

Universidad Autónoma de Baja California
Facultad de Ingeniería, Arquitectura y Diseño



Bioingeniería

“Estudio de una enfermedad emergente, potencial virosis, en el cultivo de chile en el Valle de la Trinidad, Baja California”

Presentado por:

Elisa Mendoza González

Directora del proyecto: Dra. Jimena Carrillo Tripp

Codirectora del proyecto: Dra. Dayanira Sheira Paniagua Meza

Ensenada, Baja California, 11 de diciembre de 2025



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y DISEÑO



“Estudio de una enfermedad emergente, potencial virosis, en el cultivo de chile en el Valle de la Trinidad, Baja California”

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Bioingeniera

PRESENTA

Elisa Mendoza González
368490

A quien el Comité de Tesis autoriza el trabajo terminal, después de haber efectuado una revisión minuciosa del mismo y de acuerdo con el Art. 19 del R.G.E.P.E.P, las y los señores profesores emiten los siguientes votos aprobatorios mediante rubrica:

Dra. Jimena Carrillo Tripp

DIRECTORA

Dra. Dayanira Sheira
Paniagua Meza
CODIRECTORA

Dr. David Cervantes
Vásquez
SINODAL

M.C. Idalia Montesinos
Solano
SINODAL

M.A. Clelia Macias
Rodríguez
SINODAL

“Por la Realización Plena del Ser”

Índice

Dedicatoria	7
Agradecimientos	8
Resumen	9
Abstract	10
Introducción	11
El cultivo de Chile.....	11
Enfermedades virales en plantas.....	13
Mecanismos de transmisión viral.....	16
Propagación vegetativa.....	16
Vectores biológicos.....	16
Transmisión mecánica.....	17
Medidas de control de enfermedades virales.....	18
Postulados de Koch y Rivers.....	20
Antecedentes	22
Virus en plantas solanáceas en México.....	22
<i>Virgaviridae</i>	22
<i>Tospoviridae</i>	23
<i>Geminiviridae</i>	23
<i>Potyviridae</i>	24
Descripción de la problemática de la región de Valle de la Trinidad.....	25
Justificación	26
Hipótesis	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	27
Metodología	28
Diagnósticos moleculares e inmunológicos.....	28
Extracción de ARN.....	28
Ensayos de RT-PCR.....	29
Pruebas Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	29
Enriquecimiento de material infectado para búsqueda de potenciales partículas virales.....	30
Microscopía electrónica de transmisión.....	31
Ensayos de transmisión mecánica.....	31
Resultados	35
Análisis descriptivo de la muestra de Chile.....	35
Descripción de la planta muestreada.....	35
Diagnósticos moleculares e inmunológicos.....	35
Resultados del enriquecimiento de material infectado para obtención de potenciales partículas virales.....	43
Prueba de postulados de Koch-Rivers mediante experimentos de transmisión mecánica.....	46
Réplica 1 de inoculación mecánica.....	46
Réplica 2 de inoculación mecánica.....	51
Réplica 3 de inoculación mecánica.....	55
Discusión	64
Conclusiones	71
Referencias	73
Anexo I. Preparación de buffers y soluciones	78

Índice de imágenes

Figura 1. La planta de chile (<i>Capsicum annum</i>) (Koehler, H., 1887).....	11
Figura 2. Comparativo de superficie y producción agrícola en Ensenada, B.C. en el periodo 2022-2024 (DGSIAP, 2025).....	13
Figura 3. Mecanismos de transmisión de virus en plantas. Modificado de Agrios, G. (2005).....	18
Figura 4. Estructura del virión de tobamovirus (Hulo, C. et al. 2011).....	22
Figura 5. Estructura del virión de tospovirus (Hulo, C. et al. 2011).....	23
Figura 6. Estructura del virión de begomovirus (Hulo, C. et al. 2011).....	24
Figura 7. Estructura del virión de potyvirus (Hulo, C., et al. 2011).....	24
Figura 8. Esquema de preparación del inóculo a partir de tejido vegetal sintomático utilizado para la metodología de inoculación mecánica.....	32
Figura 9. Esquema de inoculación mecánica.....	33
Figura 10. Síntomas detectados en la muestra proveniente de cultivos de chile en el Valle de la Trinidad.....	35
Figura 11. Gel 1.5% agarosa observado en transiluminador para identificar la posible presencia de ToBRFV en muestras de chile sospechosas. Se utilizó la escalera GeneRuler 1kB.....	36
Figura 12. Gel 1.5% agarosa observado en transiluminador para identificar la presencia de TSWV en muestras de chile sospechosas. Se utilizó la escalera GeneRuler 1kB.....	37
Figura 13. Gel 1.5% agarosa observado en transiluminador para identificar la presencia de tobamovirus en muestras de chile sospechosas. Se utilizó la escalera GeneRuler 1kB.....	38
Figura 14. Gel 1.5% agarosa observado en transiluminador para identificar la presencia de potyvirus en muestras de chile sospechosas. Se utilizó la escalera GeneRuler 1kB.....	39
Figura 15. Resultados obtenidos para la placa de prueba ELISA para TMV en muestras de tejido sintomático de chile.....	40
Figura 16. Resultados obtenidos para la placa de prueba ELISA para ToBRFV en muestras de tejido sintomático de chile.....	42
Figura 17. Pellet obtenido y su resuspensión como resultado de la purificación parcial de partículas virales.....	43
Figura 18. Micrografías electrónicas de transmisión de partículas virales observadas en tejido infectado de chile. Cuadros rojos: indican la posición exacta de la partícula que se muestra ampliada a la derecha, a una escala de 20 nm.....	44
Figura 19. Histograma de la distribución de los tamaños de partículas virales identificadas en las micrografías electrónicas de muestras de chile infectado.....	45
Figura 20. Comparación entre los grupos de tratamiento a los 4 dpi en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Cuadro rojo: enrollamiento en la hoja inoculada posteriormente abortada.....	46
Figura 21. Síntomas detectados en las plantas del grupo EPE 10 dpi en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Cuadro rojo: identificación de arrugamiento, marchitez, retraso en el crecimiento.....	47
Figura 22. Síntomas detectados en las plantas del grupo EPE 22 dpi en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Cuadro rojo: identificación de necrosis y senescencia.....	47
Figura 23. Contraste de los grupos control negativo y Mock 22 dpi en la réplica 1 de los experimentos de transmisión mecánica.....	48
Figura 24. Análisis del promedio de alturas de plantas de chile en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica indicando la desviación estándar (\pm DE) del promedio. La línea amarilla corresponde al control negativo (CN), la línea verde al tratamiento Mock, y la línea rosa a las plantas inoculadas con extracto de plantas enfermas (EPE). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba Tukey ($p < 0.05$): A = grupo con mayor promedio de altura, B = grupo con menor promedio de altura, AB = grupo sin diferencia con A y B.....	49
Figura 25. Análisis del promedio de longitud de hojas de chile en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica indicando la desviación estándar (\pm DE) del promedio. La	

línea verde corresponde al tratamiento Mock, y la línea rosa a las plantas inoculadas con extracto de plantas enfermas (EPE).Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba Tukey ($p<0.05$): A= grupo con mayor promedio de altura, B= grupo con menor promedio de altura.....	51
Figura 26. CN y Mock de la segunda réplica de inoculación mecánica a los 8 dpi de la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica.....	52
Figura 27. Síntomas identificados a los 8 dpi en los grupos de tratamiento correspondientes a la inoculación con stock de PV y sus diluciones en la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica.....	52
Figura 28. Síntomas identificados a los 8 dpi en los grupos de tratamiento EPE y sus diluciones en la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica.....	52
Figura 29. Análisis del promedio de alturas de plantas de chile en la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Las barras de error representan la desviación estándar (\pm DE) del promedio.....	54
Figura 30. Detección de insectos plaga en las plantas de la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica a los 8 dpi.....	55
Figura 31. Grupos de CN y Mock a los 8 dpi de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica.....	56
Figura 32. Síntomas detectados a los 8 dpi en el grupo de tratamiento Stock PV 1 de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Círculo rojo: manchas blancas; cuadro azul: arrugamiento de hojas; círculo naranja: puntas arrugadas; cuadro morado: Clorosis.....	56
Figura 33. Síntomas detectados a los 8 dpi en el grupo de tratamiento PV diluido 1:10 de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Círculo rojo: manchas blancas; cuadro azul: arrugamiento de hojas; círculo naranja: puntas arrugadas.....	57
Figura 34. Síntomas detectados a los 8 dpi en el grupo de tratamiento PV diluido 1:100 de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Círculo naranja: Puntas arrugadas; Cuadro morado: Clorosis; Círculo azul cielo: Tonalidades amarillas.....	57
Figura 35. Síntomas detectados a los 8 dpi en el grupo de tratamiento PV diluido 1:1,000 de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Círculo naranja: puntas de hojas arrugadas; cuadro azul: hoja arrugada.....	58
Figura 27. Identificación de pulgones a los 18 dpi en los grupos de tratamiento Stock PV y sus diluciones de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica.....	58
Figura 36. Síntomas detectados en grupos Stock PV 1 y sus diluciones a los 26 dpi de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica.....	59
Figura 37. Grupos CN y Mock de la tercera réplica a los 26 dpi de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica.....	60
Figura 38. Análisis del promedio de alturas de plantas de chile en la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica indicando la desviación estándar (\pm DE) del promedio. La línea amarilla corresponde al control negativo (CN), la línea verde al tratamiento Mock, la línea rosa al tratamiento Stock PV 1, la línea morada al tratamiento PV diluido 1:10, la línea azul al tratamiento PV diluido 1:100, y la línea naranja al tratamiento PV diluido 1:1000. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba Tukey ($p<0.05$): A= grupo con mayor promedio de altura, B= grupo con menor promedio de altura. Líneas punteadas indican primer avistamiento de pulgones en los grupos de tratamiento Stock PV y sus diluciones.....	62
Figura 39. Análisis del promedio de longitud de hojas de plantas de chile en la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica indicando la desviación estándar (\pm DE) del promedio. La línea verde corresponde al tratamiento Mock, la línea rosa al tratamiento Stock PV 1, la línea morada al tratamiento PV diluido 1:10, la línea azul al tratamiento PV diluido 1:100, y la línea naranja al tratamiento PV diluido 1:1000. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba Tukey ($p<0.05$): A= grupo con mayor promedio de altura, B= grupo con menor promedio de altura. Líneas punteadas indican primer avistamiento de pulgones en los grupos de tratamiento Stock PV y sus diluciones.....	63
Figura 40. Comparación entre micrografías electrónicas de contraste negativo de partículas virales pertenecientes a familias y géneros que podrían corresponder al agente viral analizado en este estudio. A) Micrografía electrónica obtenida en el presente estudio. B) Micrografía electrónica representativa de virus del género Tymovirus (Lefkowitz, E. J. et al. 2017). C) Micrografía electrónica	

de partículas de virus de la familia Bromoviridae (Thompson, J. et al. 2025). D) Micrografía electrónica de partículas de virus del género Tombusvirus (Lefkowitz, E. J. et al. 2017).....66

Figura 42. Comparativa de efectos de los pulgones a los 18 y 45 dpi en los grupos Stock PV 1 y CN de la tercera réplica de los experimentos de inoculación mecánica. Cuadro rojo: presencia de pulgones (insectos plaga), cuadro azul: síntomas identificados..... 70

Índice de tablas

Tabla 1. Daños directos e indirectos relacionados con infecciones virales en plantas (Waterworth, H. y Hadidi, A. 1998).....	14
Tabla 2. Agentes que inducen síntomas semejantes a infecciones virales en plantas (Hull, R. 2014)....	15
Tabla 3. Estrategias y medidas de aplicación a enfermedades virales en campo (Avyllón, M., et al. 2018; Cohen, S. et al. 1988; Hooks, C. y Fereres, A. 2006; Folimonova, S. Y. 2013).....	19
Tabla 4. Organización de la placa de prueba ELISA para la detección de TMV y ToBRFV en muestras de chile.....	30
Tabla 5. Resultados de concentración y pureza del RNA extraído de la muestra de chile.....	36
Tabla 6. Resultados obtenidos de la placa de prueba ELISA para TMV para muestras de chile.....	41
Tabla 7. Resultados obtenidos de la placa de prueba ELISA para ToBRFV para muestras de chile...	42
Tabla 8. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de alturas de plantas de chile en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. CN (1)= 14 plantas, Mock (2) = 14 plantas, EPE (3)= 17 plantas. El análisis estadístico se realizó con los datos del día 30.....	49
Tabla 9. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de longitud de hojas de chile en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. CN(1)= 14 plantas, Mock (2) = 14 plantas, EPE(3)= 17 plantas. El análisis estadístico se realizó con los datos del día 30.....	50
Tabla 10. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de altura de plantas de chile en la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Cada tratamiento incluyó 10 plantas: CN, Mock, Stock PV 1 y PV diluidas 1:10 - PV diluidas 1:1,000, Stock EPE, EPE diluido 1:10, EPE diluido 1:100. El análisis estadístico se realizó con la diferencia de datos entre el 1 y 11 dpi.....	53
Tabla 11. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de alturas de plantas de chile en la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. CN= 9 plantas, Mock= 8 plantas, Stock PV 1= 9 plantas, PV diluidas 1:10= 9 plantas, PV diluidas 1:100= 9 plantas), PV diluidas 1:1,000= 8 plantas).	61
Tabla 12. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de longitud de hojas de plantas de chile en la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. CN= 9 plantas, Mock= 8 plantas, Stock PV 1= 9 plantas, PV diluidas 1:10= 9 plantas, PV diluidas 1:100= 9 plantas), PV diluidas 1:1,000= 8 plantas). El análisis estadístico se realizó con los datos del día 26.....	62
Tabla 13. Grupos de virus a los que posiblemente pertenece el agente etiológico de la enfermedad emergente en el cultivo de chile, Valle de la Trinidad (Hulo, C. et al. 2011; Lefkowitz, E. J. et al. 2017; Robles Hernández, L., et al. 2010; Thompson, J. et al. 2025).....	67
Tabla 2. Preparación de buffer SSTE, pH 8.0 (Gambino, G. et al. 2008).....	78
Tabla 3. Preparación de buffer de extracción general (GEB) (1:10), pH 7.2 (Agdia ®).....	78
Tabla 4. Preparación de buffer PBST 1X, pH 7.2 (Agdia ®).....	78
Tabla 5. Preparación de buffer de extracción de viriones (1% (v-v) 2 mercaptoetanol en buffer fosfato 0.5 M), pH 7.2 (Foster, G. D. y Taylor, S. C. 1998).....	79
Tabla 6. Preparación de buffer fosfato 10 mM, pH 7.2 (Foster, G. D. y Taylor, S. C. 1998).....	79
Tabla 7. Preparación de buffer PBS 1X, pH 7.4 (Feng, Y. et al. 2017).....	79

Dedicatoria

A mis padres por su apoyo, paciencia y constancia durante todo este proceso, gracias por traerme hasta aquí, gracias por quién soy hoy en día. Han sido mi mayor inspiración, este logro también lleva sus nombres, los amo con toda mi alma. Mi padre, Jaime Gabriel Mendoza, la persona más amable que podrían conocer, sus palabras de aliento fueron la calma en la tormenta, quien me sostuvo de pie todo este tiempo. A mi madre, Aurora González, porque sé que Dios la escuchó a ella cuando le pedía que todo fuera bien, quien me ha enseñado a ser fuerte ante las adversidades, a quién le daría el mundo entero si lo tuviera en mis manos.

A mis hermanos, Dulce Gabriela, Sofía Aimeé y Jaime Andrés, porque aún con mi mal carácter no hubo un solo día en que no pensara en ellos cuando estaba lejos, son mi mayor regalo y lo que más quiero en este mundo. Mi vida solo comenzó el día en que llegaron conmigo.

A mi abuela Elvira, mi más grande amor, mi ángel de la guarda, mi corazón siempre estará donde sea que esté. A mi abuela Elisa, por todas las llamadas donde me decía "Dios te ama, y yo también", sigue descansando bonito.

A mis amigas, Elena Rosales y Karla Zavala, porque la universidad dejó de ser tan aterradora el día que ustedes llegaron, gracias por sanar y acompañar mi corazón con paciencia, hicieron de esta etapa la más bonita de todas.

A Juan David, mi primer compañero en esta larga etapa y quien me ha apoyado en cada paso, te quiero con toda mi vida, gracias por siempre estar a mi lado.

A toda mi familia y aquellos que me hicieron sentir parte de la suya, gracias por alentarme y no dejarme sola en ningún momento, han dejado una huella en mi vida y en mi carrera profesional de forma invaluable.

Agradecimientos

El presente trabajo se desarrolló en colaboración entre el Laboratorio de Virología Agrícola del CICESE y el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California (CESVBC), respondiendo a la solicitud del gremio de productores de tomatillo y chile del Valle de la Trinidad.

Agradezco profundamente a mi directora de tesis, Dra. Jimena Carrillo Tripp, por todo su apoyo, enseñanzas y sobre todo por brindarme la oportunidad de ser su aprendiz en el Laboratorio de Virología Agrícola. Su disciplina, pasión por la ciencia y generosidad para compartir sus experiencias y conocimientos me acompañarán siempre.

Agradezco también a mi sinodal M.C. Idalia Motensinos Solano, por haber sido mi maestra y compañera durante este proyecto; sus consejos y motivación fueron un impulso muy valioso. De igual manera, a mi coordinadora de tesis Dra. Dayanira Sheira Paniagua Meza y mis sinodales Dr. David Cervantes Vásquez y Mtra. Clelia Macias Rodríguez por ser profesores que dejaron una huella significativa en mi formación como bioingeniera y que con sus clases, reafirmaron que mi vocación estaba en el camino correcto.

A mis compañeros de laboratorio, Vanessa Alejandra Bravo, Yael Mijangos y Karina Ruelas, les agradezco de todo corazón su apoyo incondicional, por ofrecerme una mano amiga y por conformar un verdadero equipo de trabajo.

Resumen

El presente estudio fundamenta las bases para la identificación del agente viral que afecta a cultivos de chile (*Capsicum annuum*) en Valle de la Trinidad a través de la aplicación de postulados de Koch-Rivers mediante experimentos de transmisión mecánica, en los que se compararon plantas de chile inoculadas con extracto de muestras de plantas enfermas (EPE) y partículas virales (PV), ambos diluidos a diferentes concentraciones, implementando grupos de control negativo (CN) y con daño mecánico (Mock) como referencia.

Los resultados de los experimentos de transmisión mecánica confirmaron el desarrollo de una infección sistémica en los grupos de tratamiento que recibieron el inóculo, justificada con sintomatología progresiva como enrollamiento severo, amarillamiento, marchitez, necrosis foliar, clorosis y deformación de hojas hasta su senescencia. Contraintuitivamente, el grupo de tratamiento PV diluido 1:1,000 fue el que exhibió una mayor severidad en síntomas y crecimiento más lento, con lo que se infiere que una alta concentración de carga viral no siempre se traduce en patogénesis.

