kb (NC\_003616.1)**



**C) S segment, 2992 Kb (NC\_003624.1)**



**Figura 1.** Representación de las posiciones de anillamiento de los pares de cebadores en referencia al genoma completo de *Impatiens necrotic spot virus*; números de accesoión entre paréntesis para cada segmento del genoma. Traslape entre cebadores y secuencias finales parciales obtenidas en esta investigación (rectángulos grises) con el tamaño esperado (pb). Los valores de pares de bases debajo de cada cebador representan las posiciones del primer y último nucleótido en el genoma de referencia del amplicon correspondiente.



de expresión génica en plantas (citado de Zhu *et al.*, 2012). Las mezclas de PCR, con un total de 25  $\mu$ L cada una, incluyeron 2  $\mu$ L del cADN sintetizado, 12.5  $\mu$ L de DreamTaq PCR Master Mix 2X (Thermo Scientific) y 200 nM de cada cebador. Las condiciones exactas de termociclado para cada par de cebadores se ajustaron según las especificaciones indicadas en el Cuadro 2, utilizando termocicladores avanzados como PTC-200 (MJ Research, Canadá), MJ Mini (BioRad, Singapur) y Corbett Research CG1-96 (Corbett Life Science, Australia). Después de la PCR, los productos se visualizaron en un transiluminador de luz UV (55W, BXT-26M, Uvitec, Francia). Esto se hizo después de la electroforesis en un gel de agarosa al 1 % con tampón TAE 1X, y el gel se tiñó con GelRed 10000X (Biotium Inc., EE.UU.) incorporado en el tampón de carga (6X Thermo Scientific) para una visualización óptima. Para capturar una instantánea genética completa, se emplearon varios pares de cebadores para secuenciar diferentes segmentos del genoma de *orthospovirus*: pequeño (S), mediano (M) y grande (L). Este enfoque, que a veces implicaba amplicones superpuestos (como se muestra en la Figura 1), nos permitió obtener secuencias parciales de cuatro ORFs distintos de orthospovirus (ilustrados en la Figura 1): el segmento S(N), el segmento M(NSM), el segmento M(G) y el segmento L(L). Estas secuencias abarcan regiones críticas como la nucleocápside, la proteína de movimiento, el precursor de la glicoproteína y la ARN polimerasa dependiente del ARN, ofreciendo una comprensión más profunda de la estructura genética del virus.

### **Análisis del virus de la mancha necrótica de *Impatiens*: secuenciación y construcción de redes de haplotipos**

**Proceso de secuenciación.** Se realizó la secuenciación directa de todos los amplicones derivados del subconjunto seleccionado de 20 muestras, previamente identificadas como positivas para INSV mediante ELISA. Esta secuenciación, realizada en direcciones tanto hacia adelante como hacia atrás, empleó los mismos pares de cebadores utilizados en las amplificaciones por PCR. MacroGen Inc. (Corea) fue responsable de la purificación y secuenciación de estos productos de PCR. Las secuencias resultantes se ensamblaron cuidadosamente y se editaron meticulosamente utilizando el software BioEdit (versión 7.2.5). Las secuencias obtenidas se archivaron en la base de datos GenBank, un repositorio mantenido por el Instituto Nacional de Salud. Nuestra estrategia para analizar las relaciones filogenéticas de INSV implicó la obtención de secuencias representativas de diversas ubicaciones geográficas y plantas hospederas de GenBank. Empleamos una estrategia de búsqueda específica centrada en “*Impatiens necrotic spot*”, categorizando las secuencias por sus respectivos segmentos genómicos: S, M y L. Se construyeron árboles filogenéticos iniciales para cada una de las regiones genómicas amplificadas: S(N),

M(NSM), M(G) y L(L). Esta fase incluyó la incorporación de secuencias relevantes disponibles en GenBank. Los modelos de sustitución de ADN se seleccionaron meticulosamente para ajustarse a nuestros análisis filogenéticos, que ejecutamos utilizando el software MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). Sin embargo, las construcciones filogenéticas iniciales no revelaron patrones de agrupación definitivos ni robustos. En nuestra búsqueda de una comprensión más detallada de la diversidad de INSV a escala global, alineamos las secuencias S(N) de nuestro estudio con 81 secuencias de INSV recuperadas de GenBank, centrándonos en un segmento de 261 pb del ORF N. Esta alineación se llevó a cabo utilizando el algoritmo MUSCLE y se perfeccionó recortando los sobresalientes de las secuencias para garantizar uniformidad. Con el software DnaSP6 (Rozas *et al.*, 2017), realizamos una determinación exhaustiva de haplotipos y un análisis de población en este conjunto de datos, que abarcó 79 aislados (excluyendo dos debido a datos geográficos faltantes). Las secuencias se categorizaron cuidadosamente por países o regiones para un análisis detallado. Para visualizar las relaciones genéticas y variaciones entre estos aislados de INSV, construimos una red de haplotipos. Esto se logró utilizando el software PopART (Análisis Poblacional con Árboles Reticulados, <http://popart.otago.ac.nz>), aplicando el método de inferencia de red TCS (Clement *et al.*, 2000) para mapear las conexiones intrincadas entre los diversos haplotipos. En un análisis posterior más detallado, alineamos y concatenamos diferentes regiones del genoma de INSV que se amplificaron y secuenciaron con éxito en la misma muestra. Este análisis incluyó doce muestras de Costa Rica (donde se obtuvieron datos de secuencia para las cuatro regiones objetivo) y cinco muestras internacionales de INSV con genomas completos disponibles. La alineación integral, que abarcaba 2,945 posiciones, se sometió a un análisis de Máxima Verosimilitud utilizando un modelo Tamura de 3 parámetros con variación de tasa distribuida gamma (+G), y este proceso involucró 2,000 permutaciones en el software MEGA X. Los análisis se llevaron a cabo para todos los segmentos genómicos, tanto como sin la inclusión del virus de la mancha anular del tomate (TSWV) como grupo externo, utilizando sus secuencias de referencia (S: NC\_002051; M: NC\_002050; y L: NC\_002052) con fines comparativos.

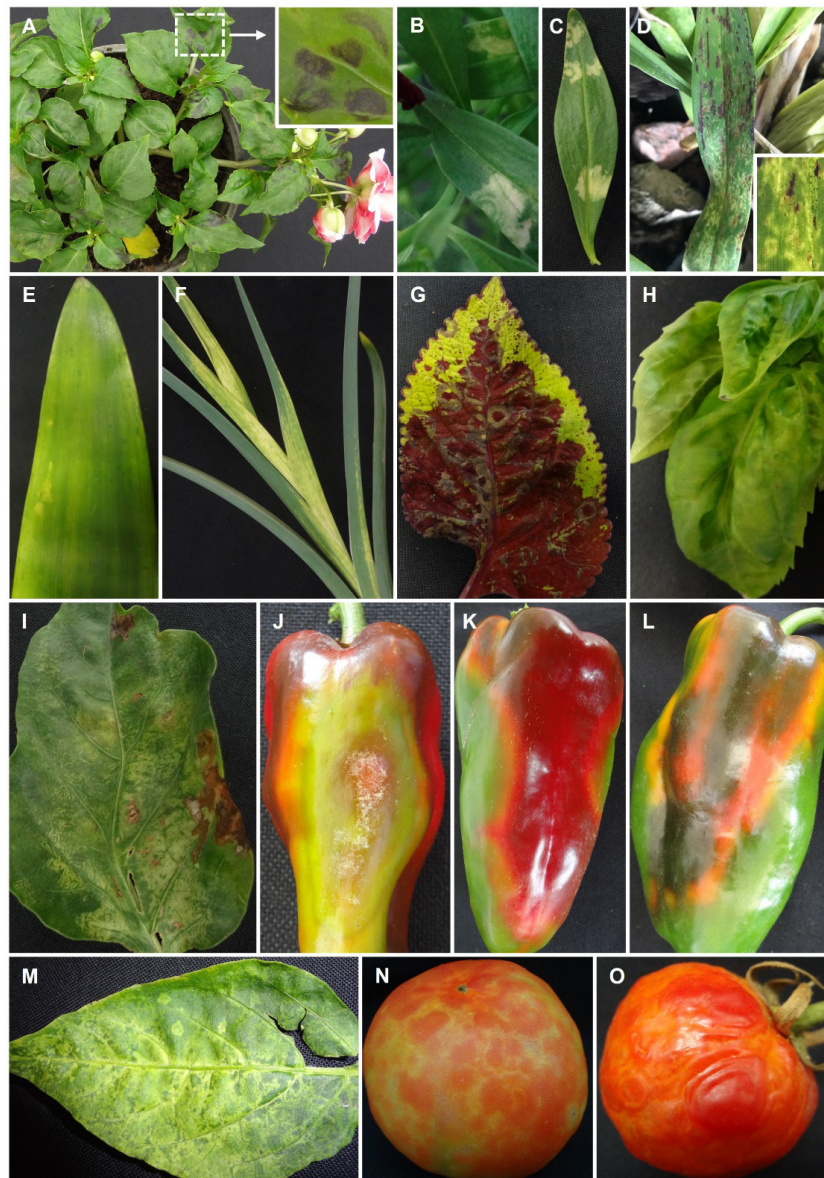
## RESULTADOS

**Análisis ELISA y síntomas observados.** Las pruebas de ELISA identificaron INSV e IYSV en las muestras, siendo INSV relativamente común en Costa Rica (58 de 295 muestras). Notablemente, no se detectaron TSWV y el serogrupo que comprende GRSV y TCSV. INSV se encontró en 12 de las 39 especies de plantas evaluadas, incluyendo pimiento (*Capsicum annuum*), cebolla (*Allium cepa*), tomate

(*Solanum lycopersicum*) e iris (*Iris* sp.), que tuvo el mayor número de muestras positivas (Cuadro 3). Los síntomas comunes asociados con INSV incluyeron anillos y manchas cloróticas o necróticas, así como patrones de anillos cloróticos (Figura 2). IYSV se detectó exclusivamente en 10 muestras de hojas de cebolla.

**Análisis longitudinal de la aparición de TSWV e INSV.** Nuestra investigación sobre la presencia histórica del virus del marchitamiento moteado del jitomate (TSWV) y el virus de la mancha necrótica de la impatiens (INSV) en Costa Rica fue motivada por la ausencia de TSWV en nuestros estudios recientes de muestras y por el hecho de que las únicas ocurrencias documentadas de TSWV en el país se informaron en 1990 (Rivera *et al.*, 1990) y 1991 (Hsu and Lawson, 1991). Para profundizar en este asunto, se revisó los datos de los registros de servicios de la clínica de diagnóstico desde el año 2000 hasta julio de 2023. Estos registros consistieron principalmente en plantas ornamentales destinadas a la exportación o importación, pero también incluyeron muestras hortícolas de cultivadores que abarcaban desde pequeña hasta gran escala. Se analizaron un total de 1,027 muestras para TSWV y 1,889 para INSV. De estas, 43 muestras (4.2%) resultaron positivas para TSWV, y 290 muestras (15.4%) para INSV, según se determinó mediante DAS-ELISA utilizando anticuerpos comerciales (Cuadro 3). Es destacable que entre 2008 y 2010, el número anual de muestras positivas para INSV superó las 50. En contraste, la cantidad de muestras positivas para TSWV se mantuvo por debajo de diez cada año. Después de 2015, la frecuencia de detección de ambos virus disminuyó significativamente. A lo largo de los 23.5 años abordados en el análisis, TSWV se detectó solo en 11 años, mientras que INSV se detectó en 17 años, como se muestra en la Figura 3. Esta tendencia destaca los cambios en los patrones de prevalencia viral y subraya la necesidad de una vigilancia continua.

**Confirmación por RT-PCR de la aparición de INSV.** Los análisis de RT-PCR confirmaron la presencia de INSV en nueve taxones de plantas diferentes: *Antirrhinum majus*, *Capsicum annuum*, *Hippeastrum*, *Impatiens*, *Iris*, *Ocimum basilicum*, *Plectranthus scuttellarioides*, *Solanum lycopersicum* y el híbrido artificial de orquídea Bakerara. Todas las especies de plantas que resultaron positivas para INSV mediante ELISA también arrojaron resultados positivos en pruebas de RT-PCR utilizando al menos dos pares de cebadores diferentes, seguidos de secuenciación (como se muestra en la Figura 1 y la Cuadro 4). Excepciones a esto incluyeron *Browallia* sp., *Eustoma* sp. y muestras de cebolla. Las plantas de *Browallia* y *Eustoma*, lamentablemente, se marchitaron y murieron en nuestro invernadero antes de que pudiéramos recolectar muestras de tejido para la extracción de ARN, impidiendo su prueba mediante RT-PCR. Además, las muestras de cebolla no fueron sometidas a pruebas de RT-PCR, ya que la presencia de IYSV en estas muestras ya



**Figura 2.** Síntomas diversos del virus del anillado necrótico de la impatiens (INSV) en múltiples huéspedes confirmados por ELISA, RT-PCR y secuenciación parcial. A: Anillos concéntricos necróticos en Impatiens (*Impatiens* sp.) T031. B, C: Anillos y manchas cloróticas en Boca de Dragón (*Antirrhinum majus*) T057. D: Estrías cloróticas y necróticas en hojas de orquídea T024. E, F: Mosaico clorótico en Amarilis (*Hippeastrum* sp.) T161 e Iris (*Iris* sp.) T184. G: Anillos concéntricos necróticos en Coleo (*Plectranthus scutellarioides*) T157. H: Patrones cloróticos en Albahaca (*Ocimum basilicum*) T156. I, M: Patrones de anillos concéntricos cloróticos en hojas de Pimiento Dulce (*Capsicum annuum*) T250 y T092. J, K, L: Maduración irregular, patrones de anillos y deformación en frutos de Pimiento Dulce T092, T107, T094. N, O: Patrones cloróticos, anillos y superficie irregular en frutos de Tomate (*Solanum lycopersicum*) T263 y T303.