Los análisis moleculares realizados mediante pruebas de PCR para ToBRFV (tomato brown rugose fruit virus), TSWV (tomato spotted wilt virus), tobamovirus y potyvirus señalaron resultados negativos en la muestra de chile analizada, confirmando la ausencia de estos virus. Del mismo modo, los análisis inmunológicos mediante pruebas ELISA no expusieron la presencia viral de ToBRFV ni TMV (tobacco mosaic virus).

En el análisis por microscopía electrónica de transmisión se observaron partículas virales icosaédricas en un rango de tamaño de 19-37 nm con mayor prevalencia las de 25-27 nm. La morfología de las partículas sumada a la sintomatología observada apunta a que el agente causal de la enfermedad emergente en cultivos de chile de Valle de la Trinidad podría pertenecer a géneros como *Tymovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Tombusvirus*, *Sobemovirus* o *Nepovirus*.

Palabras clave: *Capsicum annuum*, cultivos de chile, virología, agente viral, transmisión mecánica.

Abstract

This study lays the groundwork for identifying the viral agent that affects chili pepper crops (*Capsicum annuum*) in the Trinidad Valley through the application of Koch-Rivers postulates using mechanical transmission experiments, in which chili plants were inoculated with extracts from diseased plants (EPE) and viral particles (PV), both diluted to different concentrations, as contrasted to negative control groups (CN) and groups with mechanical damage only (Mock).

The results of the mechanical transmission experiments confirmed the development of a systemic infection in the treatment groups that received the inoculum, justified by progressive symptoms such as severe curling, yellowing, wilting, leaf necrosis, chlorosis, and leaf deformation until senescence. Counterintuitively, the 1:1,000 diluted PV treatment group exhibited the most severe symptoms and slowest growth, suggesting that a high viral load does not always translate into pathogenesis.

Molecular analyses performed using PCR tests for ToBRFV (tomato brown rugose fruit virus), TSWV (tomato spotted wilt virus), tobamovirus and potyvirus showed negative results in the chili sample analyzed, confirming the absence of these viruses. Similarly, immunological analyses using ELISA tests did not reveal the presence of ToBRFV or TMV (tobacco mosaic virus).

In addition, transmission electron microscopy analysis revealed icosahedral viral particles in a size range of 19-37 nm, with a higher prevalence of 25-27 nm. The morphology of the particles and the symptoms observed in plants suggest that the causal agent of the emerging disease in chili pepper crops in the Trinidad Valley could belong to genera such as *Tymovirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Tombusvirus*, *Sobemovirus*, or *Nepovirus*.

Keywords: *Capsicum annuum*, chili pepper crops, virology, viral agent, mechanical transmission.

Introducción

El cultivo de chile

El chile (*Capsicum annuum*) es una planta de tallos verdes, rígidos con ramificaciones que llega a presentar alturas de 60 cm, cuya raíz alcanzan profundidades de hasta 1.20 m. Como se identifica en la Figura 1, sus hojas son planas y alargadas, mientras que sus flores son hermafroditas y brotan en las axilas de las ramificaciones presentando coloraciones blancas o moradas. Generalmente los cultivos de chile se desarrollan bajo climas cálidos y son sumamente sensibles al frío, toleran temperaturas de 20 a 30 °C, dando como resultado un germinado de 9 a 12 días posterior a su siembra, sin embargo, su crecimiento se ve perjudicado si la temperatura a la que se exponen los cultivos es menor a 18 °C. Las características que adoptan los frutos de las plantas de chile son coloraciones verdes por la acumulación de clorofila, durante su maduración toman coloraciones entre rojo y amarillo; además se da un ligero curvado en esta etapa (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2024).



Figura 1. La planta de chile (*Capsicum annuum*) (Koehler, H., 1887).

La distribución de los cultivos de chile en México es dependiente de factores climáticos y condiciones del suelo, por lo que algunos de sus parámetros óptimos implican altitudes en un rango de 0 - 2,700 m y lluvias de 600 a 1500 mm. Respecto a los suelos, son idóneos aquellos de textura ligera con 35 a 50 cm de profundidad y un pH de 4.3 a 8.3 (Agro Excellence, 2022). Se pueden encontrar alrededor de cinco especies primordiales cultivadas que incluyen *C. annuum*, *C. chinense*, *C. pubescens*, *C. frutescens* y *C. baccatum* además de otras 25 variedades silvestres semicultivadas. Entre ellas, la especie de mayor relevancia económica a nivel mundial es *Capsicum annuum* (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2017).

Según la revista Agro Excellence (2022), la producción de chile verde en México abarca principalmente tres regiones. El Norte y Noreste se caracterizan por la utilización de alta tecnología y alto rendimiento, además de buenas condiciones tanto ambientales como comerciales. La región del Bajío, caracterizada por la utilización de tecnología intermedia, con producción y calidad dentro de un rango moderado. Y el sur y sureste, distinguidos por su bajo uso de tecnología y cultivos temporales, lo cual da como resultado una baja producción.

Según la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2022), en el cultivo de chile para el ciclo agrícola Primavera-Verano 2022, en la zona de producción localizada en Valle de la Trinidad, Ensenada, Baja California, se identificó la siembra total de 462 hectáreas de variedades de chile jalapeño, güerito, pasilla y pimientos. De la superficie total sembrada, solo 3 hectáreas se cultivaron bajo agricultura protegida mientras que las otras 459 hectáreas se desarrollaron a campo abierto.

Durante el periodo 2022–2024, la superficie agrícola destinada al cultivo de chile en Ensenada, Baja California mostró una tendencia decreciente tanto en área sembrada como en cosechada, pasando de más de 900 hectáreas en 2022 a poco más de 280 hectáreas en 2024 (Figura 2) (DGSIA, 2025).

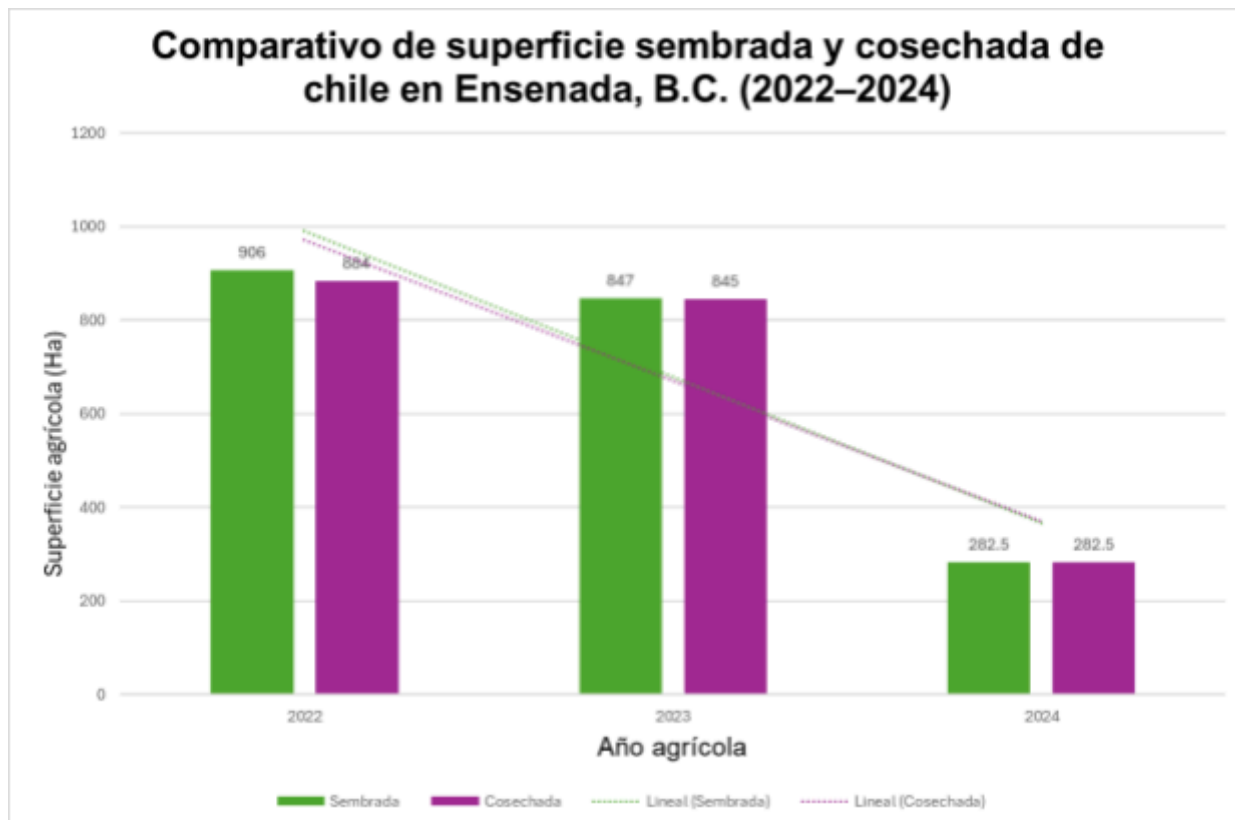


Figura 2. Comparativo de superficie y producción agrícola en Ensenada, B.C. en el periodo 2022-2024 (DGSIAF, 2025).

Enfermedades virales en plantas

Según Hull R. (2014), un virus se describe como una entidad construida por una o más moléculas de ácidos nucleicos de RNA o DNA, las cuales comúnmente se encuentran empaquetadas por capas de proteínas o lipoproteínas. Estos agentes patógenos no tienen la habilidad de replicarse por sí mismos, por lo que para su supervivencia necesitan infectar células hospederas compatibles para realizar su propio proceso de replicación.

Los virus también se consideran parásitos intracelulares de carácter obligado puesto que no poseen un metabolismo propio, esto quiere decir que no tienen la capacidad de producir energía y sintetizar de forma autónoma los componentes requeridos para su proceso de replicación. Por el contrario, utilizan enzimas, moléculas y estructuras celulares del organismo hospedante con la finalidad de copiar su material genético y fabricar las partes que lo conforman. Esta dependencia total es lo que distingue su comportamiento patógeno, pues en el transcurso de su multiplicación suelen destruir las células infectadas, a su vez, el virus se propaga hacia células vecinas generando un daño gradual a su paso, lo que en

algunas ocasiones da lugar a la degradación de los tejidos. De modo que los virus no tienen la capacidad de sobrevivir sin la presencia de una célula hospedera, se encuentran ampliamente distribuidos y coexistiendo con todos los seres vivos (Delgado Ortiz, M. I. y Hernández Mujica, J. L. 2015).

Según Rodríguez Hernández, A. et al. (2023), las enfermedades e infecciones generadas por virus en plantas ocasionan pérdidas globales que alcanzan cifras de hasta 30 mil millones de dólares anualmente, lo que representa aproximadamente el 50% de todas las enfermedades emergentes que perjudican a los cultivos.

En México, dicha problemática se intensifica por el desconocimiento respecto al virus que se acentúa en el cultivo y por la limitada divulgación acerca de las técnicas para la identificación y detección de enfermedades virales, hecho que ha desencadenado los brotes constantes de este tipo de enfermedades anualmente (Robles Hernandez, L. et al. 2010).

Hull, R. (2014) hace referencia a que los virus no solo producen daños evidentes como la disminución de la producción o deterioro en el aspecto del cultivo, también se manifiesta de maneras sutiles que suelen ser inadvertidas y sin provocar síntomas claros, lo que quiere decir, que su existencia modifica el desarrollo usual de las plantas y su competencia de adaptación en el entorno (Tabla 1).

Tabla 1. Daños directos e indirectos relacionados con infecciones virales en plantas (Waterworth, H. y Hadidi, A. 1998).

TIPO DE DAÑO	DESCRIPCIÓN
Disminución de crecimiento	-Reducción de rendimiento incluyendo infecciones que no presentan síntomas visibles. -Pérdidas totales de cultivos en casos severos.
Reducción de vigor	-Incremento de sensibilidad al estrés climático como heladas o sequía. -Mayor susceptibilidad a enfermedades y plagas.

Reducción de calidad y valor comercial	<ul style="list-style-type: none"> -Alteración de la forma, tamaño y color. -Disminución de vida útil y conservación del producto. -Alteraciones en características deseables como sabor, textura y composición. -Menos eficacia y calidad de propagación.
Incremento de costos relacionados al manejo y prevención del virus	<ul style="list-style-type: none"> -Planeación de estrategias de higiene agrícola y control de vectores. -Obtención de material de propagación completamente libre de virus. -Supervisión y actualización de programas de exportación e importación. -Implementación de campañas de erradicación de enfermedades virales. -Mejoramiento genético para la resistencia viral. -Fomento a actividades de investigación, educación y extensión.

En el diagnóstico de enfermedades vegetales se identifican signos que se atribuyen a un origen viral, sin embargo, son desencadenados por otro tipo de agentes que tienen la capacidad de promover alteraciones semejantes a las observadas en las infecciones virales como se muestra en la Tabla 2, lo que desemboca en interpretaciones erróneas que obstaculizan un diagnóstico preciso (Hull, R. 2014). Según González Garza, R. (2017), patógenos como insectos, ácaros y nematodos ocasionan síntomas visibles semejantes a virosis, por lo que resulta indispensable la realización de diagnósticos fitosanitarios.

Tabla 2. Agentes que inducen síntomas semejantes a infecciones virales en plantas (Hull, R. 2014).

Agente	Mecanismo	Síntomas similares a virosis
Otros parásitos (fitoplasmas y espiroplasmas)	Organismos procariotas que carecen de pared celular, se transmiten por cicadélidos y plantas parasitarias como la cuscuta. Se tenía la teoría de que eran virus ya que no era posible cultivarlos en laboratorio y ocasionan síntomas sistémicos.	Amarillamiento, deformaciones, “escoba de bruja”, enanismo y retraso de crecimiento, filodia.
Bacterias oportunistas	Algunas bacterias ocasionan muerte celular posterior a la inoculación mecánica. No poseen comportamiento viral.	Necrosis en hojas, lesiones locales.

Toxinas de artrópodos	Algunos ácaros e insectos producen compuestos tóxicos cuando se alimentan, distribuyéndose por la planta y alterando su desarrollo.	Moteado, mosaico, enanismo, protuberancias en hojas, supresión del desarrollo de nuevos tallos (macollos).
Anomalías genéticas	Alteraciones hereditarias como mutaciones en plastidios, se heredan materna y clonalmente.	Mosaicos bien delimitados de áreas verdes y cloróticas
Transposones	Secuencias de ADN que se introducen en genes reguladores de color, provocan cambios en el fenotipo.	Veteado y manchas similares a mosaicos provocados por virus.

Mecanismos de transmisión viral

Propagación vegetativa

Una de las principales formas de diseminación viral es la propagación vegetativa, en este caso, cuando los esquejes, tubérculos, plántulas o propágulos se originan de una planta infectada, la nueva planta que se desarrolla igualmente crecerá infectada, esto debido a que los virus se transfieren e invaden los tejidos nuevos en crecimiento (Duran Vila, N. y Moreno, P. 2000).

Avyllón, M. et al. (2018) refieren que específicamente en plantas que se reproducen por semillas, los virus se establecen en órganos reproductivos del hospedero o el polen y se introducen en la semilla, desarrollándose junto con la planta nueva desde etapas tempranas de desarrollo (Figura 3).

Vectores biológicos

En la propagación por medio de vectores biológicos, estos al alimentarse de plantas infectadas suelen obtener el virus y lo inyectan directamente a células vivas de plantas sanas. La transmisión de virus por vectores biológicos se puede clasificar en dos estrategias principales: no circulativa y circulativa.

En la no circulativa, el virus que obtiene el vector durante su alimentación de células infectadas se mantiene en el tracto digestivo sin atravesar barreras celulares del vector, en este contexto la transmisión es inminente en vista de que no hay un periodo de incubación entre la adquisición del virus y su capacidad para transmitirse, no obstante, cuando el vector atraviesa un proceso de muda se pierde esta capacidad. Cabe destacar que se subdivide en tres variantes, la no persistente donde el vector adquiere el virus en poco tiempo y lo transmite enseguida perdiendo su capacidad de diseminación; la semipersistente, donde el vector necesita mayor tiempo de alimentación para adquirir y propagar el virus, donde el vector puede ser un transmisor viral por más de un día y el ayuno previo no influye en su duración; y la bimodal, donde se acoplan características intermedias de las variantes que se mencionan con anterioridad (Avyllón, M. et al., 2018).

Mientras tanto, durante la transmisión circulativa el virus requiere traspasar las barreras celulares internas del vector para tener la capacidad de transmitirse. Dentro del vector, el virus se transfiere por medio de la hemolinfa hasta acoplarse a las glándulas salivales, una vez posicionado ahí, puede inyectarse en plantas nuevas cuando el vector se alimenta. Es relevante destacar que, en el caso de que el virus no solo circule dentro del vector sino también tenga la capacidad de replicarse dentro de él, se le clasifica como circulatorio propagativo. En este caso el vector también se convierte en un hospedero del virus, por lo cual, también se puede diseminar hacia su descendencia infectando nuevas generaciones (López Moya, J. y López Abella, D. 1996).

Transmisión mecánica

En este tipo de transmisión viral los virus se aglomeran en altas concentraciones en células epidérmicas de la planta y se favorecen de microheridas provocadas por el viento, fricción al utilizar maquinaria, animales y prácticas agrícolas para transmitirse de una planta a otra (Figura 3).

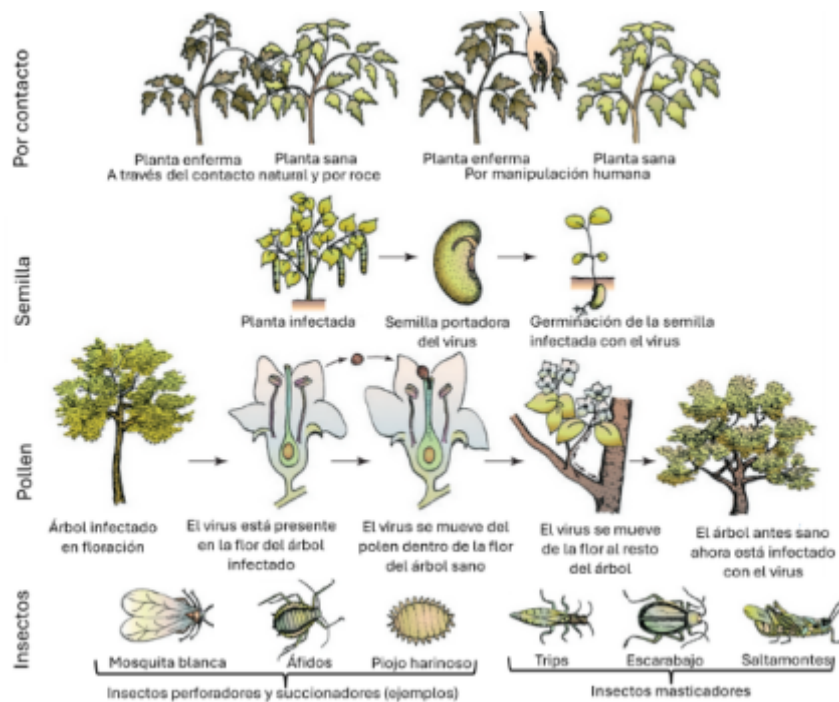


Figura 3. Mecanismos de transmisión de virus en plantas. Modificado de Agrios, G. (2005).

En este trabajo, se implementará la técnica de transmisión mecánica como método para la infección de ejemplares de plantas sanas con el propósito de examinar el efecto de un posible agente viral. La técnica consiste en introducir un virus activo, o bien su ARN infeccioso, a través de una microherida generada en las superficies de las plantas. Si el agente logra establecerse en las células vegetales, podrá iniciarse el proceso de infección. La inoculación mecánica permite analizar las interacciones entre el virus y las células susceptibles del hospedero (Hull, R. 2014). De ser exitosa, esta técnica posibilita entablar un vínculo directo entre el potencial virus y la enfermedad observada, favoreciendo así el proceso de caracterización del agente causal. En este caso, para el supuesto virus que afecta al cultivo de chile en Valle de la Trinidad, aún no se conoce el método de transmisión, lo cual representa un impedimento para establecer estrategias de manejo efectivas.

Medidas de control de enfermedades virales

El control de la virosis en cultivos vegetales se fundamenta en medidas preventivas debido a que no se pueden implementar acciones curativas. Las estrategias se dirigen a restringir la dispersión primaria con el objetivo de minimizar el contacto inicial del virus con el cultivo, disminuir la propagación secundaria al eludir la diseminación desde puntos primarios de la infección, y amortiguar los efectos de la infección cuando se encuentra en la planta

buscando moderar el impacto negativo respecto a su desarrollo y productividad (Avyllón, M. et al. 2018). En la Tabla 3, se muestran algunas medidas preventivas en las etapas mencionadas.

Tabla 3. Estrategias y medidas de aplicación a enfermedades virales en campo (Avyllón, M., et al. 2018; Cohen, S. et al. 1988; Hooks, C. y Fereres, A. 2006; Folimonova, S. Y. 2013)

Etapa de control de virosis vegetal	Sugerencia de medidas adoptadas	Mecanismo de acción	Ventajas	Limitaciones
<i>Dispersión primaria</i>	Adopción de legislación fitosanitaria relacionada con la Ley de Sanidad vegetal enfocada en control de movimientos de material vegetal	Restricción de entrada de material infectado a nuevas regiones	Retraso de la introducción del virus que permite la planeación de estrategias de erradicación	Efecto transitorio limitado por tráfico internacional y nacional
	Periodos libres de cultivo/rotación con especies no susceptibles al virus	Reducción de inóculo primario en suelo y material vegetal	Reduce la incidencia	Necesita planificación agrícola, alto costo económico
	Mejoramiento del manejo agronómico para evitar heridas en plantas	Prevención de puntos de entrada viral	Bajo costo y fácil implementación	Capacitación a agricultor y operadores
	Desinfección química del suelo o solarización	Supresión del inóculo viral persistente del suelo a través de productos químicos o energía solar	Efectivo en áreas pequeñas	Costoso, limitado a algunos cultivos, daños a la microbiota del suelo
	Barreras físicas en cultivos protegidos (mallas e invernaderos)	Exclusión de insectos vectores	Protección efectiva al cultivo completo	Costoso y requiere mantenimiento periódico
	Cultivos barrera	Delimitan la entrada de vectores aéreos virulíferos	Protección efectivo a los márgenes del cultivo	Utilización de espacio adicional, limitado a algunos cultivos
<i>Dispersión secundaria</i>	Medidas de higiene en campo	Prevención de transmisión mecánica a partir de la desinfección de manos, ropa y utensilios	Bajo costo	Capacitación a operadores

*Control de la
infección en
planta*

Control químico intensivo a vectores	Eliminación rápida de insectos transmisores de virus	Estrategia inicialmente efectiva	Riesgo ambiental, riesgo a la salud humana, posible resistencia en insectos vectores
Implementación de aceites minerales de uso agrícola	Aplicación de barrera física en superficie de hojas que obstaculiza la transmisión del virus	Reduce la dispersión primaria y secundaria	Posible fitotoxicidad, aplicación constante
Control biológico de vectores	Regulación natural de vectores con depredadores naturales y parasitoides	Sostenible, no presenta un impacto ambiental	No elimina completamente los vectores, debe combinarse con otras estrategias
Eliminación de plantas infectadas	Disminución de fuentes de inóculo viral en campo	Efectiva en fases tempranas	Poca utilidad en epidemias avanzadas, pérdidas económicas
Protección cruzada	Inoculación con cepas virales atenuadas a través de inducción de resistencia contra cepas virulentas	Bajo impacto ambiental y salud humana	Limitado a algunos virus, riesgo de recombinación y resistencia
Inducción de resistencia por productos químicos o agentes biológicos	Activación de mecanismos de defensa de la planta	Control específico	Requiere constancia de aplicación de tratamientos

Postulados de Koch y Rivers

Opal, S. M. (2010) describe que en 1890 Robert Koch estableció los postulados que abarcan los criterios imprescindibles para argumentar que un microorganismo es responsable de ocasionar una enfermedad. Inicialmente puntualizó tres postulados para contemplar a un organismo como posible agente patógeno:

“Postulado 1: Que el microorganismo se encuentra en todos los casos en que se presenta la enfermedad y explica las características [...] patológicas de la misma.

Postulado 2: Que el microorganismo no se encuentra en otras enfermedades

como un parásito no patógeno o fortuito.

Postulado 3: Tras ser aislado el organismo y transmitido repetidamente en cultivo puro, el microorganismo puede inducir la enfermedad de nuevo [...].”

Sin embargo, Koch llegó a distinguir limitaciones en su metodología debido a que, en el área de virología de inicios del siglo XX, la naturaleza de los virus implicó nuevos desafíos. Para disminuir la problemática asociada con la rigidez de los postulados de Robert Koch, Thomas Milton Rivers propuso en 1937 los principios para instaurar un vínculo causal entre un virus y la enfermedad (Cohen, J. et al. 2017):

“1. El virus debe ser concomitante con la enfermedad.

2. Debe aislarse del organismo enfermo:

- separado de los patógenos contaminantes,
- multiplicado en un hospedador de propagación,
- aislado de la savia de la planta o el organismo en cuestión y purificado fisicoquímicamente, e
- identificado por sus propiedades intrínsecas.

3. Al inocularse en un organismo sano, debe reproducir la enfermedad.

4. Se debe demostrar que el mismo virus está presente en el hospedador experimental y debe volver a aislarse del mismo”.

Antecedentes

Virus en plantas solanáceas en México

Debido a que este proyecto se enfoca en la identificación de virus en muestras de Chile (*Capsicum annuum*), se mencionan aquellas familias y géneros con mayor presencia en plantas solanáceas que pudieran estar involucrados en la enfermedad emergente en el Valle de la Trinidad.

Virgaviridae

La familia *Virgaviridae* se caracteriza principalmente por viriones en forma de bastón, uno de los géneros más representativos es *Tobamovirus*, disponen de viriones en forma de varillas rígidas y estructuras helicoidales bien definidas sin envoltura, usualmente tienen un diámetro de 18 nm y una longitud entre 300 a 310 nm como se muestra en la Figura 4. Su genoma es monopartito lineal de ARN monocatenario en sentido positivo, con dimensiones que varían entre 6.3 a 6.5 Kb (Hulo, C. et al. 2011). Este tipo de virus se propaga de forma mecánica, sin la implicación de vectores biológicos como insectos. Los síntomas en hojas y frutos abarcan la aparición de mosaico clorótico, deformaciones y necrosis sistémica seguida de defoliación. Bajo situaciones donde las plantas se infectan en etapas tempranas de desarrollo, su crecimiento se ve menguado provocando enanismo, apariencia clorótica y menor vitalidad (Bayer, 2022).

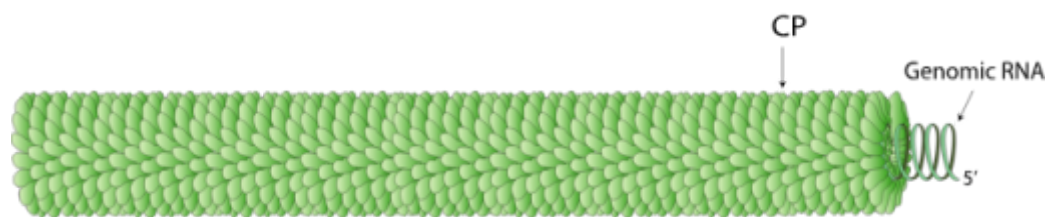


Figura 4. Estructura del virión de tobamovirus (Hulo, C. et al. 2011).

Tospoviridae

Los ejemplares de la familia *Tospoviridae* se transmiten principalmente por vectores biológicos como trips (*Frankliniella occidentalis*) que se alimentan de las plantas infectadas; estos virus también suelen propagarse a través de herramientas contaminadas, riego con agua infectada y contacto directo entre plantas. El catálogo de síntomas que inducen incluye clorosis en hojas jóvenes, en hojas más viejas puede presentar anillos cloróticos y otros patrones característicos en forma de anillo, también provoca necrosis y deformaciones en frutos y tallos, y enanismo de la planta (Funderburk, J. et al. 2009). Poseen partículas esféricas con envoltura y generalmente sus diámetros fluctúan entre 80 a 120 nm como se muestra en la Figura 5. Su genoma se compone de ARN segmentado de cadena ambisentido y disposición lineal. Los segmentos se clasifican en tres, el segmento L con una longitud 8.8 Kb, segmento M de 4.8 Kb y segmento S de 3 Kb (Hulo, C. et al. 2011).

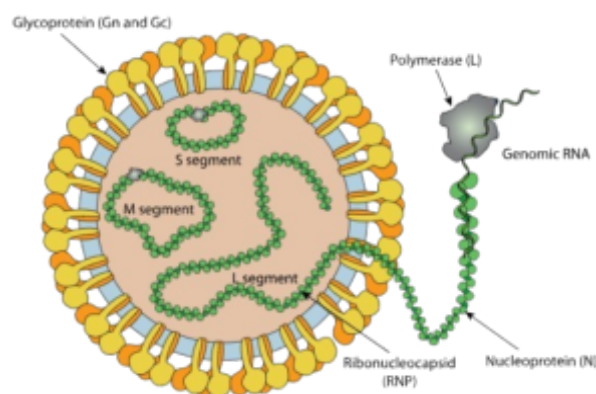


Figura 5. Estructura del virión de tospovirus (Hulo, C. et al. 2011).

Geminiviridae

En cuanto a la familia *Geminiviridae* es la más grande entre los virus de plantas, los geminivirus se identifican como virus sin envoltura con genomas de ADN monocatenario circulares, que varían entre 2.5 y 3.0 Kb. Suelen tener una estructura monopartita o bipartita y están encapsulados en viriones gemelos como se muestra en la Figura 6. Basándose en las características de su genoma, el insecto vector y el rango de hospedadores, los geminivirus se dividen en catorce géneros. El género más grande es *Begomovirus*, incluyendo 445 especies de virus. Las plantas infectadas presentan síntomas como amarillamiento, clorosis y enrollamiento de las hojas jóvenes, además de un crecimiento

reducido y una marcada disminución del tamaño de las hojas (Li, F. et al. 2022).

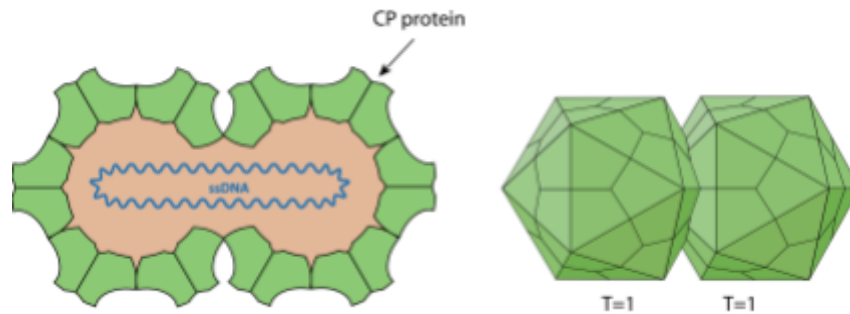


Figura 6. Estructura del virión de begomovirus (Hulo, C. et al. 2011)

Potyviridae

Los virus correspondientes a la familia *Potyviridae* incluyen especies tanto monopartitas como bipartitas caracterizándose de un genoma compuesto por RNA monocatenario como se muestra en la Figura 7. Los viriones se identifican por su flexibilidad, carencia de envoltura y por presentar diámetros que comprenden medidas entre 11 a 20 nm con un paso helicoidal de alrededor de 3.4 a 3.5 nm. Especialmente los virus catalogados en los géneros *Arepavirus*, *Bevemovirus*, *Brambyvirus*, *Celavirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Roymovirus*, *Rymovirus* y *Tritimovirus* exponen genomas monopartitos con longitudes de partículas virales que oscilan entre 650 a 950 nm. Además, aunque los hospedadores de los virus de esta familia suelen tener un rango natural limitado, bajo condiciones experimentales tienen la capacidad de infectar 30 familias vegetales distintas, acelerando su transmisión a través de inoculación mecánica. Particularmente para los géneros *Potyvirus* y *Macluravirus* su propagación también se ve facilitada mediante semillas infectadas y con vectores biológicos como áfidos, los cuales propagan el virus a través de transmisión no persistente y no circulante (Inoue Nagata, et al. 2022).

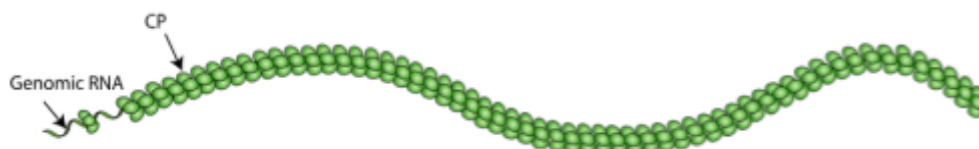


Figura 7. Estructura del virión de potyvirus (Hulo, C., et al. 2011).

Descripción de la problemática de la región de Valle de la Trinidad

Se realizó una videollamada con representantes de los productores de la región de Valle de la Trinidad el 21 de octubre de 2024, con el objetivo de recopilar información que permitiera comprender con mayor profundidad la problemática de los cultivos de chile. El Ing. Pedro López Simancas, integrante del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California (CESVBC) colectó una muestra de chile representativa de la problemática manifestada por los productores proveniente de un solo rancho de la región, el día 24 de octubre de 2024. La muestra se entregó al Laboratorio de Virología Agrícola del CICESE donde se registraron los síntomas y se desarrollaron los análisis dirigidos a establecer su asociación a posibles enfermedades virales.

Los productores de cultivo de chile de Valle de la Trinidad indicaron que desde hace aproximadamente seis años se han identificado síntomas inusuales y perjudiciales en sus cultivos incluyendo clorosis en hojas, tallos y ápices, enrollamiento de hojas, círculos concéntricos en frutos, así como deformidades en frutos. Dichos síntomas han tenido un impacto negativo en la producción regional ya que provocan la pérdida de plantas, la disminución del rendimiento y, en muchos casos, la imposibilidad de comercializar el producto. Se mencionó que a pesar de la implementación de medidas preventivas, como la separación de cultivos afectados y el empleo de cuadrillas especializadas para su manejo, la problemática persiste y continúa extendiéndose hacia cultivos vecinos.

Para identificar en mayor medida el impacto en la producción y las condiciones ambientales que se manejan en la región, indicaron que los tiempos de siembra se realizan en tres etapas; siendo marzo-abril la etapa temprana y presentando un rango de temperaturas de 20°C a 32°C y cosechando en julio-agosto; una etapa intermedia entre los meses de mayo-junio presentando temperaturas de 33°C a 45°C y obteniendo una cosecha en septiembre; así como etapas tardías de siembra que se establecen en los meses de julio a agosto bajo temperaturas de 35°C a 44°C, cosechando los frutos hasta el mes de octubre.

Los productores mencionaron que específicamente en las etapas intermedias, las altas temperaturas fomentan la proliferación de vectores como trips (*Frankliniella occidentalis*) y pulgones (familia Aphididae). Se indica que en algunos predios se han identificado alrededor de 20 a 30 trips por planta, con lo cual se prevé que se ha amplificado la propagación de la enfermedad; asimismo, otro insecto plaga al cual se vincula una posible

propagación de la enfermedad, es la mosca blanca (familia Aleyrodidae). La problemática se ha extendido sin control provocando una pérdida estimada de 20 hectáreas donde la pérdida económica ha registrado hasta el 50% de la producción total.

Justificación

La región de Valle de la Trinidad ha sido expuesta a una problemática en crecimiento debido a la aparición de virus emergentes que afectan severamente a cultivos de esta zona. La realización de un estudio exhaustivo para la identificación de virus hortícolas, o bien, para encontrar la causa específica de la problemática que afecta a los cultivos de Chile es indispensable, ya que la producción agrícola influye directamente en la economía local.

En los últimos seis años los cultivos afectados han presentado síntomas como clorosis en hojas, tallos y ápices, enrollamiento de hojas, círculos concéntricos y deformación en frutos. Lo que ha provocado la destrucción de cultivos enteros inhabilitando la comercialización de los frutos, desembocando en grandes pérdidas que impactan la economía local. Los productores indican que se han presentado pérdidas de hasta el 50% de producción total de Chile en etapas intermediarias de siembra.

Hipótesis

La enfermedad de reciente aparición que manifiestan los cultivos de Chile del Valle de la Trinidad se asocia a la presencia de virus hortícolas emergentes.

Objetivo general

Determinar si la enfermedad emergente en cultivos de Chile de Valle de la Trinidad está asociada a la presencia de virus hortícolas.

Objetivos específicos

1. Determinar la asociación de partículas virales con la enfermedad emergente en plantas de Chile sintomáticas.
2. Verificar la transmisibilidad mecánica del agente etiológico y la reproducibilidad de síntomas asociados a la enfermedad emergente.
3. Diagnosticar la presencia de virus de grupos taxonómicos prevalentes en solanáceas.

Metodología

Diagnósticos moleculares e inmunológicos

Se aplicaron técnicas moleculares e inmunológicas para evaluar la posible presencia de un agente viral en muestras de chile con síntomas sospechosos. Se emplearon ensayos de RT-PCR y pruebas Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) dirigidas a la detección de virus comúnmente asociados a solanáceas. Estas metodologías permitieron analizar de manera sistemática la presencia o ausencia de distintos grupos virales.

Extracción de ARN

Para la extracción de RNA total se siguió el protocolo modificado de Gambino, et al. (2008). Se tomó una muestra sintomática de fruto y hoja de chile de aproximadamente 300 μ L de tejido vegetal y se colocó en un tubo de microcentrífuga de 2 mL. Posteriormente, se maceró con un pistilo de pellet de polipropileno, al cual se le agregó 1 mL de buffer de extracción CTAB adicionado con β -mercaptoetanol (2%) (Anexo I. Tabla 1). Las muestras se incubaron a 65 °C en un termobloque por 30 minutos, agitando ocasionalmente para impedir la compactación del tejido. A continuación, se llevaron a cabo dos extracciones consecutivas con 500 μ L de cloroformo isoamílico (24:1) con el objetivo de eliminar impurezas, se centrifugó a 12,000 x g en cada fase de separación y se transfirieron 800 μ L de las fases acuosas a tubos de microcentrífuga de 2 mL resistentes a cloroformo.