**Cuadro 3.** Número total de muestras positivas por especie vegetal evaluadas por la técnica de ELISA para detectar tres orthotospovirus en Costa Rica.

Hospedante (Nombre común)	No. de muestras	N° de muestras positivas <sup>y</sup>			
		INSV	IYSV	TSWV	GRSV/ TCSV
<b>Amaryllidaceae</b>					
<i>Allium cepa</i> (cebolla)	38	6	10	0	0
<i>Allium sativum</i> (ajo)	2	0	0	0	0
<i>Hippeastrum</i> sp. (“amarilis”)	1	1	0	0	0
<i>Tulbaghia violaceae</i> (ajillo)	1	0	0	0	0
<b>Anacardiaceae</b>					
<i>Spondias purpurea</i> (jocote)	1	0	0	0	0
<b>Apocynaceae</b>					
<i>Mandevilla</i> sp. (dipladenia)	1	0	0	0	0
<i>Trachelospermum jasminoides</i> (jazmin estrella)	1	0	0	0	0
<i>Cataranthus roseus</i> (vinca)	4	0	0	0	0
<b>Asparagaceae</b>					
<i>Ornithogalum</i> sp. (estrella de Belén)	1	0	0	0	0
<b>Asteraceae</b>					
<i>Lactuca sativa</i> (lechuga)	6	0	0	0	0
<b>Balsaminaceae</b>					
<i>Impatiens</i> sp. (impatiens)	7	3	0	0	0
<b>Caricaceae</b>					
<i>Carica papaya</i> (papaya)	5	0	0	0	0
<b>Cucurbitaceae</b>					
<i>Citrullus lanatus</i> (sandía)	2	0	0	0	0
<i>Cucumis melo</i> (melón)	13	0	0	0	0
<i>Cucumis sativus</i> (pepino)	1	0	0	0	0
<i>Cucurbita pepo</i> (calabaza, zucchini)	2	0	0	0	0
<i>Sechium edule</i> (chayote)	1	0	0	0	0
<i>Sechium tacaco</i> (tacaco)	1	0	0	0	0
<b>Fabaceae</b>					
<i>Arachis pintoi</i> (frijol pinto)	3	0	0	0	0
<i>Phaseolus vulgaris</i> (frijol)	4	0	0	0	0
<b>Gentianaceae</b>					
<i>Eustoma</i> sp. (lisianthus)	3	3	0	0	0
<b>Iridaceae</b>					
<i>Iris</i> sp. (iris)	4	4	0	0	0
<b>Lamiaceae</b>					
<i>Ocimum basilicum</i> (albahaca)	1	1	0	0	0
<i>Plectranthus scutellarioides</i> (coleo)	2	2	0	0	0
<b>Liliaceae</b>					
<i>Lilium</i> sp. (lirios)	2	0	0	0	0
<b>Malvaceae</b>					
<i>Gossypium hirsutum</i> (algodón)	1	0	0	0	0
<i>Hibiscus</i> sp. (hibiscus)	4	0	0	0	0
<b>Orchidaceae</b>					
Several species and hybrids <sup>z</sup> (orquidea)	45	1	0	0	0
<b>Oxalidaceae</b>					
<i>Oxalis</i> sp.	2	0	0	0	0

**Cuadro 3.** Continúa...

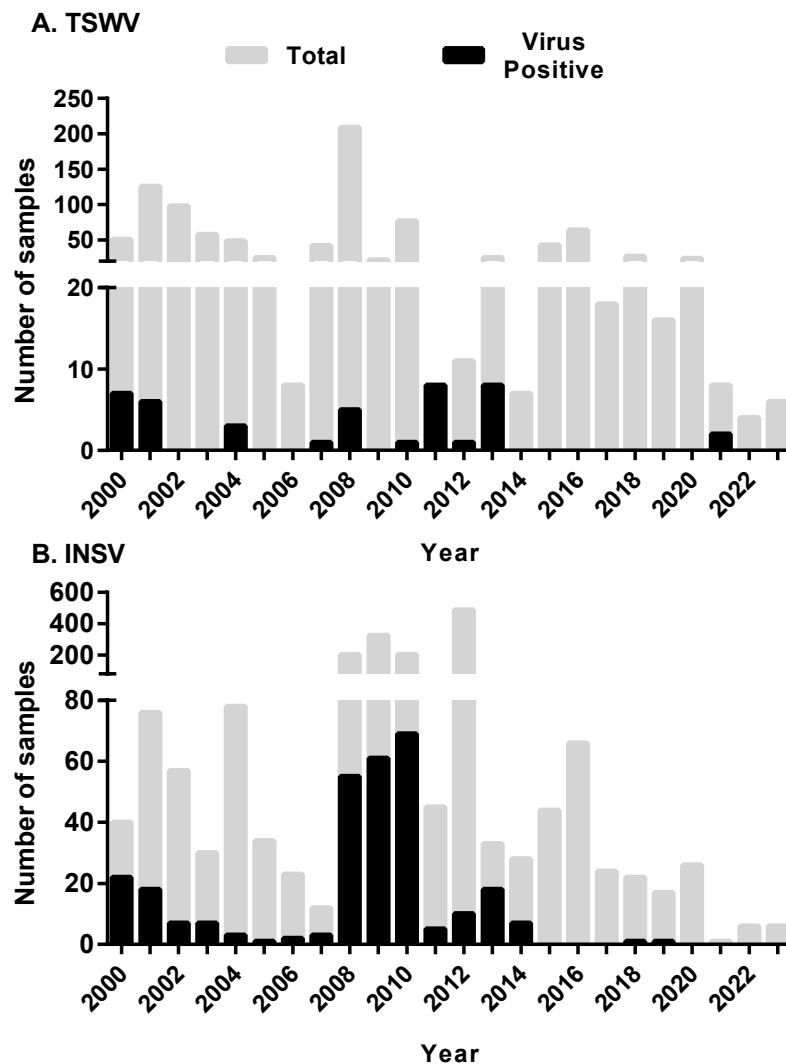
Hospedante (Nombre común)	No. de muestra	Nº de muestras positivas <sup>y</sup>			GRSV/ TCSV
		INSV	IYSV	TSWV	
<b><i>Plantaginaceae</i></b>					
<i>Antirrhinum majus</i> (boca de dragón)	2	2	0	0	0
<b><i>Rosaceae</i></b>					
<i>Fragaria x ananassa</i> (fresa)	2	0	0	0	0
<b><i>Solanaceae</i></b>					
<i>Browallia</i> sp. (violeta de arbusto)	2	1	0	0	0
<i>Calibrachoa</i> sp. (calibracoa)	4	0	0	0	0
<i>Capsicum annuum</i> (pimiento, chile dulce)	68	30	0	0	0
<i>Petunia</i> sp. (petunia)	14	0	0	0	0
<i>Solanum lycopersicum</i> (jitomate)	37	4	0	0	0
<i>Solanum melongena</i> (berenjena)	1	0	0	0	0
<i>Solanum quitoense</i> (naranjilla, lulo)	1	0	0	0	0
<i>Solanum tuberosum</i> (papa)	4	0	0	0	0
<b><i>Zingiberaceae</i></b>					
<i>Hedychium</i> sp.	1	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>295</b>	<b>58</b>	<b>10</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

<sup>y</sup>Muestras que se probaron para detectar: *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), *Iris yellow spot virus* (IYSV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) o el serogrupo *Groundnut ring spot virus/Tomato chlorosis spot virus* (GRST/TCSV).

<sup>z</sup>Las muestras de orquídeas incluían diferentes géneros e híbridos, por lo que se enumeran conjuntamente como familia Orchidaceae. La muestra positiva correspondía a una planta del género híbrido *Bakerara*.

se había confirmado en un estudio anterior (Montero-Astúa *et al.*, 2017). En total, obtuvimos y editamos con éxito 72 secuencias parciales finales o contigs. Estas incluyeron 18 secuencias cada una para los genes de la nucleocápside y la proteína de movimiento, 20 para el gen del precursor de la glicoproteína y 16 para el gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp). Todas estas secuencias se han enviado a GenBank y se documentan en la Cuadro 4.

**Análisis de red de haplotipos.** En el análisis filogenético inicial de las secuencias de S(N), M(NSM), M(G) y L(L) de INSV, incluyendo secuencias de otros países, observamos la falta de conglomerados bien definidos (datos no mostrados). En consecuencia, dirigimos nuestra atención a un análisis de haplotipos del conjunto de datos de secuencias de S(N). Este conjunto de datos comprendía un segmento de 261 pb del ORF de la nucleocápside de los aislamientos de INSV disponibles globalmente en GenBank, junto con las 18 secuencias que obtuvimos en este estudio (Figura 4). En nuestro análisis de red de haplotipos, identificamos cuatro haplotipos distintos de la secuencia parcial del ORF de la nucleocápside en Costa Rica.



**Figura 3.** Detección a largo plazo de los virus del anillado necrótico del Impatiens y del marchitamiento manchado del jitomate por ELISA. Este gráfico muestra la frecuencia de detección tanto del Virus del anillado necrótico de la Impatiens como del Virus del marchitamiento manchado del jitomate a lo largo de un período de 23.5 años (2000 a julio de 2023). Los datos, obtenidos de muestras enviadas a los servicios de diagnóstico del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica, ilustran las tendencias temporales y los patrones de ocurrencia de estos virus en Costa Rica.

Entre ellos, un haplotipo destacó como predominante en el país, y curiosamente, también se encuentra en China, Japón, Europa y Corea. Los otros dos haplotipos, aunque menos prevalentes en Costa Rica, están más estrechamente relacionados con un haplotipo principal observado en Europa, Japón, Nueva Zelanda y Estados Unidos. Además, realizamos un análisis concatenado de cuatro regiones del ge-

**Cuadro 4.** Secuencias parciales nucleotídicas e identidad viral determinada para un subgrupo de muestras positivas por ELISA para INSV.

Hospedante	ID	Sitio <sup>w</sup> , provincia	Secuencia <sup>x</sup> identificación <sup>y</sup>			
			S(N)	M(NS <sub>M</sub> )	M(G)	L(L)
<i>Antirrhinum majus</i>	T057	D, Cartago	MH687991	MH673625	MH673643	MH487473
<i>Capsicum annuum</i>	T092	N, Alajuela	MH687992	MH673626	MH673644	MH487474
	T093	M, Alajuela	MH687993	MH673627	MH673645	MH487475
	T094	M, Alajuela	MH687994	MH673628	MH673646	MH487476
	T096	M, Alajuela	MH687995	MH673629	MH673647	MH487477
	T107	N, Alajuela	MH687996	MH673630	MH673648	MH487479
	T109	N, Alajuela	MH687997	MH673631	MH673649	MH487480
	T245	II, Cartago	MH688003	MH673638	MH673657	MH487487
	T250	II, Cartago	MH688004	MH673639	MH673658	MH487488
	T251	II, Cartago	MH688005	MH673640	MH673659	MH487489
<i>Hippeastrum</i> sp.	T161	D, Cartago	MH688001	MH673635	MH673653	MH487483
<i>Impatiens</i> sp.	T031	C, Alajuela	MH687990	MH673624	MH673642	MH487472
<i>Iris</i> sp.	T184	CC, Cartago	--- <sup>z</sup>	MH673636	MH673654	MH487484
	T186	CC, Cartago	--- <sup>z</sup>	MH673637	MH673655	MH487486
<i>Ocimum basilicum</i>	T156	D, Cartago	MH687998	MH673632	MH673650	--- <sup>z</sup>
Orchid	T024	B, Alajuela	MH687989	MH673623	MH673641	--- <sup>z</sup>
<i>Plectranthus</i>	T157	D, Cartago	MH687999	MH673633	MH673651	MH487481
<i>scutellarioides</i>	T158	D, Cartago	MH688000	MH673634	MH673652	MH487482
	T263	O, San José	MH688006	--- <sup>z</sup>	MH673660	--- <sup>z</sup>
<i>Solanum lycopersicum</i>	T303	O, San José	MH688007	--- <sup>z</sup>	MH673661	--- <sup>z</sup>
Total (n)	20	8, 3	18	18	20	16

<sup>w</sup> Códigos de letras diferentes distinguen campos independientes, invernaderos, parques o jardines.