Se realizó una primera precipitación del RNA con la adición de 0.33 vol. cloruro de litio 12 M y 0.26 vol. isopropanol, incubando las muestras a -20 °C por aproximadamente 12 horas. Después, para eliminar el sobrenadante, las muestras se centrifugaron (HERMLE Z216 MK) a 12,000 x g por 30 min a 10 °C, el pellet resultante se disolvió en 500 μ L buffer SSTE (Anexo I. Tabla 2) y se realizó una extracción nuevamente con 250 μ L cloroformo isoamílico (24:1).

El RNA se precipitó con 500 μ L de isopropanol y se aplicó un lavado con 300 μ L de etanol al 70%. Las muestras se secaron a 65 °C en termobloque por un minuto, para finalmente resuspenderse en 40 μ L de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Por último, se realizó el análisis de calidad y concentración del RNA total colocando 1 μ L de muestra en el espectrofotómetro Nanodrop a una longitud de onda de 260/280.

Ensayos de RT-PCR

Se efectuó una reacción de transcripción reversa (RT) en un volumen final de 7 μL , compuesta por: 3.3 μL de RNA (~ 100 ng/ μL), 0.35 μL de hexámeros aleatorios (600 μM), 0.35 μL de dNTPs, 0.175 μL de inhibidor de RNasas (RiboLock®) y 0.35 μL de transcriptasa reversa (RevertAid® de Thermo Scientific®). Las condiciones de incubación consistieron en 10 minutos a 25 °C, seguidos de 30 minutos de síntesis a 42 °C y una desnaturalización final a 70 °C durante 10 minutos. Los cDNA's se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Posteriormente, se realizó una reacción de PCR en un volumen final de 10 μL , con la siguiente composición: 1 μL de cDNA obtenido previamente, 0.2 μL de dNTPs, 0.1 μL de DreamTaq® DNA Polymerase (Thermo Scientific®), y 1 μL de mezcla de primers (5 μM cada uno). El programa de amplificación consistió en: desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, alineamiento en gradiente (50 °C a 45 °C) por 45 segundos, y extensión a 72 °C por 1 minuto, con una extensión final a 72 °C durante 5 minutos. Los productos se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Se utilizaron diferentes cebadores específicos para virus del bronceado del tomate (TSWV) (Luria, N. et al. 2017), virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV) (Zamboni, U. et al. 2008), potyvirus (Zheng, L. et al. 2010), y tobamovirus (Luria, N. et al. 2017). Para comprobar la integridad del cDNA, se utilizaron los primers para el gen 18S ribosomal (Gambino et al. 2006). Los productos amplificados se mezclaron con HydraGreen (ACTGene®) o Gel Red (Biotium®), y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% que se visualizó con luz UV en un transiluminador iBright 1500 (Invitrogen®).

Pruebas Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Se ejecutaron pruebas ELISA para la detección de ToBRFV y TMV implementando kits comerciales de PathoScreen® (Agdia®) y se siguió el manual de uso del fabricante. Para la preparación de las muestras problema, se pesaron 45 g del tejido vegetal de chile de hojas y frutos por separado y se maceraron en 5 mL de buffer GEB (1:10) (Anexo I. Tabla 3).

Una vez tratados los pocillos con el anticuerpo de captura, se colocaron 100 μL de muestra por pocillo y se incubó sobre una caja húmeda a 8 °C durante 12 horas. Se realizaron tres lavados con una piseta con PBST 1X (Anexo I. Tabla 4), y se adicionó la enzima conjugada y el sustrato cromogénico PNP (100 μL) con una incubación final de 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, la lectura de resultados se realizó utilizando un lector de

placas Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific™) a una longitud de onda de 405 nm.

La organización de las placas se muestra en la Tabla 4, donde se incluyeron los controles positivos del kit, y tejido previamente confirmado para ToBRFV como control positivo extra. En el caso de los controles negativos, además de los proporcionados por los kits, también se emplearon muestras de plantas de tomatillo libres de ambos virus (Negativo planta) y las muestras de chile sospechosas.

Tabla 4. Organización de la placa de prueba ELISA para la detección de TMV y ToBRFV en muestras de chile.

	1	2	3
A	Negativo planta		
B	Negativo planta		
C	Negativo kit		
D	Negativo kit		
E	Chile Hoja		Positivo ToBRFV (planta)
F	Chile Hoja		Positivo ToBRFV (planta)
G	Chile Fruto		Positivo TMV kit ELISA
H	Chile Fruto		Positivo TMV kit ELISA

Enriquecimiento de material infectado para búsqueda de potenciales partículas virales

Con la finalidad de obtener partículas virales en el material proporcionado por productores del Valle de la Trinidad, se adaptó el protocolo de Foster, G. D. y Taylor, S. C. (1998) para el enriquecimiento de partículas virales en tres etapas. En la primera etapa se preparó el extracto viral a partir de macerar 20 g de tejido infectado de plantas de chile en 60 mL de buffer de extracción de viriones (1% v/v 2-mercaptoetanol en buffer fosfato 10 mM) (Anexo I. Tabla 5) en un mortero y se filtró a través de gasas estériles. A continuación, se adicionó 4.8 mL de cloroformo:butan-1-ol (1:1) por goteo para la eliminación de restos vegetales y se centrifugó a 8,000 x g por 30 minutos recuperando únicamente la fase acuosa en la Centrifugadora VI. Al extracto clarificado resultante se le agregó polietilenglicol (PEG) al 20% para obtener una concentración final de 4% y se incubó en hielo alrededor de 12 horas.

Para la etapa 2, se centrifugó el extracto a 8,000 x g a 4 °C durante 30 minutos con la Centrifugadora VI para sedimentar el virus, se tomó únicamente el pellet y se resuspendió en 8 mL de buffer fosfato 10 mM (Anexo I. Tabla 6). Se ejecutó nuevamente una precipitación viral a través de la adición de 1.7 mL de NaCl 5 M y 2.42 mL de PEG al 20% incubando en hielo por 12 horas. Por último, en la etapa 3 el virus se recuperó por centrifugación a 10,000 x g por 15 minutos con el equipo HERMLE Z216 MK resultando pellets los cuales se resuspendieron con micropipeta de 1000 µL en PBS 1X (Anexo I. Tabla 7). El material reunido se homogeneizó con micropipeta de 1000 µL, se concentró en tubos de microcentrífuga, se sometió a una centrifugación de 13,000 x g durante 30 segundos (HERMLE Z216 MK) y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, se midieron las concentraciones de RNA y proteínas mediante espectrofotometría usando un equipo Nanodrop a una longitud de onda de 260 nm y 280 nm respectivamente.

Microscopía electrónica de transmisión

Se siguió el protocolo reportado por Cisneros M.A. (2025), para la observación de partículas virales en el microscopio electrónico de transmisión (TEM). Para ello, la muestra resuspendida en PBS 1X (Anexo I. Tabla 7) se diluyó a una concentración de 0.8 ng/µL, se colocaron 10 µL de la dilución en una rejilla de cobre recubiertas de carbono (Ted Pella Athene 400 Mesh Grid) durante 2 minutos, para su tinción negativa se añadieron 10 µL de acetato de uranilo al 2% durante 2 minutos, posteriormente las rejillas se dejaron secar bajo una lámpara incandescente y se resguardaron hasta su observación. El análisis de las rejillas se realizó en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada (LNMA) del CICESE en un microscopio electrónico Hitachi 7500 donde se recopilaban imágenes bajo aumentos de 40,000-100,000 X. Las micrografías obtenidas se procesaron y analizaron con el programa Fiji (versión Windows-x64), donde se midió el diámetro de 122 partículas virales para su caracterización morfológica.

Ensayos de transmisión mecánica

Con el propósito de evaluar los postulados de Koch-Rivers, se utilizó el método de inoculación mecánica para favorecer la transmisión del posible agente viral bajo condiciones controladas en invernadero según el protocolo de Dijkstra, J. y De Jager, C. (1998).

Para la obtención de plantas, se utilizaron semillas de chile (*Capsicum annum*) de la variedad “Don Benito” sembradas en semilleros y transplantadas a macetas individuales una vez que germinaron. Se mantuvieron en condiciones de invernadero durante todo el proceso.

Los ensayos de transmisibilidad mecánica se desarrollaron en dos etapas. La primera parte consistió en la preparación del inóculo: se seleccionaron hojas y frutos que mostraran síntomas claros de la infección (clorosis, necrosis y deformación), obtenidos de la muestra proveniente de Valle de la Trinidad, éstas se maceraron en PBS 1X 1:5 (peso/volumen) (Anexo I. Tabla 7). Una vez homogeneizado, se almacenó a -20 °C en alícuotas de 200 μ L para su posterior uso, como se muestra en la Figura 8.

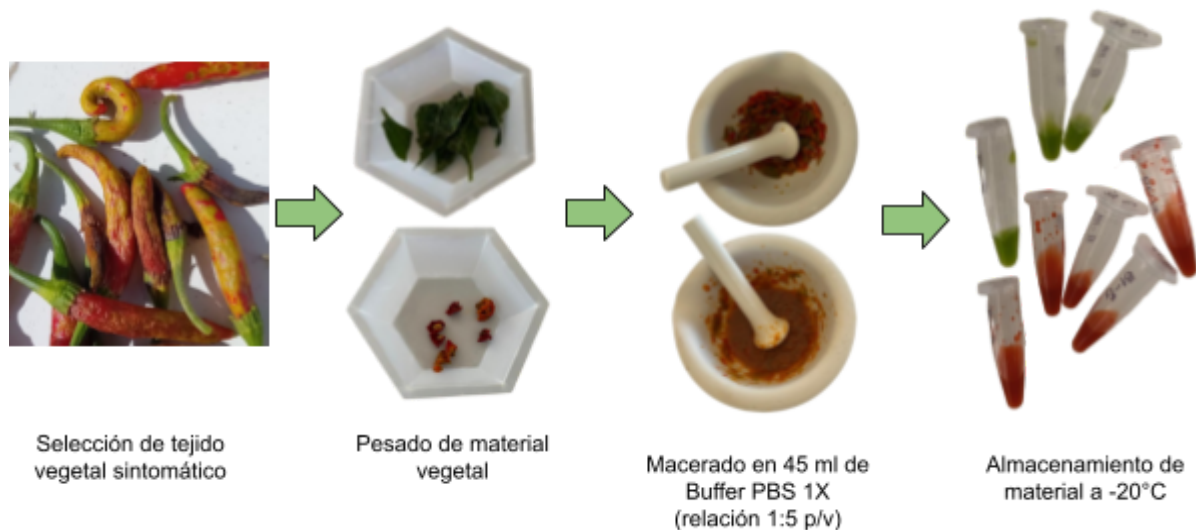


Figura 8. Esquema de preparación del inóculo a partir de tejido vegetal sintomático utilizado para la metodología de inoculación mecánica.

La segunda etapa consistió en la inoculación por daño mecánico. Se realizó la formación de 4 grupos y la medición inicial de las plantas de chile en etapas tempranas de desarrollo, de 15 a 21 días después de la germinación. Los 4 grupos consistieron en 10 plantas como mínimo: 1) control negativo para la evaluación del crecimiento de la planta sin la presencia del inóculo “CN”, 2) control del daño mecánico tratado con PBS 1X “Mock”, 3) plantas inoculadas con extracto de plantas enfermas (supuesto agente viral) “EPE”, y 4) plantas inoculadas con potenciales partículas virales “PV”.

Para la inoculación, se utilizó una capa de polvo Carborundum como abrasivo esparcido con pinceles sobre la segunda o tercera hoja verdadera de las plantas en los grupos Mock, EPE y PV. A continuación, con ayuda de una micropipeta se aplicaron 3 μ L del inóculo para los

grupos EPE y PV y 3 μ L de solución PBS 1X en el caso del grupo Mock, e inmediatamente después con un pistilo de polipropileno, se arrastró el contenido para generar el daño mecánico en el tejido vegetal. Por último, se lavaron las hojas inoculadas con agua destilada estéril para limpiar cualquier rastro del abrasivo y del inóculo (Figura 9).

Se registraron datos de longitud total de la planta y longitud de las hojas tratadas durante todo el experimento como controles de verificación de la eficacia del tratamiento de inoculación mecánica. Debido a que se pueden presentar diferencias en la susceptibilidad del virus, se realizaron tres réplicas en diferentes periodos del año.

Cabe destacar que, para la evaluación de la longitud total de la planta, se compararon los grupos CN y Mock con el propósito de evidenciar que el inóculo puede inducir síntomas independientemente del daño mecánico. En contraste, para el análisis de la longitud de las hojas únicamente se confrontó el grupo Mock con los grupos que recibieron el inóculo, debido a que en esta medición se evaluó el efecto del daño mecánico sobre el tejido foliar con y sin inóculo.

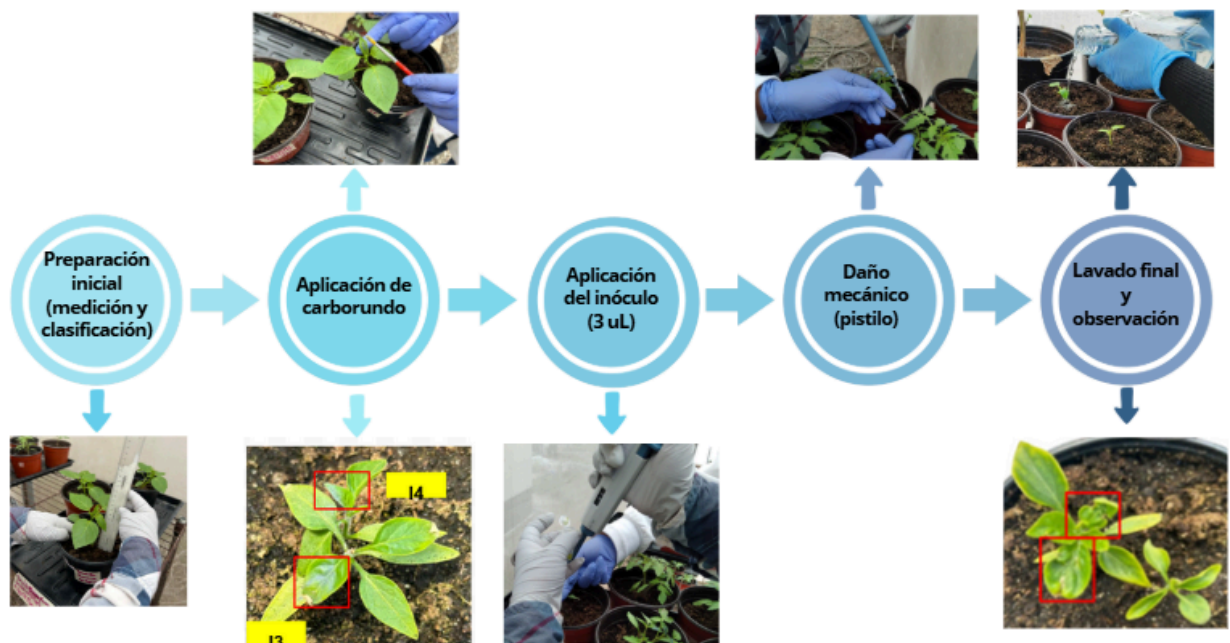


Figura 9. Esquema de inoculación mecánica.

Análisis estadístico

Con el propósito de evaluar si los tratamientos aplicados durante las réplicas generaron diferencias significativas en el crecimiento de las plantas o longitud de las hojas inoculadas, se analizaron las mediciones registradas mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), seguido de una prueba post-hoc de Tukey. Dicho análisis permitió contrastar las mediciones registradas para cada tratamiento, tomando en cuenta un nivel de significancia del 5% ($\alpha = 0.05$), considerando una n de 48 ejemplares aproximadamente. De manera general, las hipótesis de trabajo planteadas fueron las siguientes:

Hipótesis nula (Ho)

El tratamiento con extracto viral no produce un efecto significativo en la altura promedio de las plantas o longitud de las hojas inoculadas; por lo tanto, no existen diferencias en el crecimiento entre los grupos de tratamiento control negativo, mock e inoculado con extracto viral (EPE o PV).

$$H_0 = \mu_{CN} = \mu_{Mock} = \mu_{EPE} = \mu_{PV}$$

Hipótesis alternativa (Ha)

El tratamiento con extracto viral (EPE o PV) sí produce un efecto significativo en la altura promedio de las plantas o longitud de las hojas inoculadas, generando diferencias en el crecimiento con respecto a al menos uno de los controles.

$$H_a = \mu_{CN} \text{ o } \mu_{Mock} \neq \mu_{EPE} \text{ o } \mu_{PV}$$

Donde μ representa la media del crecimiento (altura o longitud foliar) correspondiente a cada tratamiento.

Resultados

Análisis descriptivo de la muestra de chile

Descripción de la planta muestreada

Al llevar a cabo un análisis visual de la muestra recolectada de Valle de la Trinidad, principalmente se observaron tallos frágiles, hojas con arrugamiento, manchas extendidas con tonalidades amarillas y cafés, así como huecos predominantes. Respecto a los frutos, presentaban síntomas de clorosis, arrugamiento, enrollamiento severo del fruto, anillos concéntricos en algunos ejemplares y puntos amarillos con hundimientos los cuales abarcaban casi toda la superficie (Figura 10).

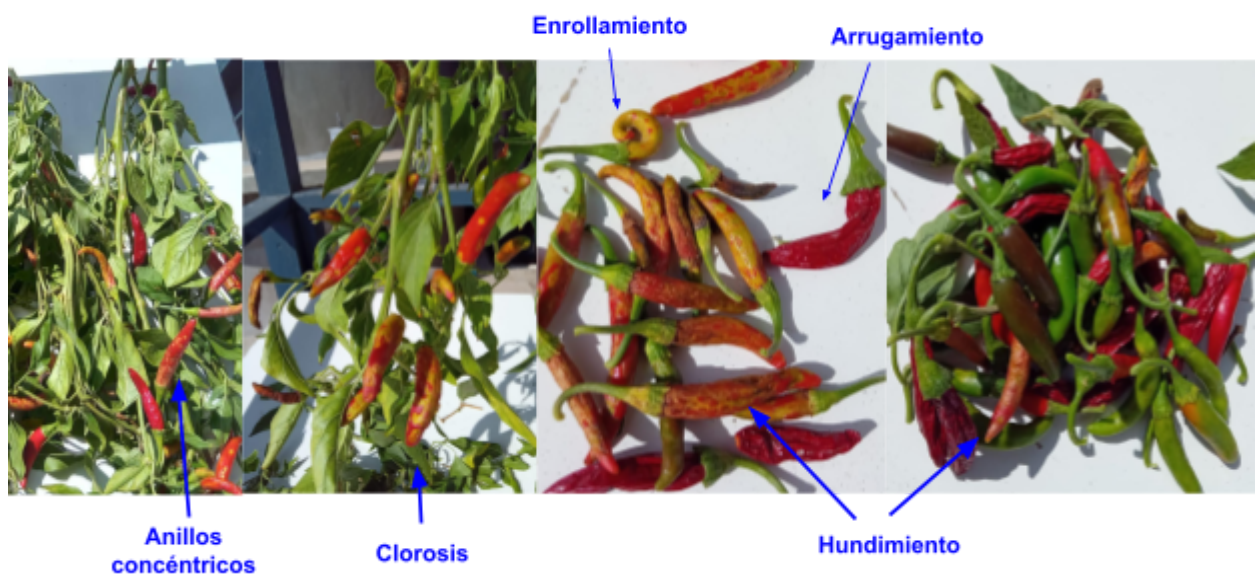


Figura 10. Síntomas detectados en la muestra proveniente de cultivos de chile en el Valle de la Trinidad.