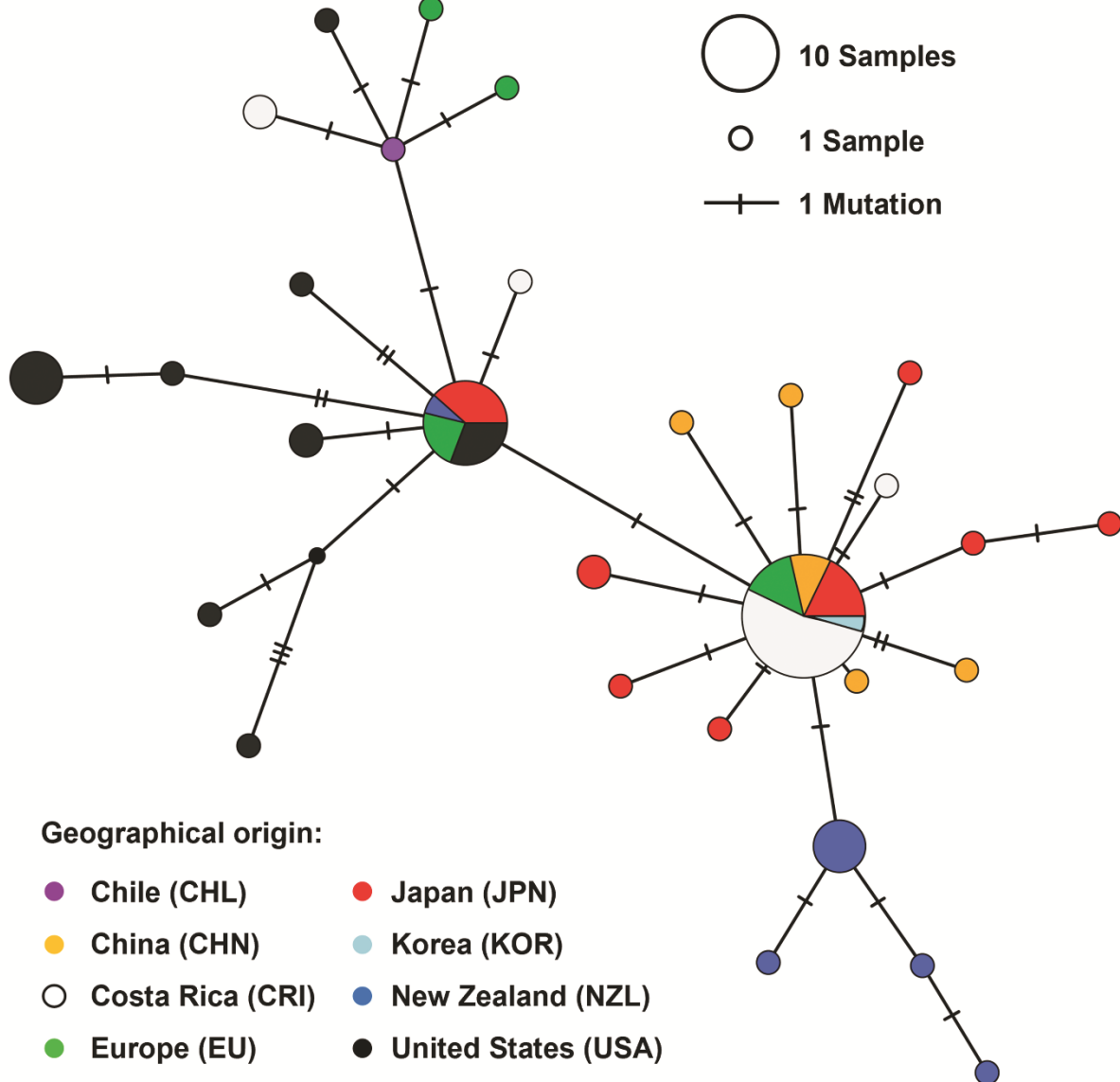
<sup>x</sup> Secuencias correspondientes a fragmentos parciales de los segmentos de genoma S, M y L de orthospovirus obtenidas de uno o varios pares de cebadores (contiguo), como se muestra en la Figura 1. S(N), secuencia parcial del ORF de la nucleocápside y regiones 3'-UTR del segmento de genoma S. M(NSM), secuencia parcial del ORF de la proteína de movimiento (NSM). M(G), secuencia parcial del ORF del precursor de la glicoproteína. Y L(L), una región interna del ORF de la polimerasa (RdRp) en el segmento de genoma L.

<sup>y</sup> Especies de virus vegetal determinadas por el primer resultado BLAST (GenBank, Centro Nacional de Información Biotecnológica, EE. UU.) y un porcentaje de identidad >97%.

<sup>z</sup> ---, no hay secuencia disponible porque: (i) no hubo amplificación en RT-PCR; alternativamente, (ii) se generó un amplicón pero la reacción de secuenciación falló (uno o ambos cebadores) o produjo solo una secuencia del hospedero vegetal (amplificación inespecífica).

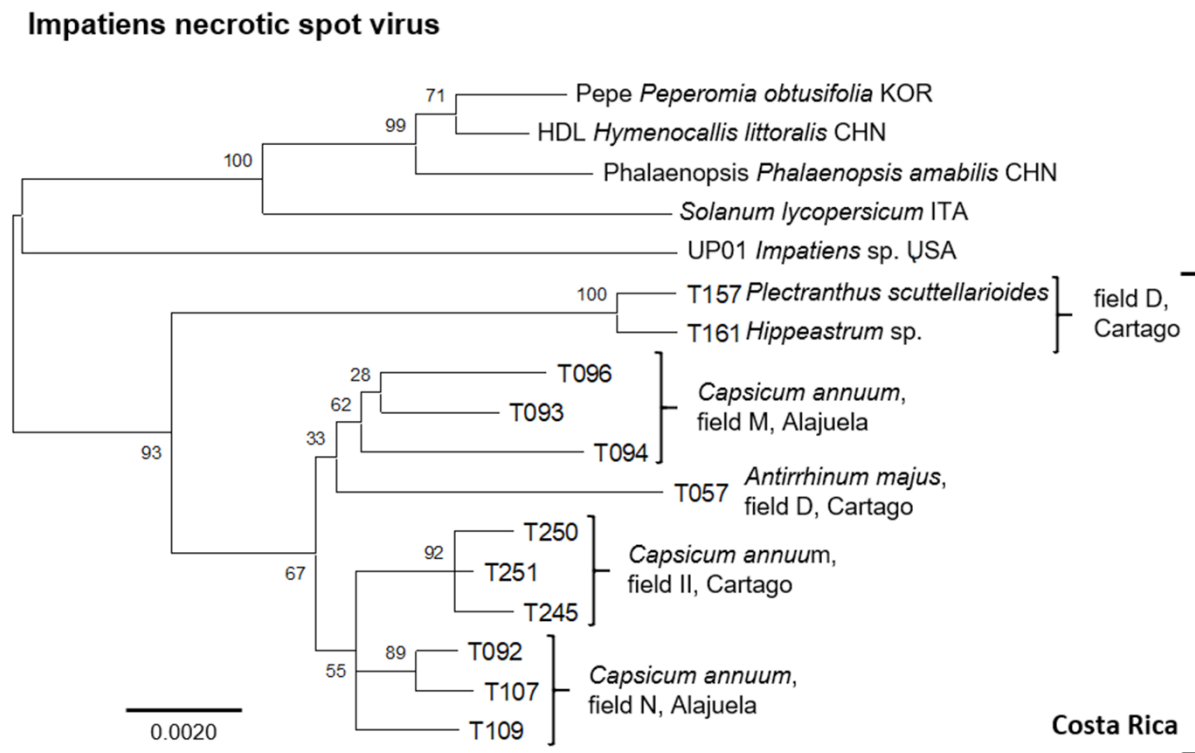
noma (segmentos del genoma S, M y L) que amplificamos y secuenciamos. Este análisis incluyó 12 muestras de Costa Rica y cinco genomas de INSV disponibles en GenBank (ilustrados en la Figura 5). Los resultados mostraron que las muestras de INSV de Costa Rica se agruparon juntas, claramente separadas de las secuencias de referencia. Es importante señalar que las estructuras de subgrupos de las muestras de Costa Rica se alinearon generalmente con sus lugares geográficos de origen. Este hallazgo indicó una mayor diversidad dentro de la población de INSV en Costa Rica en comparación con lo sugerido por la red de haplotipos. En el árbol





**Figura 4.** Gráfico de la Red de Haplotipos del Virus del anillado necrótico de la impatiens. Este gráfico representa una red de haplotipos inferida mediante el método TCS, basada en un alineamiento de secuencias de 261 bp del ORF de la proteína nucleocápside (segmento S[N]) del Virus del anillado necrótico de la impatiens. La red incluye datos de 81 aislados, representando visualmente las relaciones genéticas y la diversidad entre los diferentes haplotipos del virus.

filogenético, las ramas y nodos delimitaron claramente las diferencias entre los 12 aislamientos costarricenses incluidos en nuestro estudio (Figura 5). Esta variación en la diversidad genética destaca la naturaleza compleja de la propagación y evolución de INSV en diferentes regiones geográficas.