Diagnósticos moleculares e inmunológicos

Se obtuvieron dos muestras de RNA total a partir de tejido vegetal de la muestra de chile infectado (M2H y M2F) y se analizaron por espectrofotometría para determinar las concentraciones obtenidas y la relación de absorbancia a dos longitudes de onda como indicativo de la calidad final (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de concentración y pureza del RNA extraído de la muestra de chile.

Muestra	RNA ng/ μ L	Abs 260/280
Hoja de chile (M2H)	839.9	2.07
Fruto de chile (M2F)	334.6	1.93

Posteriormente, se realizaron diagnósticos dirigidos a diferentes virus o grupos de virus. Al analizar el gel de agarosa correspondiente al diagnóstico para ToBRFV (Figura 11), se observó una banda en el carril correspondiente al control positivo cercana al valor esperado de 475 pb, mientras que en el carril para el control negativo (sin templado) no se observó amplificación, lo que confirmó la correcta ejecución del experimento. En el caso de las muestras sospechosas de chile no hubo presencia de bandas específicas para el diagnóstico de ToBRFV.

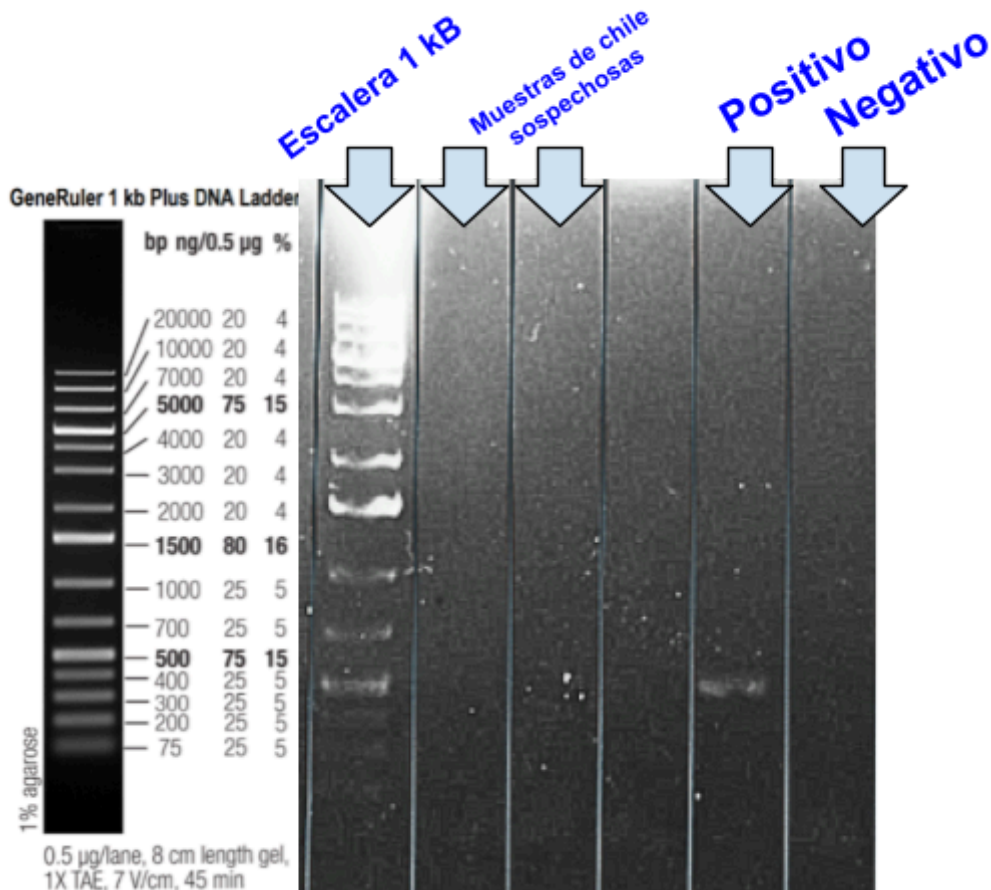


Figura 11. Gel 1.5% agarosa observado en transiluminador para identificar la posible presencia de ToBRFV en muestras de chile sospechosas. Se utilizó la escalera GeneRuler 1kB.

Asimismo, se realizó un gel para el diagnóstico de TSWV (Figura 12). En el carril con la muestra positiva se observó una banda alrededor de los 800 pb, mientras que ninguna banda en control sin templado. Para este caso no se observaron bandas específicas alrededor de 800 pb en las muestras problema de Chile, por lo que se descarta la presencia del virus en ellas.

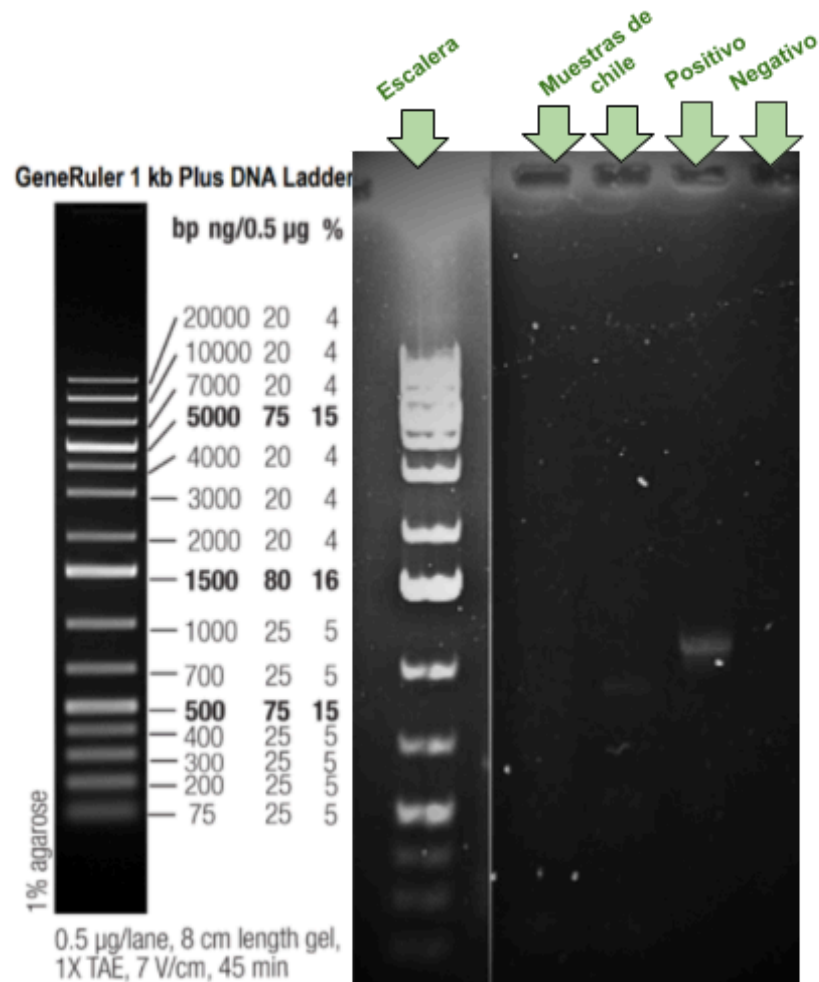


Figura 12. Gel 1.5% agarosa observado en transiluminador para identificar la presencia de TSWV en muestras de Chile sospechosas. Se utilizó la escalera GeneRuler 1kB.

Por otro lado, en el gel correspondiente al diagnóstico de tobamovirus (Figura 13), los carriles correspondientes a controles negativos no mostraron amplificación, lo que confirmó la confiabilidad del ensayo. En los carriles que contenían las muestras destinadas a la detección de tobamovirus, se observaron bandas tenues y difusas aproximadamente a la altura de 1.2 Kb, sin embargo, se consideraron negativas debido a que no corresponden con el tamaño esperado (1 Kb) y que, además, estas bandas fueron purificadas y

secuenciadas por personal del Laboratorio de Virología Agrícola, y el análisis posterior reveló que los fragmentos correspondían a secuencias genómicas de la planta.

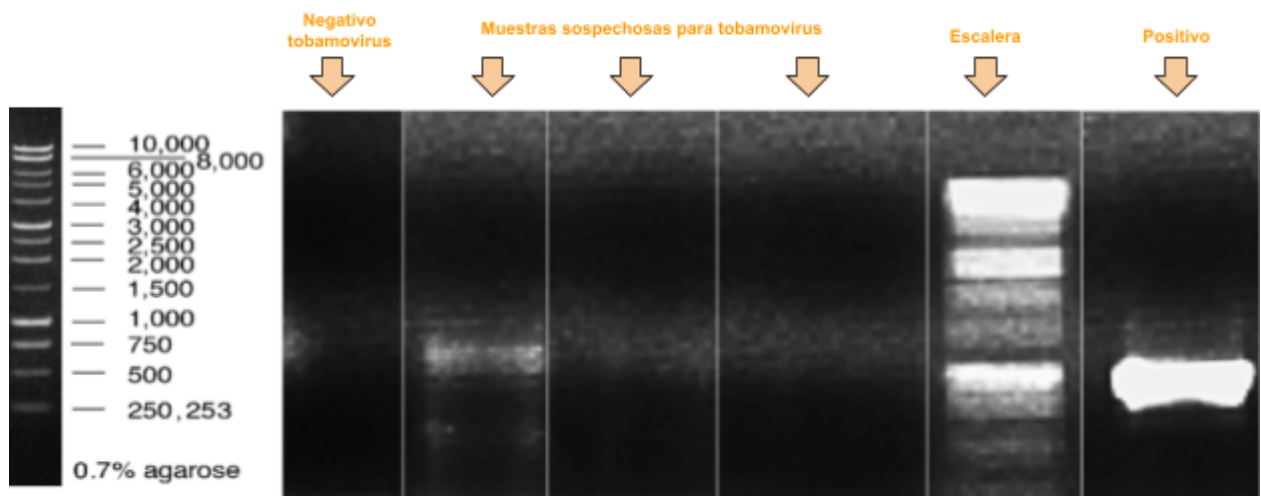


Figura 13. Gel 1.5% agarosa observado en transiluminador para identificar la presencia de tobamovirus en muestras de Chile sospechosas. Se utilizó la escalera GeneRuler 1kb.

En el gel realizado para visualizar el resultado del diagnóstico para detectar potyvirus (Figura 14), los carriles negativos no mostraron banda, y en el caso del carril con el positivo se observó una banda de alrededor de 349 pb. En los carriles con las muestras problema se observaron bandas débiles a la altura de 300 pb. Estas bandas fueron purificadas y secuenciadas por personal del Laboratorio de Virología Agrícola y su análisis mostró que los fragmentos obtenidos correspondían a una amplificación inespecífica a partir del genoma de la planta, por lo que no resultaron positivas con estos cebadores específicos.

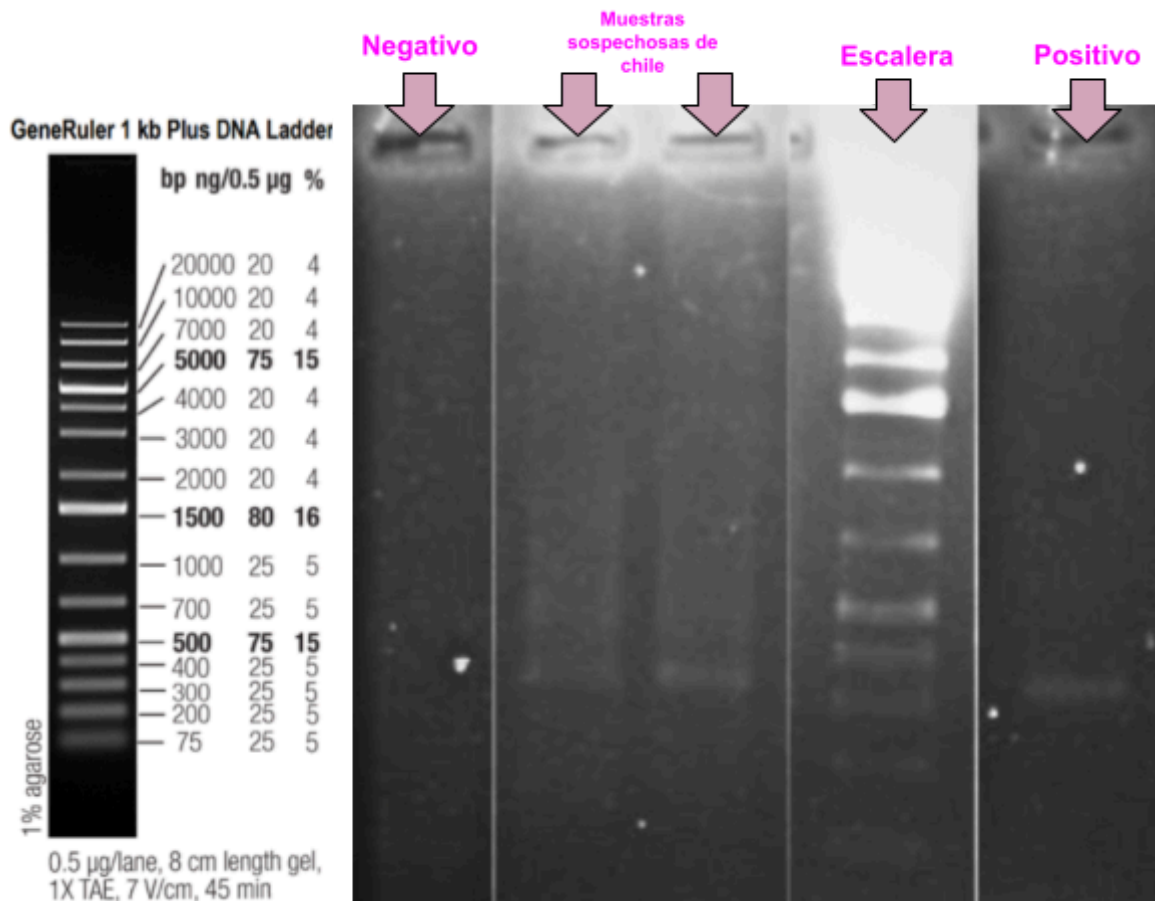


Figura 14. Gel 1.5% agarosa observado en transiluminador para identificar la presencia de potyvirus en muestras de Chile sospechosas. Se utilizó la escalera GeneRuler 1kb.

Los resultados obtenidos para las pruebas ELISA de TMV mostraron que en los pocillos correspondientes tanto a los controles positivos de planta con ToBRFV como a los controles del kit para TMV se observó la coloración característica de una reacción positiva. Cabe mencionar que en los pocillos 3G y 3H, donde se ubicaron los controles positivos del kit, la intensidad de color fue mayor en comparación con la observada en los pocillos 3E y 3F, correspondientes a la planta con ToBRFV. Esto sugiere la presencia de cierta reacción cruzada de los anticuerpos dirigidos a TMV hacia el virus ToBRFV (Figura 15).

Por otro lado, los controles negativos tanto del kit de la prueba ELISA como de planta de tomatillo libre de virus no presentaron coloración, lo que indica que el ensayo se realizó correctamente. Mientras tanto, al analizar las muestras del resto de la placa no se identificó indicios de que las muestras de Chile pudieran contener TMV debido a que no presentan coloración amarilla.

Las observaciones anteriores fueron confirmadas mediante las mediciones de absorbancia obtenidas con el espectrofotómetro (Tabla 6). Los controles negativos indicaron valores entre 0.1239 y 0.1316, lo que confirmó su validez, ya que no superaron el umbral de absorbancia de 0.3 establecido para considerar una reacción positiva. En contraste, las muestras infectadas con ToBRFV registraron valores de absorbancia intermedios (0.3825 y 0.3629), mientras que los valores más altos correspondieron a los controles positivos de TMV proporcionados por el kit (3.2336 y 3.4185).

Por otro lado, las muestras sospechosas de Chile, ubicadas entre las casillas 1E-1H, presentaron valores de absorbancia entre 0.1311 a 0.1683. Estos valores fueron similares a los observados en los controles negativos, además de que se encontraron por debajo del umbral de 0.3, por lo que se consideró que no hay evidencia de la presencia de TMV en dicha muestra.

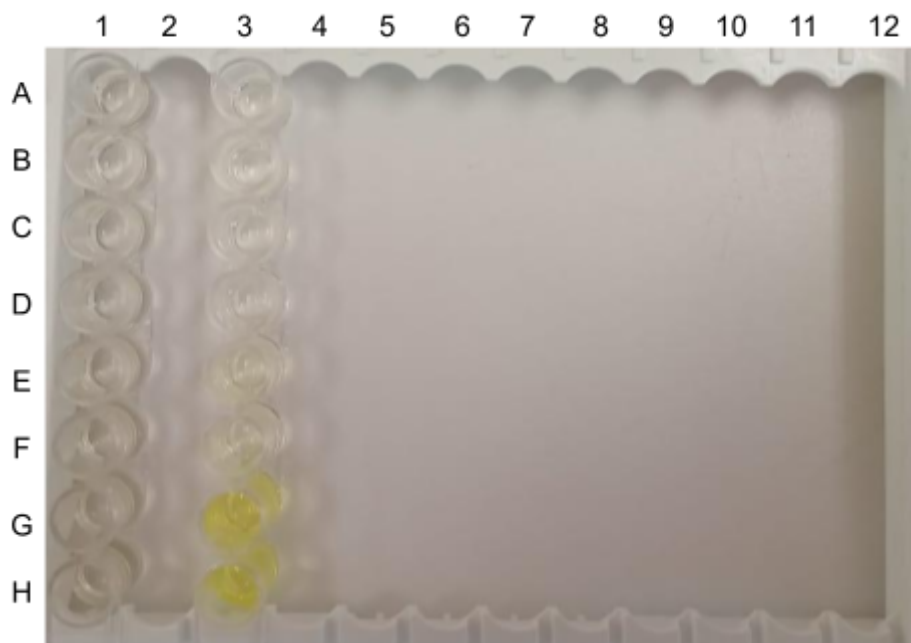


Figura 15. Resultados obtenidos para la placa de prueba ELISA para TMV en muestras de tejido sintomático de Chile.

Tabla 6. Resultados obtenidos de la placa de prueba ELISA para TMV para muestras de Chile.

	1	3
A	0,1239	
	Negativo planta	
B	0,1316	
	Negativo planta	
C	0,1255	
	Negativo kit	
D	0,1304	
	Negativo kit	
E	0,1421	0,3825
	Chile H	(+) ToBRFV planta
F	0,1311	0,3629
	Chile H	(+) ToBRFV planta
G	0,1683	3,2336
	Chile T	(+) TMV ELISA
H	0,1633	3,4185
	Chile T	(+) TMV ELISA

Para el caso de la placa de la prueba ELISA para ToBRFV (Figura 16), los resultados fueron similares, debido a que los únicos pocillos que mostraron coloraciones amarillas fueron los correspondientes a los controles positivos del kit y de la planta de tomate con ToBRFV, mientras que los controles negativos y aquellos que contenían las muestras de Chile sospechosas se mantuvieron incoloras durante el ensayo.