**Figura 5.** Análisis filogenético integral de aislados del virus del anillado necrótico de la impatiens. Esta figura muestra un árbol filogenético construido a partir de un alineamiento de secuencias concatenadas (2945 posiciones) que incluyen regiones del nucleocápside [S(N)], precursor de la glicoproteína [M(G)], proteína de movimiento [M(NSM)] y ORFs de la polimerasa viral [L(L)]. El árbol incluye aislados de varios países, identificados por códigos de tres letras según ISO 3166-1: CHN (China), ITA (Italia), KOR (Corea del Sur) y USA (Estados Unidos de América). Para los aislados de Costa Rica, códigos de letras adicionales y distintos entre paréntesis indican ubicaciones geográficas independientes. El análisis, realizado en MEGA X, utilizó el método de Máxima Verosimilitud con un modelo de parámetro Tamura-3 y una tasa de variación en nucleótidos distribuida gamma (+G), con 2000 permutaciones. La barra de escala indica el número de sustituciones de nucleótidos por sitio.

## DISCUSIÓN

En este estudio, se centró en la presencia histórica de TSWV e INSV en Costa Rica, motivados por la ausencia de TSWV en las muestras recientes y solo informes esporádicos de TSWV que datan de 1990 y 1991. Nuestro análisis de los registros de los servicios de la clínica de diagnóstico, que abarcan el período desde 2000 hasta julio de 2023, reveló una baja ocurrencia de TSWV, con períodos alternantes sin detección. Este patrón se alinea con las tendencias globales que sugieren fluctuaciones cíclicas en las ocurrencias de TSWV, según indican Tentchev *et al.* (2011) y discuten más a fondo Kaye *et al.* (2011) en relación con la dinámica poblacional

de TSWV en los cultivos de cacahuete en Carolina del Norte y Virginia. Estas dinámicas pueden estar influenciadas por varios factores, incluida la biología del vector, las preferencias de alimentación de los trips y las medidas de control dirigidas específicamente contra TSWV implementadas previamente en Costa Rica. Los cambios recientes en las poblaciones de vectores y la competencia entre especies de moscas blancas, como se señala en estudios de Can-Vargas *et al.* (2020) y Valverde-Méndez *et al.* (2023), también podrían contribuir a estas tendencias observadas.

Cabe destacar que en este estudio no detectó el serogrupo de orthospovirus GRSV/TCSV, sugiriendo su ausencia en la región continental del Caribe en América Central. Esto a pesar de su prevalencia en las islas del Caribe. El uso de cebadores degenerados de orthospovirus en este estudio, no identificaron virus distintos a INSV, indicando una posible falta de diversidad entre los orthospovirus en Costa Rica. La encuesta realizada entre 2013 y 2014, subraya la necesidad de una vigilancia continua para monitorear posibles introducciones de nuevas especies de orthospovirus.

Estos hallazgos establecen a INSV como un orthospovirus prevalente en Costa Rica, en contraste con su aparente ausencia en otros países de América Central. Esta discrepancia probablemente refleje una brecha en la investigación regional de orthospovirus en lugar de una ausencia real del virus. Estudios previos han identificado dos clados distintos de aislamientos de INSV, los clados del Hemisferio Occidental y Asiático. Nuestro análisis de la red de haplotipos, basado en una secuencia parcial del nucleocápside, sugiere la presencia de dos haplotipos principales y varios nodos secundarios, con la mayoría de las secuencias costarricenses alineadas con el clado asiático propuesto. Esta observación indica al menos dos introducciones separadas de INSV en Costa Rica. Además, nuestros resultados sugieren un agrupamiento geográfico de los aislamientos de INSV dentro de Costa Rica, con evidencia de diferenciación genética basada en el lugar de origen. Esto está en línea con hallazgos de estudios anteriores, que también indicaron una tendencia de los aislamientos de INSV a agruparse geográficamente y reportaron una diversidad genética limitada dentro de las poblaciones locales de INSV.

Este estudio subraya la necesidad de más investigaciones para evaluar con precisión la diversidad genética de la población de INSV en Costa Rica. Tales esfuerzos son cruciales para comprender la epidemiología de los orthospovirus en la región y para desarrollar estrategias efectivas de manejo.

## CONCLUSIONES

La encuesta exhaustiva realizada en 2013 y 2014 en toda Costa Rica ha proporcionado ideas significativas sobre la prevalencia y diversidad de orthospovirus en

la región. El virus de la mancha necrótica del *impatiens* (INSV) se detectó en un número considerable de muestras (58 de 295) analizadas mediante ELISA. El virus exhibió un amplio rango de hospederos, afectando a 13 taxones diferentes, incluyendo *Allium cepa*, *Capsicum annuum* y *Solanum lycopersicum*, entre otros. Por otro lado, el virus de la mancha amarilla del iris (IYSV) solo se identificó en diez muestras de cebolla. Cabe destacar que en este estudio no se detectaron el virus del bronceado del tomate (TSWV), el virus de la mancha anular del cacahuete (GRSV) y el virus de la mancha clorótica del tomate (TCSV). Sin embargo, los datos históricos confirman la presencia de TSWV en Costa Rica, con una disminución notada en las solicitudes de detección y las ocurrencias a lo largo del tiempo.

El análisis basado en un fragmento de la secuencia del nucleocápside indicó una baja diversidad de INSV en Costa Rica, con solo cuatro haplotipos identificados entre las 20 muestras analizadas. Un análisis más profundo, que incluyó regiones concatenadas de los segmentos del genoma S, M y L, sugirió una variabilidad relativamente mayor de INSV dentro del país. Esta discrepancia subraya la necesidad de un muestreo y análisis adicionales para determinar con precisión la diversidad genética de INSV en Costa Rica.

Estos datos sugieren la presencia de dos linajes de INSV en Costa Rica: los linajes asiáticos y del Hemisferio Occidental. Esta hipótesis concuerda con los patrones de distribución global de INSV e indica la ocurrencia de múltiples eventos de introducción en la región. Dada la naturaleza dinámica del comercio internacional y el movimiento humano, se hace esencial llevar a cabo una encuesta actualizada y más extensa en todo el país para comprender la situación actual de los orthospovirus en Costa Rica. Además, existe una necesidad crítica de llevar a cabo investigaciones integrales en toda América Central. Estas investigaciones deben centrarse en descripciones de síntomas, listas de hospederos susceptibles e identificación de poblaciones de trips involucrados en la transmisión del virus, con el fin de comprender la epidemiología de los orthospovirus en la región. Obtener datos de secuencias será crucial para comprender las estructuras de población e identificar cepas potencialmente de alto riesgo, como aquellas capaces de superar la resistencia. Esta información es vital para desarrollar estrategias que controlen la introducción y propagación de cepas y especies virales específicas en la región. Estrategias efectivas de gestión, que incluyan inspecciones aduaneras, medidas de cuarentena y colaboración regional, son imperativas para mitigar el impacto de estos virus en la agricultura en América Central.

En conclusión, nuestro estudio destaca la importancia del monitoreo continuo, la investigación y la cooperación regional en la gestión de los orthospovirus, un paso crucial hacia la sostenibilidad y productividad agrícola en América Central.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los agricultores que nos proporcionaron tejido vegetal sintomático o nos permitieron recolectar muestras de sus campos o invernaderos. También expresamos nuestro agradecimiento a la Estación Experimental Jardín Botánico Lankester (JBL) y a la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno (EEFBM), ambas de la Universidad de Costa Rica, por permitirnos muestrear sus colecciones de orquídeas. Esta investigación fue financiada por la Universidad de Costa Rica (proyecto de investigación 801-B3-126 y actividad de investigación 801-A1-801).

## LITERATURA CITADA

- Adegbola RO, Fulmer AM, Williams B, Breneman TB, Kemeraït RC, Sheard W, Adkins S and Naidu RA. 2016. First report of the natural occurrence of *Tomato chlorotic spot virus* in peanuts in Haiti. *Plant Disease* 100:1797-1797. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0070-PDN>
- Adegbola RO, Marshall SH, Batuman O, Ullman DE, Gilbertson RL, Adkins Sb and Naidu RA. 2019. Sequence analysis of the medium and small RNAs of *Impatiens necrotic spot virus* reveals segment reassortment but not recombination. *Archives of Virology* 164:2829-2836. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04389-5>
- Almeida MMS, Orílio AF, Melo FL, Rodríguez R, Feliz A, Cayetano X and Resende RO. 2014. The first report of *Tomato chlorotic spot virus* (TCSV) infecting long beans and chili peppers in the Dominican Republic. *Plant Disease* 98:1285-1285. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0348-PDN>
- Bag S, Schwartz HF, Cramer CS, Havey MJ and Pappu HR. 2015. Iris yellow spot virus (Tospovirus: Bunyaviridae): From obscurity to research priority. *Molecular Plant Pathology* 16:224-237. <https://doi.org/10.1111/mpp.12177>
- Batuman O, Rojas MR, Almanzar A and Gilbertson RL. 2014. First report of Tomato chlorotic spot virus in processing tomatoes in the Dominican Republic. *Plant Disease* 98:286-286. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0685-PDN>
- Batuman O, Turini TA, Oliveira PV, Rojas MR, Macedo M, Mellinger HC, Gilbertson RL. 2017. First report of a resistance-breaking strain of *Tomato spotted wilt virus* infecting tomatoes with the Sw-5 tospovirus-resistance gene in California. *Plant Disease* 101:637-637. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1371-PDN>
- Can-Vargas X, Barboza N, Fuchs EJ and Hernández EJ. 2020. Spatial distribution of whitefly species (Hemiptera: Aleyrodidae) and identification of secondary bacterial endosymbionts in tomato fields in Costa Rica. *Journal of Economic Entomology* 113(6):2900-2910. <https://doi.org/10.1093/jee/toaa215>
- Chen TC, Li JT, Lin YP, Yeh YC, Kang YC, Huang LH and Yeh SD. 2012. Genomic characterization of *Calla lily chlorotic spot virus* and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses. *Plant Pathology* 61:183-194. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02484.x>
- Chu FH, Chao CH, Chung MH, Chen CC and Yeh SD. 2001. Completion of the genome sequence of Watermelon silver mottle virus and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. *Phytopathology* 91:361-368. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.4.361>
- Clement M, Posada D and Crandall KA. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x>
- Cumes Mantanico SY. 2008. Etiología, incidencia, severidad y distribución del tizón de crisantemo, en San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Tesis Licenciatura. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala. P. 54. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01\\_2395.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2395.pdf) (Accessed July 18, 2023).
- Dardón D, Calderón F, Salguero V, Lastra R and Brown J. 1994. Identificación de virus en el tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) en cinco departamentos de Guatemala. *Agronomía Mesoamericana* 5:109-117. <https://doi.org/10.15517/AM.V5I0.25076>

- Daughtrey ML, Jones RK, Moyer JW, Daub ME and Baker JR. 1997. Tospoviruses strike the greenhouse industry: INSV has become a major pathogen on flower crops. *Plant Disease* 81:1220-1230. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.11.1220>
- De Ávila AC, de Haan P, Kormelink R, Resende RdO, Goldbach RW and Peters D. 1993. Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *Journal of General Virology* 74:153-159. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-74-2-153>
- De Ávila AC, Haan PD, Kitajima EW, Kormelink R, Resende RDO, Goldbach RW and Peters D. 1992. Characterization of a distinct isolate of Tomato spotted wilt virus (TSWV) from *Impatiens* sp. in the Netherlands. *Journal of Phytopathology* 134:133-151. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1992.tb01222.x>
- De Jensen CE and Adkins S. 2014. First report of Tomato chlorotic spot virus in lettuce in Puerto Rico. *Plant Disease* 98:1015-1015. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1200-PDN>
- Doyle MM, Bermeo E, Aguilar E and Rueda A. 2002. Identificación de las infecciones virales en los principales cultivos hortícolas y malezas en 3 regiones de Honduras, 1998-2002. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. [http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2935/1/211395\\_0226.pdf](http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2935/1/211395_0226.pdf) (Accessed July 18, 2023).
- Eiras M, Resende RO, Missiaggia AA and Ávila ACD. 2001. RT-PCR and Dot Blot hybridization methods for a universal detection of tospoviruses. *Fitopatologia Brasileira* 26:170-175. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582001000200009>
- Espinoza Rivera M. 2012. Producción de plantas de crisantemo libres de virus utilizando termo terapia y cultivo de meristemos. 74p. Informe Final, Proyecto FODECYT No. 086-2006 Universidad del Valle de Guatemala. <https://fondo.senacyt.gob.gt/portal/index.php/catalogo/15-codigo/305-86-2006-biotecnologia> (Accessed February 10<sup>th</sup>, 2022).
- Gent DH, du Toit LJ, Fichtner SF, Mohan SK, Pappu HR and Schwartz HF. 2006. *Iris yellow spot virus*: An emerging threat to onion bulb and seed production. *Plant Disease* 90:1468-1480. <https://doi.org/10.1094/PD-90-1468>
- Hasegawa DK and Del Pozo-Valdivia AI. 2023. Epidemiology and economic impact of *impatiens necrotic spot virus*: a resurging pathogen affecting lettuce in the Salinas Valley of California. *Plant Disease* 107:1192-1201. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-22-1248-RE>
- Hsu HT and Lawson RH. 1991. Direct tissue blotting for detection of tomato spotted wilt virus in *Impatiens*. *Plant Disease* 75:292-295. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0292>
- Kaye AC, Moyer JW, Parks EJ, Carbone I and Cubeta MA. 2011. Population genetic analysis of *Tomato spotted wilt virus* on peanut in North Carolina and Virginia. *Phytopathology* 101:147-153. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-10-0035>
- Kuhn JH, Adkins S, Alkhovsky SV, Avšič-Županc T, Ayllón MA, Bahl J, Balkema-Buschmann A, Ballinger MJ, et al. 2022. 2022 taxonomic update of phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. *Archives of Virology* 167:2857-2906. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05546-z>
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C and Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kuo YW, Gilbertson RL, Turini T, Brennan EB, Smith RF and Koike ST. 2014. Characterization and epidemiology of outbreaks of *Impatiens necrotic spot virus* on lettuce in coastal California. *Plant Disease* 98:1050-1059. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0681-RE>
- Londoño A, Capobianco H, Zhang S and Polston JE. 2012. First record of Tomato chlorotic spot virus in the USA. *Tropical Plant Pathology* 37:333-338. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012005000001>
- Mandal B, Jain RK, Krishnareddy M, Krishna Kumar NK, Ravi KS and Pappu HR. 2012. Emerging problems of tospoviruses (*Bunyaviridae*) and their management in the Indian subcontinent. *Plant Disease* 96:468-479. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-11-0520>
- Martínez RT, Poojari S, Tolin SA, Cayetano X and Naidu RA. 2014. First report of Tomato spotted wilt virus in peppers and tomato in the Dominican Republic. *Plant Disease* 98:163-163. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0617-PDN>
- Martínez-Zubiar Y, Chang Sidorchuk L, González Alvarez H, Barboza Vargas N and González Arias G. 2016. First molecular evidence of *Tomato chlorotic spot virus* infecting tomatoes in Cuba. *Plant Disease* 100(9): 1956. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0082-PDN>
- Montero-Astúa M, Dejuk-Protti N, Vásquez E, Garita L and Moreira L. 2017. First report of *Iris yellow spot virus* in Costa Rica. *Australasian Plant Disease Notes* 12:18. <https://doi.org/10.1007/s13314-017-0243-8>