Las lecturas de absorbancia mostraron que los controles negativos presentaron valores de absorbancia entre 0.1484 a 0.171, validando la prueba por la ausencia de contaminación al no superar el umbral de 0.3. Por otro lado, los controles positivos presentaron valores de absorbancia que ascienden desde 3.9659 a 4, demostrando que la prueba fue confiable. Respecto a las muestras de Chile, específicamente las de hoja exhibieron valores de 0.2248 y 0.2029, mientras que las de fruto indicaron absorbancias de 0.2182 y 0.2494, en ambos casos se ubicaron por debajo del umbral de corte para considerar una muestra positiva, por lo que se interpretaron como negativas a la presencia de ToBRFV (Tabla 7).

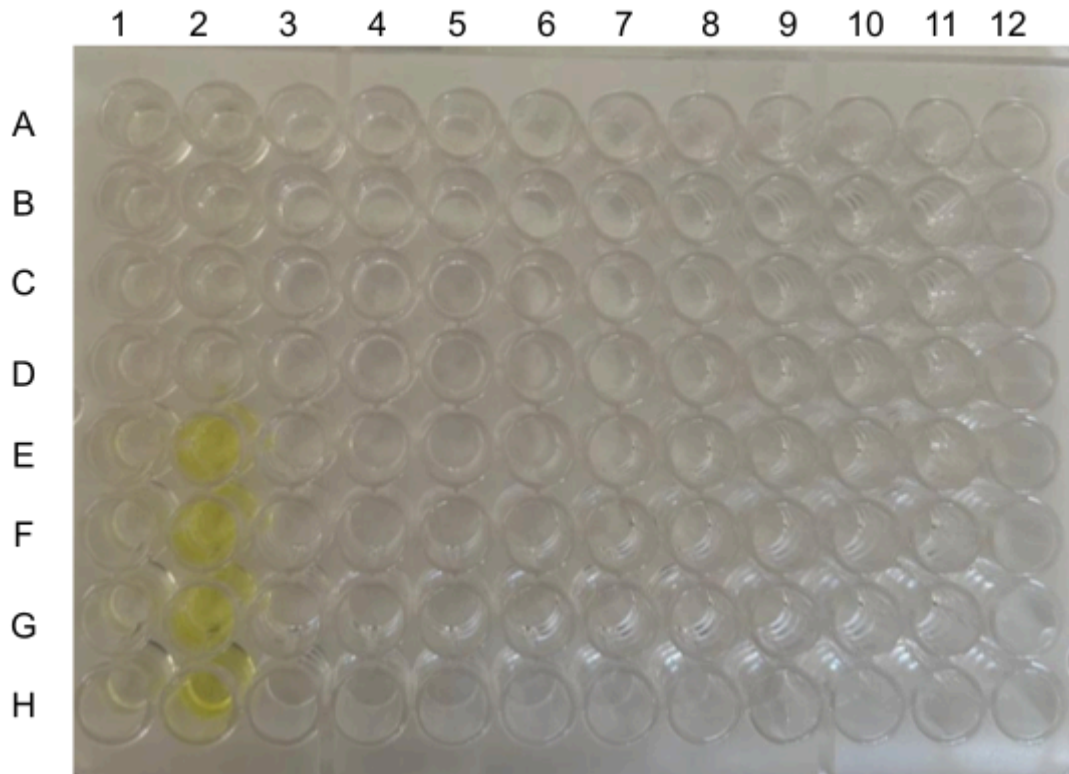


Figura 16. Resultados obtenidos para la placa de prueba ELISA para ToBRFV en muestras de tejido sintomático de Chile.

Tabla 7. Resultados obtenidos de la placa de prueba ELISA para ToBRFV para muestras de Chile.

	1	2
A	0,1517	
	Negativo planta	
B	0,171	
	Negativo planta	
C	0,1484	
	Negativo kit	
D	0,1554	3,9886
	Negativo kit	(+) ToBRFV planta
E	0,2248	3,9886
	Chile H	(+) ToBRFV planta
F	0,2029	4,0000
	Chile H	(+) ToBRFV planta
G	0,2182	3,9659
	Chile T	(+) control ToBRFV
H	0,2494	3,9657
	Chile T	(+) control ToBRFV

Resultados del enriquecimiento de material infectado para obtención de potenciales partículas virales

La adaptación del protocolo Foster, G. D., y Taylor, S. C. (1998) se siguió para obtener partículas virales parcialmente purificadas a partir de tejido foliar de chile infectado de la muestra original de campo. La resuspensión final en buffer fosfato 10 mM permitió recuperar un material homogéneo que facilitó la observación de partículas virales mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Figura 17-18).



Figura 17. Pellet obtenido y su resuspensión como resultado de la purificación parcial de partículas virales.

A través de la preparación y análisis de micrografías electrónicas de transmisión (80 kV) se identificaron partículas con morfología congruente con estructuras virales. Las partículas mostraron forma icosaédrica y se encontraron aglomeradas, en algunas de ellas se lograron identificar aristas definidas y una posible membrana que las rodeaba (Figura 18). Las mediciones realizadas con el programa Fiji (versión windows-x64) mostraron un diámetro promedio entre 23 y 31 nm por partícula.

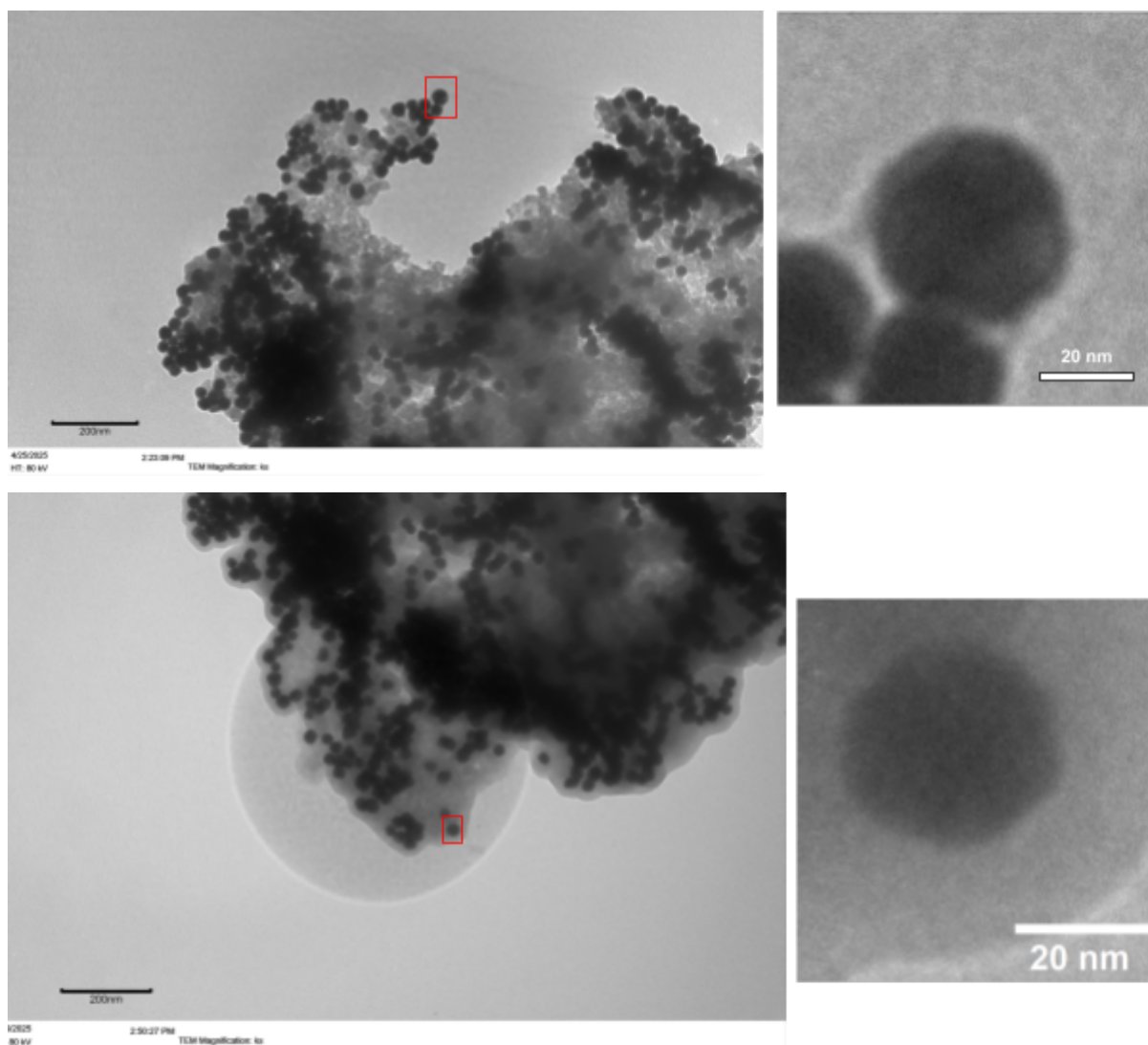


Figura 18. Micrografías electrónicas de transmisión de partículas virales observadas en tejido infectado de Chile. **Cuadros rojos:** indican la posición exacta de la partícula que se muestra ampliada a la derecha, a una escala de 20 nm.

En la Figura 39, se muestra un histograma con la distribución de tamaños de las partículas observadas. El rango abarca desde 19 a 37 nm, sin embargo, esta distribución no fue uniforme debido a que el rango con mayor frecuencia es de 25 a 27 nm, mostrando una frecuencia absoluta de 38 partículas, por lo tanto, las partículas virales que presentaron este tamaño fueron las dominantes. Asimismo, se identificó una distribución de tipo asimétrica, donde los datos tuvieron una mayor inclinación hacia el lado izquierdo abarcando tamaños menores. Se observó que posterior al pico de 38 partículas, la frecuencia disminuyó considerablemente, no obstante, se identificó un segundo pico prominente con un rango de 29 a 31 nm abarcando 20 partículas con este tamaño. Por lo tanto, la mayor parte de las partículas se localizaron en un rango de 23 a 31 nm, siendo los rangos de tamaño más

pequeño de 19-21 nm y los de mayor tamaño de 35 a 37 nm, estos últimos dos rangos fueron los que presentaron las frecuencias más bajas con 2 y 3 partículas respectivamente.

Los tamaños de partículas que se encontraron fuera de este rango y que incluyeron frecuencias altas y bajas en los extremos podrían deberse a la variabilidad estructural, ya que se observó un patrón donde el virus analizado se caracteriza por partículas de morfología pequeña y tamaños parcialmente uniformes, o debido a una infección mixta con más de un virus.

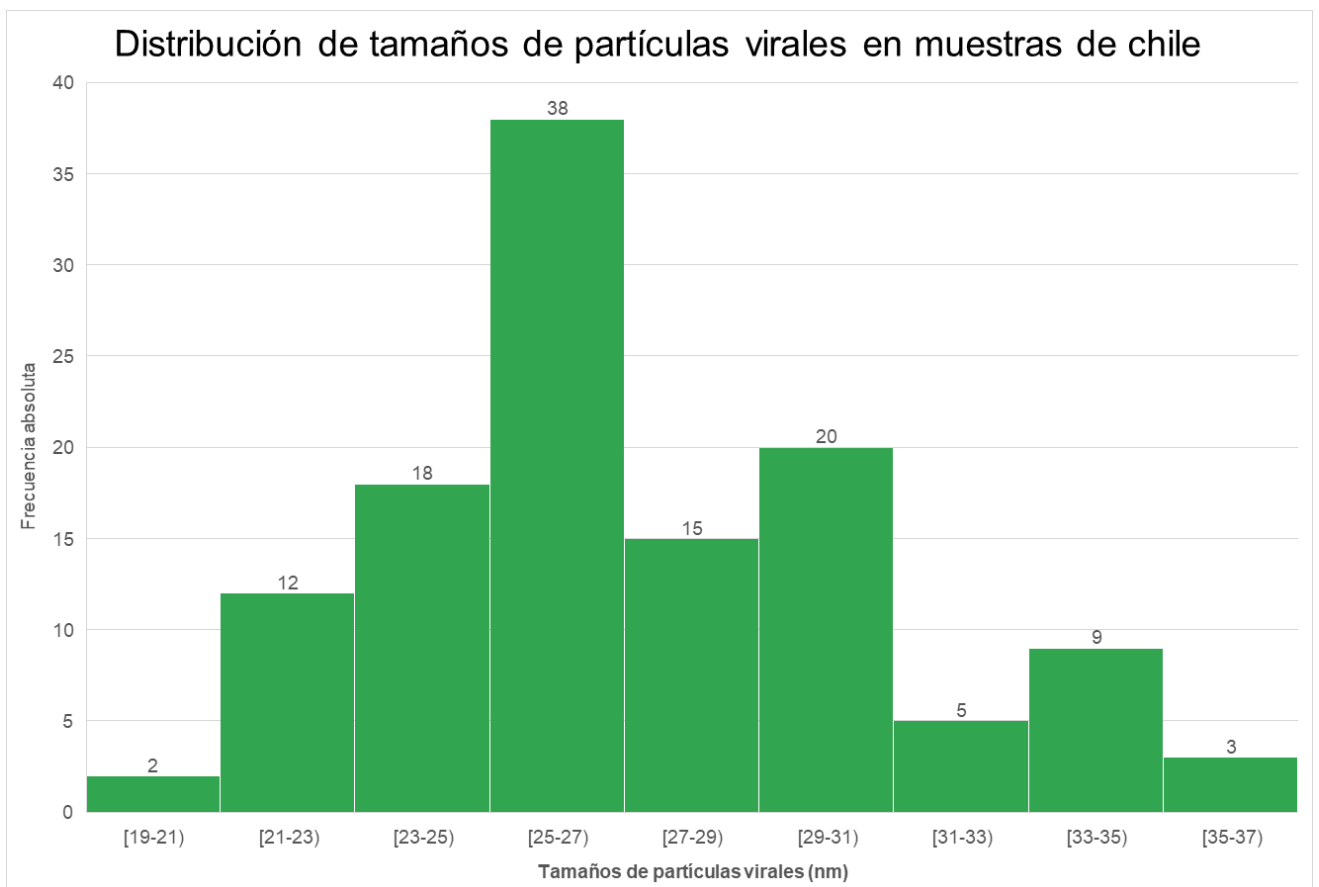


Figura 19. Histograma de la distribución de los tamaños de partículas virales identificadas en las micrografías electrónicas de muestras de Chile infectado.

Prueba de postulados de Koch-Rivers mediante experimentos de transmisión mecánica

Se realizaron tres réplicas para los ensayos de transmisión mecánica en plantas sanas de chile con el propósito de evaluar la inducción de síntomas y confirmar la presencia del agente infeccioso mediante su transmisión mecánica. A continuación se presentan los resultados de cada réplica.

Réplica 1 de inoculación mecánica

Este ensayo se realizó con 14 plantas en el grupo control negativo (CN), 14 plantas en el grupo Mock y 17 plantas en el grupo inoculado con extracto de plantas enfermas (EPE). En el tratamiento Mock, aunque se produjo daño mecánico, las hojas continuaron su crecimiento normal, al igual que en el CN, cuyas plantas presentaron hojas de tonalidades verde, aspecto frondoso y mayor tamaño (Figura 20). Los primeros síntomas en el tratamiento EPE se observaron a los cuatro días posteriores a la inoculación (dpi), manifestándose como enrollamiento foliar, aborto de la hoja inoculada, retraso en el crecimiento y amarillamiento generalizado de la planta, como se muestra en la Figura 20.

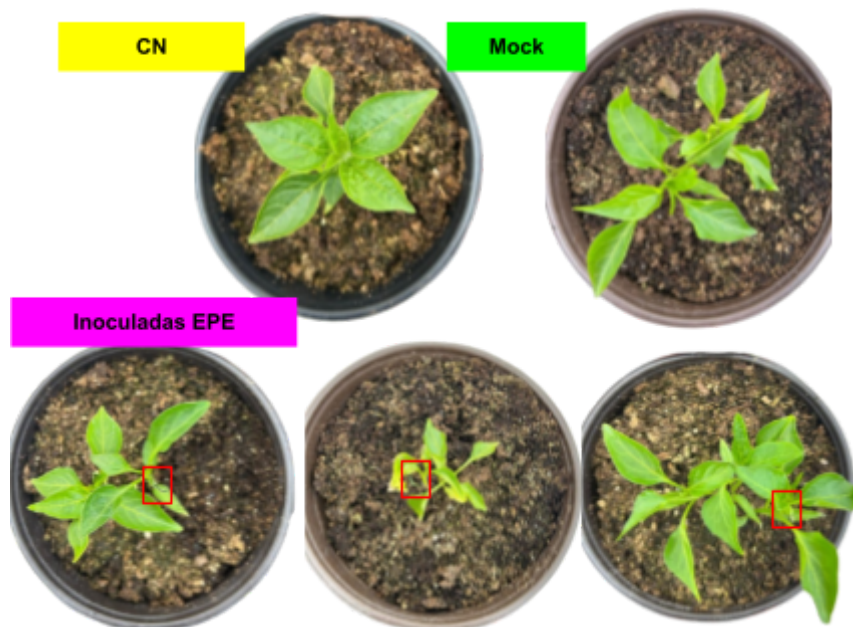


Figura 20. Comparación entre los grupos de tratamiento a los 4 dpi en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. **Cuadro rojo:** enrollamiento en la hoja inoculada posteriormente abortada.

El procedimiento se consideró positivo para transmisión mecánica del agente etiológico, ya que las plantas del grupo EPE presentaron síntomas evidentes de afectación en comparación con los demás tratamientos. A los 4 dpi, 8 de las 17 plantas inoculadas mostraron marchitez, amarillamiento, clorosis, enrollamiento foliar, enanismo, necrosis en las puntas de las hojas, debilitamiento de tallos y hojas, así como un proceso acelerado de senescencia (Figuras 21 y 22). La progresión del decaimiento y la senescencia se hizo más evidente hacia el día 22 dpi, momento en el que 13 plantas del grupo EPE se encontraban completamente secas, mientras que en las cuatro restantes se observó aborto foliar en la hoja que recibió el inóculo mediante daño mecánico.

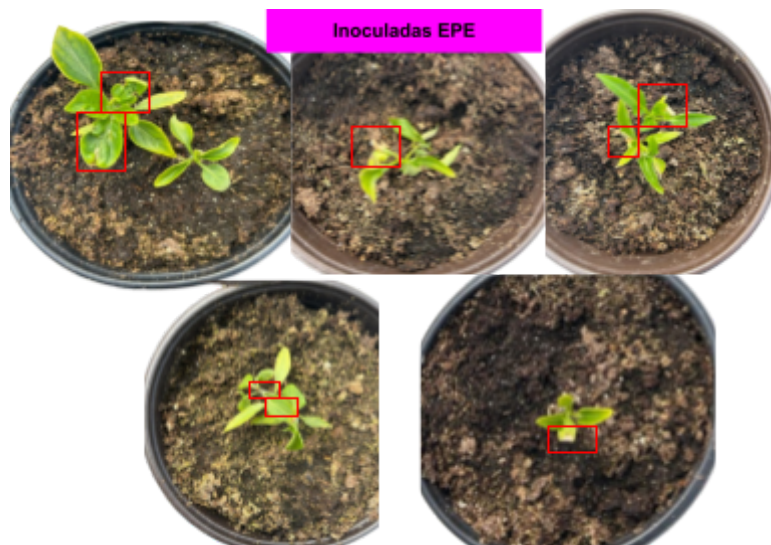


Figura 21. Síntomas detectados en las plantas del grupo EPE 10 dpi en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. **Cuadro rojo:** identificación de arrugamiento, marchitez, retraso en el crecimiento.



Figura 22. Síntomas detectados en las plantas del grupo EPE 22 dpi en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. **Cuadro rojo:** identificación de necrosis y senescencia.

En contraste, las plantas del tratamiento Mock no mostraron síntomas de virosis, únicamente presentaron señales del daño mecánico producido por la inoculación. Visualmente, mostraron un crecimiento adecuado, tonalidades de verde más intenso, los tallos y hojas más firmes y de una mayor densidad foliar. El control negativo mostró las mismas características, además de un mayor crecimiento y densidad de hojas superiores a los observados en los tratamientos Mock y EPE, como se observa en la Figura 23.

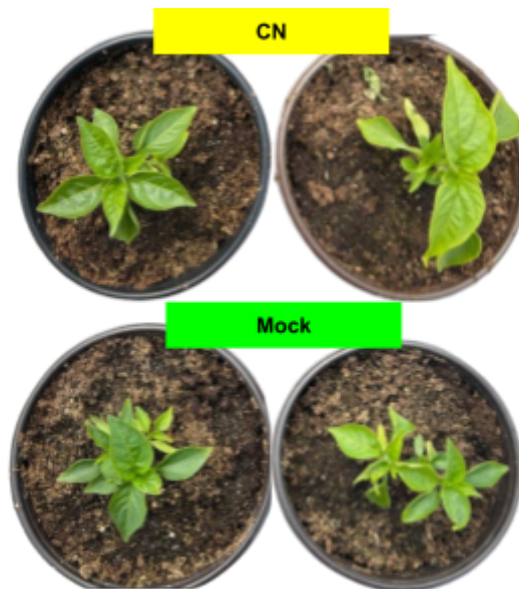


Figura 23. Contraste de los grupos control negativo y Mock 22 dpi en la réplica 1 de los experimentos de transmisión mecánica.

El análisis de la altura promedio de las plantas muestra que el CN presentó un crecimiento continuo y mayor al resto, alcanzando una altura promedio de 7.5 cm hasta el día 30 posterior a la inoculación. Las plantas del grupo Mock manifestaron una ligera variación en los primeros días después de la inoculación, sin embargo, mantuvieron un patrón de crecimiento semejante al CN (Figura 24). Las pruebas estadísticas mostraron que no hubo diferencia significativa entre ambos grupos (Tabla 8), lo que indicó que el daño mecánico generado en las plantas no influyó en el desarrollo vegetal. En contraste, las plantas EPE tuvieron un crecimiento más lento y menor en comparación con los grupos CN y Mock, la altura promedio no aumentó a partir de 19 dpi (Figura 24). Los análisis estadísticos mostraron que existe una diferencia significativa entre los grupos CN y EPE, por lo tanto, se asumió que el agente etiológico introducido influyó en el desarrollo usual de la planta (Tabla 15).

Tabla 8. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de alturas de plantas de Chile en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. CN (1)= 14 plantas, Mock (2) = 14 plantas, EPE (3)= 17 plantas. El análisis estadístico se realizó con los datos del día 30.

ANOVA de una sola vía						
Fuente de variación	SC (Suma de cuadrados)	gl (Grados de libertad)	CM (Cuadrado medio)	F	Valor p	F crítico
Entre grupos	68.004	2.000	34.002	3.436	0.041	3.220
Dentro de grupos	415.639	42.000	9.896			
Total	483.643	44.000				

Análisis Tukey				
Comparación de grupos	Diferencia de medias	Valor crítico de Tukey	¿Diferencia significativa?	Interpretación
1-2	0.971	2.794	No	-
1-3	2.895	2.794	Sí	1 > 3
2-3	1.924	2.794	No	-

Promedio de alturas de plantas de Chile en la primera réplica de inoculación mecánica

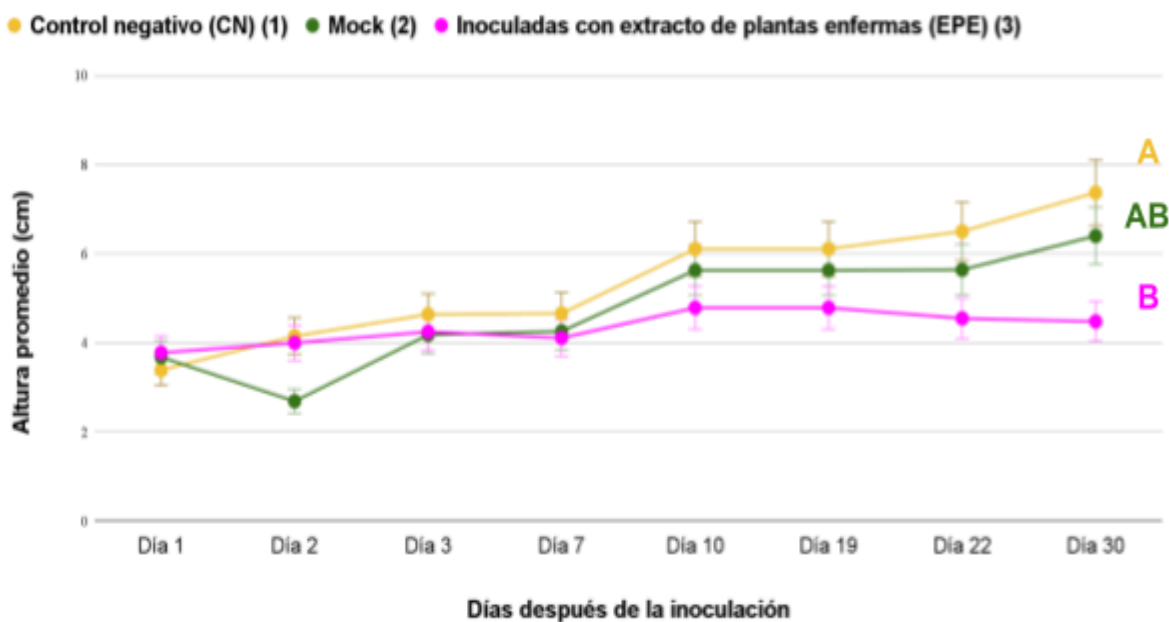


Figura 24. Análisis del promedio de alturas de plantas de Chile en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica indicando la desviación estándar (\pm DE) del promedio. La línea amarilla corresponde al control negativo (CN), la línea verde al tratamiento Mock, y la línea rosa a las plantas inoculadas con extracto de plantas enfermas (EPE). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba Tukey ($p < 0.05$): A = grupo con mayor promedio de altura, B = grupo con menor promedio de altura, AB = grupo sin diferencia con A y B.

Por otro lado, analizando el aumento en la longitud de las hojas que recibieron el daño mecánico con y sin inóculo, el análisis de datos mostró que las correspondientes al grupo Mock exhiben un incremento que alcanzó un pico máximo de 2.15 cm a los 19 dpi. Se observó una leve disminución a los 30 dpi; lo que se pudo atribuir al ciclo normal de la planta donde se desprende de las hojas senescentes (Figura 25). La longitud de las hojas Mock fue mayor en comparación con las plantas del grupo EPE, las cuales mostraron una disminución progresiva desde los 3 dpi en adelante. Esto se pudo adjudicar al aborto de las hojas que recibieron el inóculo, además se observa que a partir del 10 dpi la longitud promedio sufrió un decremento por debajo de 1.2 cm, alcanzando su pico más bajo a los 30 dpi con 0.8 cm donde la mayoría de las hojas que recibieron el inóculo habían sufrido necrosis o simplemente estaban en proceso de senescencia.

En adición, los análisis indicaron que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados Mock y EPE. El análisis Tukey mostró que la diferencia de medias entre los tratamientos Mock y EPE (1.007) fue mayor que el valor crítico de Tukey (0.649), confirmando que existieron diferencias significativas en el grupo EPE debido a que presentaron una longitud de hojas menor a las plantas del grupo Mock (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de longitud de hojas de chile en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. CN(1)= 14 plantas, Mock (2) = 14 plantas, EPE(3)= 17 plantas. El análisis estadístico se realizó con los datos del día 30.

ANOVA de una sola vía						
Fuente de variación	SC (Suma de cuadrados)	gl (Grados de libertad)	CM (Cuadrado medio)	F	Valor p	F crítico
Entre grupos	7.7875	1.0000	7.7875	9.6391	0.0042	4.1830
Dentro de grupos	23.4293	29.0000	0.8079			
Total	31.2168	30.0000				

Análisis Tukey				
Comparación de grupos	Diferencia de medias	Valor crítico de Tukey	¿Diferencia significativa?	Interpretación
2-3	1.007	0.649	Sí	2 > 3

Promedio de longitud de hojas de chile inoculadas en la primera réplica de inoculación mecánica

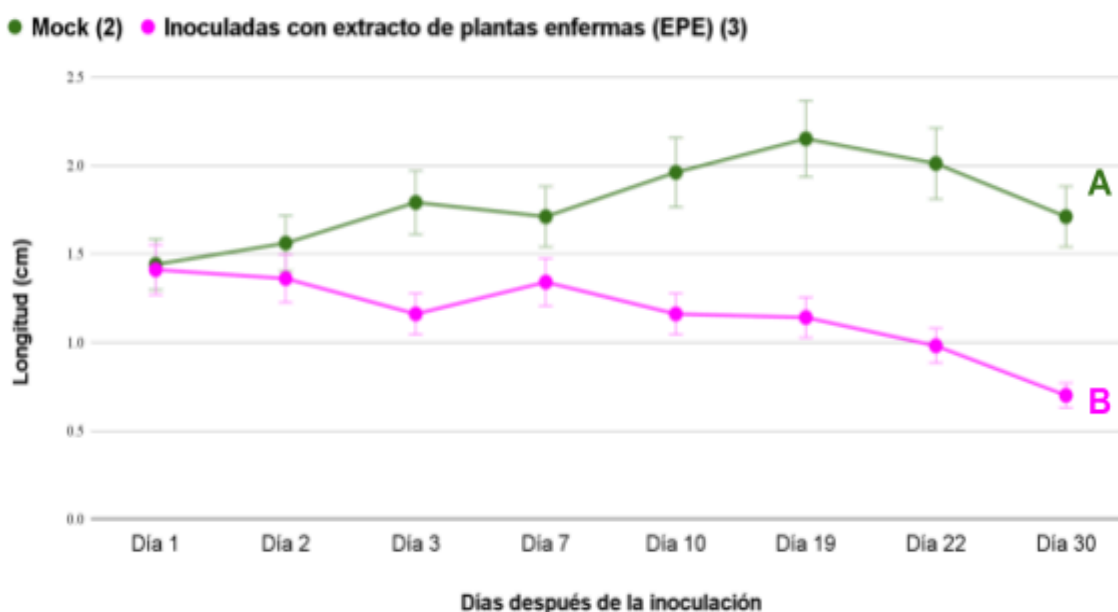


Figura 25. Análisis del promedio de longitud de hojas de chile en la primera réplica de los experimentos de transmisión mecánica indicando la desviación estándar (\pm DE) del promedio. La **línea verde** corresponde al tratamiento Mock, y la **línea rosa** a las plantas inoculadas con extracto de plantas enfermas (EPE). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba Tukey ($p < 0.05$): A= grupo con mayor promedio de altura, B= grupo con menor promedio de altura.

Réplica 2 de inoculación mecánica

En la segunda réplica se incluyeron tratamientos de CN y Mock ambos grupos con 10 plantas cada uno (Figura 26), inoculación con partículas virales (PV) concentradas “stock” y con diluciones 1:10 y 1:100 con 10 plantas cada grupo (Figura 27), e inoculación con EPE concentrado y en diluciones 1:10 a 1:1,000 con 10 plantas por grupo (Figura 28).

Los primeros síntomas se detectaron a los 8 dpi en los grupos de tratamiento EPE, identificándose entre ellos amarillamiento, flacidez de la planta, retraso de crecimiento, necrosis y enrollamiento de la hoja. En contraste, tanto el grupo CN como el grupo Mock mostraron tonalidades verdes intensas, mayor densidad foliar y buen crecimiento vegetal.

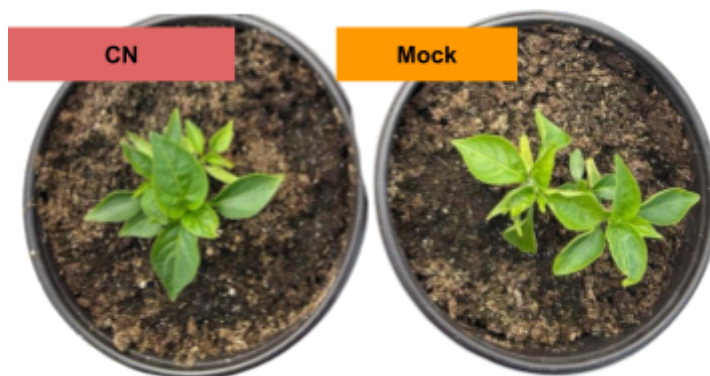


Figura 26. CN y Mock de la segunda réplica de inoculación mecánica a los 8 dpi de la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica.

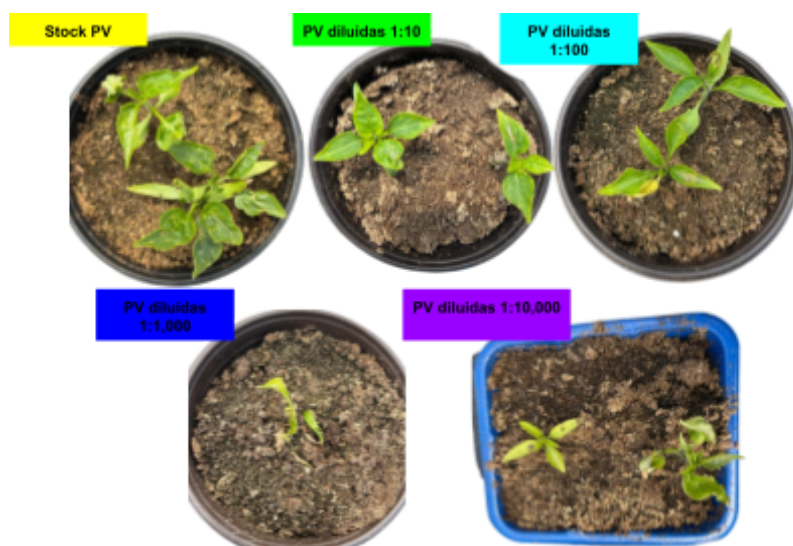


Figura 27. Síntomas identificados a los 8 dpi en los grupos de tratamiento correspondientes a la inoculación con stock de PV y sus diluciones en la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica.

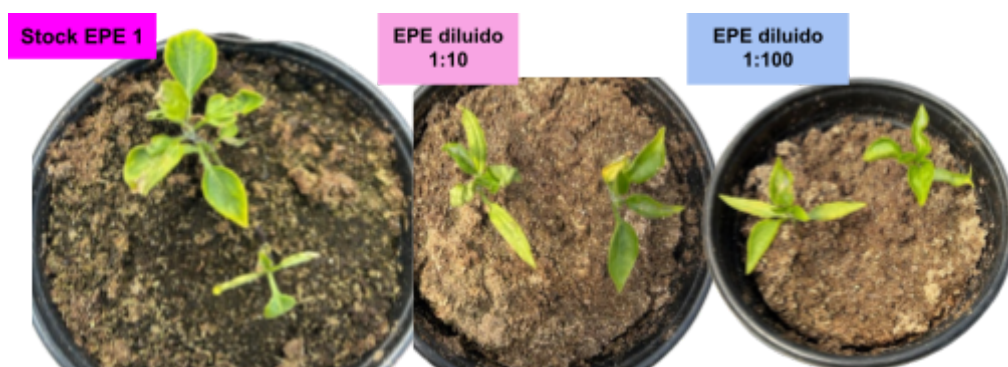


Figura 28. Síntomas identificados a los 8 dpi en los grupos de tratamiento EPE y sus diluciones en la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica.

En el análisis de la diferencia del promedio de alturas de plantas entre la primera y la última medición (1 y 11 dpi), se observó que el tratamiento Stock PV1 presentó una mayor diferencia de promedio de altura, mientras que el tratamiento PV diluidas 1:100 fue el que presentó los valores de crecimiento más bajos (Figura 29).

Al efectuar el ANOVA para el análisis de crecimiento ($p=0.013$), se concluyó que existió un efecto significativo de los tratamientos aplicados sobre la altura promedio de las plantas, donde al menos uno de los tratamientos contó con una altura promedio significativamente diferente al resto (Tabla 10). En cuanto a la prueba Tukey, se identificó que solo se presentó una diferencia significativa entre la comparación de Stock PV1 (3) y PV diluidas 1:100 (5), donde Stock PV1 indicó valores de crecimiento mayor que PV 1:100. Sin embargo, al compararlo con los controles CN (1), Mock (2) y otras diluciones de PV y EPE, no se identificaron diferencias significativas, por lo que la mayoría de los tratamientos expusieron un crecimiento estadísticamente semejante.

Tabla 10. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de altura de plantas de Chile en la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Cada tratamiento incluyó 10 plantas: CN, Mock, Stock PV 1 y PV diluidas 1:10 - PV diluidas 1:1,000, Stock EPE, EPE diluido 1:10, EPE diluido 1:100. El análisis estadístico se realizó con la diferencia de datos entre el 1 y 11 dpi.