- Montero-Astúa M, Stafford-Banks CA, Badillo-Vargas IE, Rotenberg D, Ullman DE and Whitfield AE. 2016. Tospovirus-thrips biology. Pp. 289-308. In Brown JK (Ed.) Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens. APS press. 496p. <https://doi.org/10.1094/9780890545355>
- Naidu RA, Deom CM and Sherwood JL. 2005. Expansion of the host range of Impatiens necrotic spot virus to peppers. *Plant Health Progress* 6(1):28. <https://doi.org/10.1094/PHP-2005-0727-01-HN>
- Nekoduka S, Kobayashi K, Fuji S, Okuda M and Sano T. 2015. Molecular epidemiology of Impatiens necrotic spot virus on greenhouse ornamental plants in a local area of Japan. *Journal of General Plant Pathology* 81:429-438. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0615-x>
- Nischwitz C, Pappu HR, Mullis SW, Sparks AN, Langston DR, Csinos AS and Gitaitis RD. 2007. Phylogenetic analysis of *Iris yellow spot virus* isolates from onion (*Allium cepa*) in Georgia (USA) and Peru. *Journal of Phytopathology* 155:531-535. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01272.x>
- Palmieri M. 2012. Diagnóstico de la situación fitosanitaria del crisantemo y otras flores de corte y evaluación de planes emergentes de manejo integrado del cultivo en los municipios de San Pedro y San Juan Sacatepéquez, Guatemala. 114 p. Informe Final, Proyecto FODECYT 076-2006. Universidad del Valle de Guatemala y Universidad de San Carlos de Guatemala. <https://fondo.senacyt.gov.gt/portal/index.php/catalogo/15-codigo/297-76-2006-biotecnologia>. (Accessed July 28th, 2023)
- Pappu HR, Jones RAC and Jain RK. 2009. Global status of tospovirus epidemics in diverse cropping systems: Successes achieved and challenges ahead. *Virus Research* 141:219-236. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.01.009>
- Rivera C, Pereira R and Ramírez P. 1990. Identificación del marchitamiento moteado del tomate (TSWV) en *Impatiens walerana* en Costa Rica. *Turrialba* 40:562-568. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A0789e/A0789e04.html>
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE and Sánchez-Gracia A. 2017. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution* 34:3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
- Sharman M and Persley DM. 2006. Field isolates of *Tomato spotted wilt virus* overcoming resistance in capsicum in Australia. *Australasian Plant Pathology* 35:123-128. <https://doi.org/10.1071/AP06014>
- Smith TN, Wylie SJ, Coutts BA and Jones RAC. 2006. Localized distribution of *Iris yellow spot virus* within leeks and its reliable large-scale detection. *Plant Disease* 90:729-733. <https://www.dopi.org/10.1094/PD-90-0729>
- Sutula CL, Gillet JM, Morrissey SM and Ramsdell DC. 1986. Interpreting ELISA data and establishing the positive-negative threshold. *Plant Disease* 70:722-726. <https://doi.org/10.1094/PD-70-722>
- Tentchev D, Verdin E, Marchal C, Jacquet M, Aguilar JM and Moury B. 2011. Evolution and structure of Tomato spotted wilt virus populations: Evidence of extensive reassortment and insights into emergence processes. *Journal of General Virology* 92:961-973. <https://doi.org/10.1099/vir.0.029082-0>
- Uga H and Tsuda S. 2005. A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple tospovirus infections. *Phytopathology* 95:166-171. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0166>
- Valverde-Méndez K, Hernández EJ, Matamoros D and Barboza N. 2023. Begomovirus diversity in tomato crops in Costa Rica. *Annals of Applied Biology*. <https://doi.org/10.1111/aab.12850>
- Webster CG, Estévez de Jensen C, Rivera-Vargas LI, Rodrigues JCV, Mercado W, Frantz G, Mellinger HC and Adkins S. 2013. First report of Tomato chlorotic spot virus (TCSV) in tomato, pepper, and Jimsonweed in Puerto Rico. *Plant Health Progress* 14(1):47 <https://doi.org/10.1094/PHP-2013-0812-01-BR>
- Webster CG, Frantz G, Reitz SR, Funderburk JE, Mellinger HC, McAvoy E, Turechek WW, Marshall SH, Tantiwanich, Y, McGrath MT, Daughtrey ML and Adkins S. 2015. Emergence of *Groundnut ringspot virus* and *Tomato chlorotic spot virus* in vegetables in Florida and the southeastern United States. *Phytopathology* 105:388-398. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-14-0172-R>
- Zhao K, Margaria P and Rosa C. 2018. Characterization of the first complete genome sequence of an *Impatiens necrotic spot orthotospovirus* isolate from the United States and worldwide phylogenetic analyses of INSV isolates. *BMC Research Notes* 11:288 <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3395-5>
- Zhu X, Li X, Chen W, Chen J, Lu W, Chen L and Fu D. 2012. Evaluation of new reference genes in papaya for accurate transcript normalization under different experimental conditions. *PLoS ONE* 7(8): e44405. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044405>