ANOVA de una sola vía						
Fuente de variación	SC (Suma de cuadrados)	gl (Grados de libertad)	CM (Cuadrado medio)	F	Valor p	F crítico
Entre grupos	17.212	9.000	1.912	2.504	0.013	1.986
Dentro de grupos	68.725	90.000	0.764			
Total	85.937	99.000				

Análisis Tukey				
Comparación de grupos	Diferencia de medias	Valor crítico de Tukey	¿Diferencia significativa?	Interpretación
3 – 5	1.35	1.268	Sí	3 > 5

Diferencia de promedio de alturas entre la primera y última medición (1 y 11 dpi) de la segunda réplica de inoculación mecánica

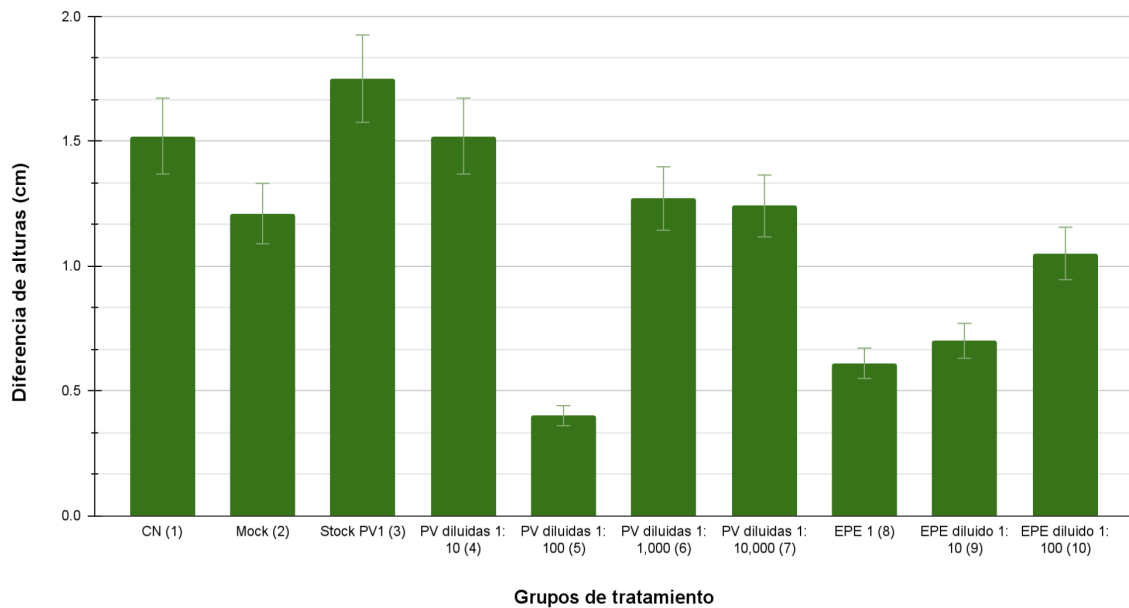


Figura 29. Análisis del promedio de alturas de plantas de chile en la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica. Las barras de error representan la desviación estándar (\pm DE) del promedio.

Cabe mencionar que en el transcurso de este experimento, y pese a los esfuerzos realizados para evitar entrada de insectos al invernadero, se detectó la presencia de pulgones y posibles insectos escama en todos los grupos de tratamiento a los 8 dpi como se muestra en la Figura 30, fue por esto que las mediciones de plantas se documentaron solo hasta los 11 dpi, pues no existía la certeza de que la transmisión mecánica del agente viral proviniera únicamente del inóculo obtenido del extracto de tejido vegetal sintomático y el enriquecimiento de partículas virales y no de los vectores biológicos que se identificaron.



Figura 30. Detección de insectos plaga en las plantas de la segunda réplica de los experimentos de transmisión mecánica a los 8 dpi.

Réplica 3 de inoculación mecánica

Se llevó a cabo una tercera réplica de inoculación mecánica con los mismos grupos de tratamientos utilizados en la segunda réplica: CN (9 plantas), Mock (8 plantas) e inoculación con Stock PV 1 (9 plantas) y sus diluciones 1:10 (9 plantas), 1:100 (9 plantas) y 1:1,000 (8 plantas), con el objetivo de observar el comportamiento y tendencias que no se pudieron manifestar con mayor detalle en la segunda réplica.

Las plantas del CN se desarrollaron de forma normal, sin anomalías en las hojas, mientras que las plantas del grupo Mock presentaron un pequeño arrugamiento en las hojas donde se aplicó el tratamiento debido al daño mecánico (Figura 31). Las plantas inoculadas con Stock PV1 (Figura 32), PV diluido 1:10 (Figura 33), PV diluido 1:100 (Figura 34) y PV diluido 1:1,000 (Figura 35), presentaron síntomas de arrugamiento, manchas blancas, puntas arrugadas y clorosis similares a los síntomas detectados en las réplicas anteriores.



Figura 31. Grupos de CN y Mock a los 8 dpi de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica.

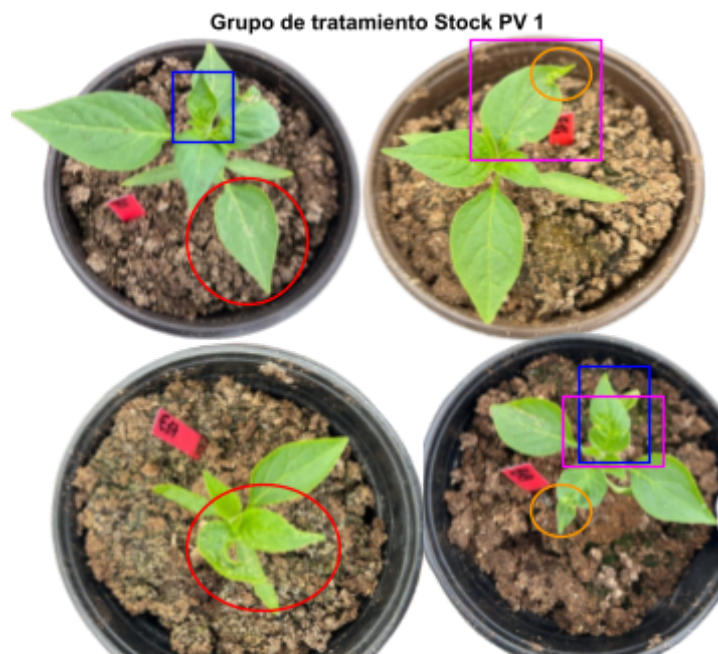


Figura 32. Síntomas detectados a los 8 dpi en el grupo de tratamiento Stock PV 1 de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. **Círculo rojo:** manchas blancas; **cuadro azul:** arrugamiento de hojas; **círculo naranja:** puntas arrugadas; **cuadro morado:** Clorosis.

Grupo de tratamiento de inoculación con PV diluido 1:10

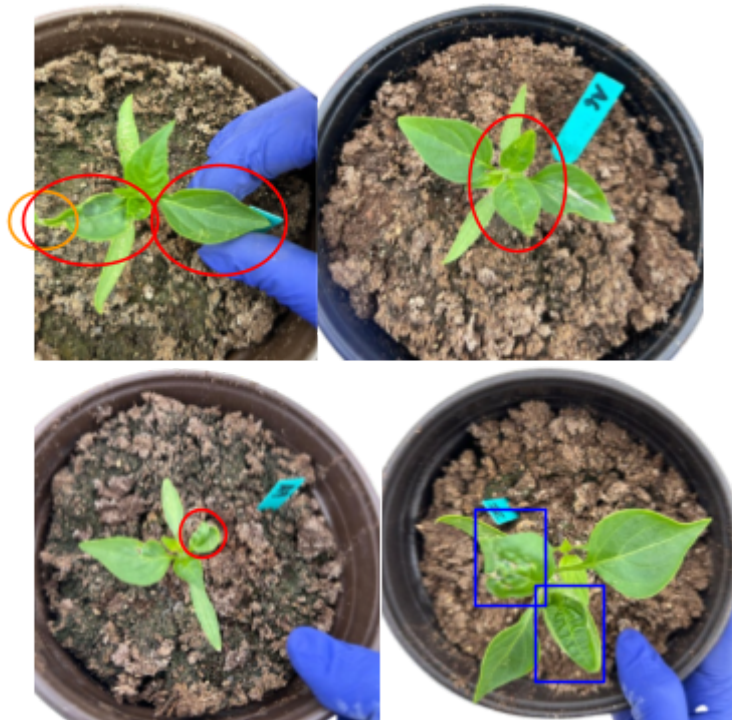


Figura 33. Síntomas detectados a los 8 dpi en el grupo de tratamiento PV diluido 1:10 de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. **Círculo rojo:** manchas blancas; **cuadro azul:** arrugamiento de hojas; **círculo naranja:** puntas arrugadas.

Grupo de tratamiento de inoculación con PV diluidas 1:100



Figura 34. Síntomas detectados a los 8 dpi en el grupo de tratamiento PV diluido 1:100 de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. **Círculo naranja:** Puntas arrugadas; **Cuadro morado:** Clorosis; **Círculo azul cielo:** Tonalidades amarillas.

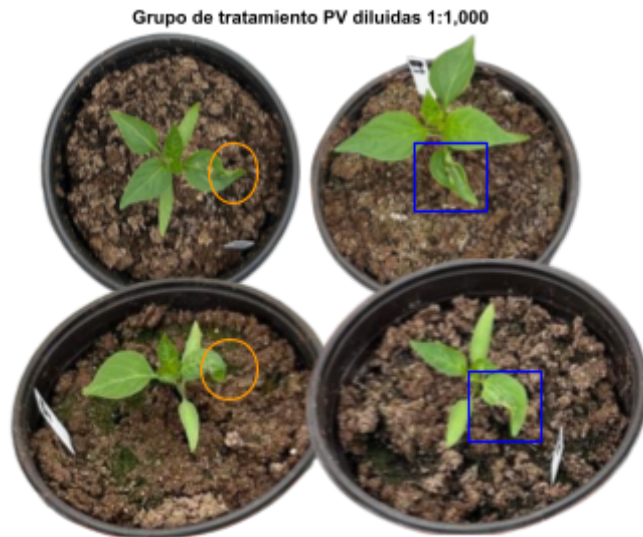


Figura 35. Síntomas detectados a los 8 dpi en el grupo de tratamiento PV diluido 1:1,000 de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. **Círculo naranja:** puntas de hojas arrugadas; **cuadro azul:** hoja arrugada.

A los 18 dpi, nuevamente se identificaron pulgones en las plantas de los grupos de tratamiento Stock de PV 1 y sus diluciones 1:10, 1:100 y 1:1,000, como se muestra en la Figura 27. Cabe destacar que a ese tiempo, no se detectaron estos insectos en los grupos de CN y Mock.

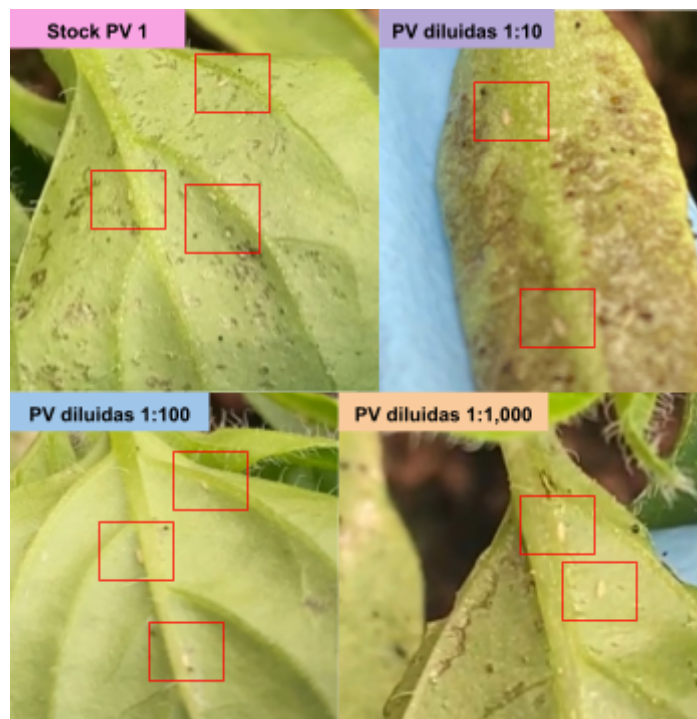


Figura 27. Identificación de pulgones a los 18 dpi en los grupos de tratamiento Stock PV y sus diluciones de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica.

Posteriormente, a los 26 dpi se identificaron signos distintos en las plantas inoculadas que se pudieron adjudicar a la presencia del insecto, principalmente amarillamiento más intenso, hojas ovaladas, necrosis en la parte inferior de la hoja que en algunos ejemplares se extendía hasta la parte superior, desaceleración del crecimiento, pérdida de nuevas hojas, reducción del tamaño foliar, enrollamiento severo y patrón de mosaico (Figura 36). En contraste con CN y Mock, en estos dos grupos se observó un crecimiento más sano con mayor densidad foliar, coloraciones de verde intenso y un mejor crecimiento en general (Figura 37).



Figura 36. Síntomas detectados en grupos Stock PV 1 y sus diluciones a los 26 dpi de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica.



Figura 37. Grupos CN y Mock de la tercera réplica a los 26 dpi de la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica.

Respecto a la medición de las plantas, en la Figura 38 se observó que aquellas correspondientes a los grupos CN y Mock presentaron el mayor promedio de alturas, y este rasgo se acentuó en mayor medida a partir del 20 dpi, lo cual reflejó la ausencia de efectos negativos en este tiempo del experimento. En el caso del grupo de tratamiento de Stock de PV 1 y las diluciones de PV 1:10 y 1:100 presentaron un crecimiento constante hasta el día 20 dpi, posterior a ello disminuyeron el promedio indicando un efecto negativo tardío del tratamiento. En cuanto al grupo PV diluidas 1:1,000, se mostró un crecimiento más limitado durante todo el transcurso del tratamiento.

El análisis estadístico se realizó con los datos del día 26, se identificaron diferencias significativas en la altura promedio de las plantas entre tratamientos evaluados ($p < 0.05$). La prueba de Tukey además mostró que los grupos CN (1) y Mock (2) presentaron medias significativamente mayores que los grupos con PV (3–6), lo que indicó que la inoculación mecánica de PV, incluso en distintas diluciones, provocó un efecto negativo en el crecimiento de las plantas (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de alturas de plantas de chile en la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. CN= 9 plantas, Mock= 8 plantas, Stock PV 1= 9 plantas, PV diluidas 1:10= 9 plantas, PV diluidas 1:100= 9 plantas), PV diluidas 1:1,000= 8 plantas).

ANOVA de una sola vía						
Fuente de variación	SC (Suma de cuadrados)	gl (Grados de libertad)	CM (Cuadrado medio)	F	Valor p	F crítico
Entre grupos	274.758	5.000	54.952	19.692	0.000	2.427
Dentro de grupos	122.782	44.000	2.791			
Total	397.540	49.000				

Análisis Tukey				
Comparación de grupos	Diferencia de medias	Valor crítico de Tukey	¿Diferencia significativa?	Interpretación
[1- 3]	4.97	2.486	Sí	1 > 3
[1- 4]	4.76	2.486	Sí	1 > 4
[1- 5]	4.36	2.486	Sí	1 > 5
[1- 6]	5.71	2.486	Sí	1 > 6
[2- 3]	5.17	2.486	Sí	2 > 3
[2- 4]	4.96	2.486	Sí	2 > 4
[2- 5]	4.56	2.486	Sí	2 > 5
[2- 6]	5.91	2.486	Sí	2 > 6

Promedio de alturas de plantas de chile en la tercera en la tercera réplica de inoculación mecánica

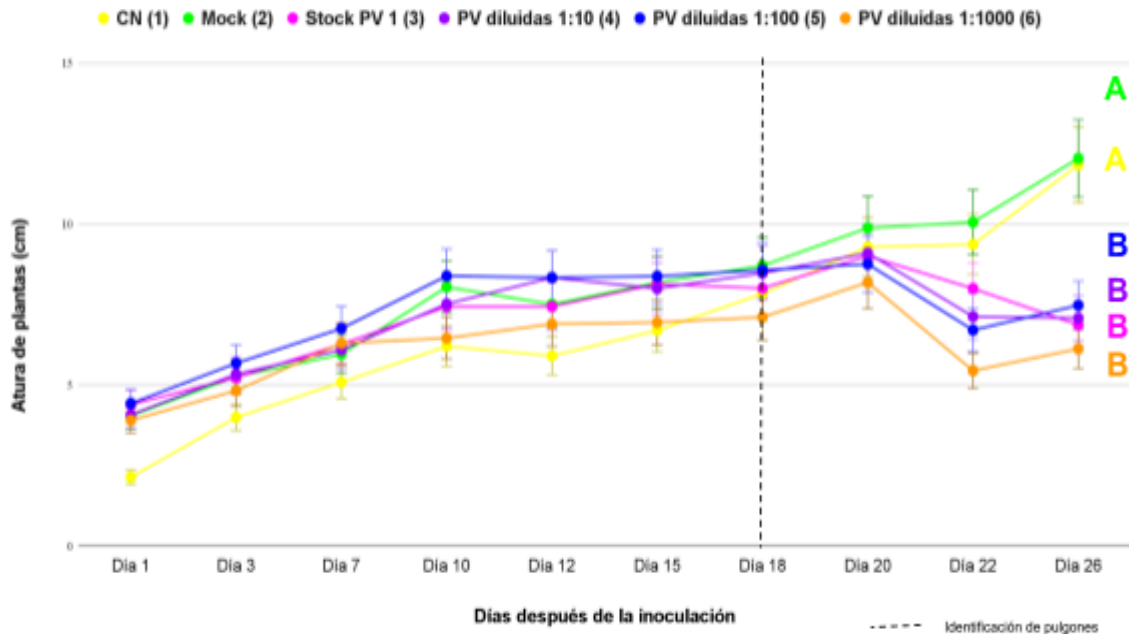


Figura 38. Análisis del promedio de alturas de plantas de chile en la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica indicando la desviación estándar (\pm DE) del promedio. La línea amarilla corresponde al control negativo (CN), la línea verde al tratamiento Mock, la línea rosa al tratamiento Stock PV 1, la línea morada al tratamiento PV diluido 1:10, la línea azul al tratamiento PV diluido 1:100, y la línea naranja al tratamiento PV diluido 1:1000. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba Tukey ($p < 0.05$): A= grupo con mayor promedio de altura, B= grupo con menor promedio de altura. Líneas punteadas indican primer avistamiento de pulgones en los grupos de tratamiento Stock PV y sus diluciones.

En seguimiento a las mediciones de la longitud de hojas, se observó que las hojas de todos los tratamientos mostraron un crecimiento progresivo hasta los 15 a 18 dpi, exponiendo valores promedio de 3.5 a 4 cm. Sin embargo, a partir del 20 dpi los tratamientos de los grupos que recibieron el inóculo decrecieron; en general, el grupo de PV diluidas 1:1,000 y el Stock PV 1 fueron los que mostraron las menores longitudes finales (Figura 39).

Según el análisis estadístico los tratamientos con partículas virales (PV y sus diluciones) afectaron significativamente la longitud de las hojas inoculadas en comparación con los controles CN y Mock ($p < 0.05$), mientras que la prueba de Tukey reveló que el promedio de la longitud de las hojas de los tratamientos Stock PV 1 (3), PV dilución 1:10 (4), PV dilución 1:100 (5) y PV dilución 1:1000 (6) fueron significativamente menores en comparación con el grupo Mock (2) (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis ANOVA de una sola vía del promedio de longitud de hojas de plantas de chile en la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica. CN= 9 plantas, Mock= 8 plantas, Stock PV 1= 9 plantas, PV diluidas 1:10= 9 plantas, PV diluidas 1:100= 9 plantas, PV diluidas 1:1,000= 8 plantas). El análisis estadístico se realizó con los datos del día 26.

ANOVA de una sola vía						
Fuente de variación	SC (Suma de cuadrados)	gl (Grados de libertad)	CM (Cuadrado medio)	F	Valor p	F crítico
Entre grupos	26.219	4.000	6.555	7.015	0.000	2.619
Dentro de grupos	35.508	38.000	0.934			
Total	61.726	42.000				

Análisis Tukey				
Comparación de grupos	Diferencia de medias	Valor crítico de Tukey	¿Diferencia significativa?	Interpretación
2 - 3	1.97	1.595	Sí	2 > 3
2 - 4	1.98	1.595	Sí	2 > 4
2 - 5	1.84	1.595	Sí	2 > 5
2 - 6	2.17	1.595	Sí	2 > 6

Promedio de longitud de hojas de chile en la tercera réplica de inoculación mecánica

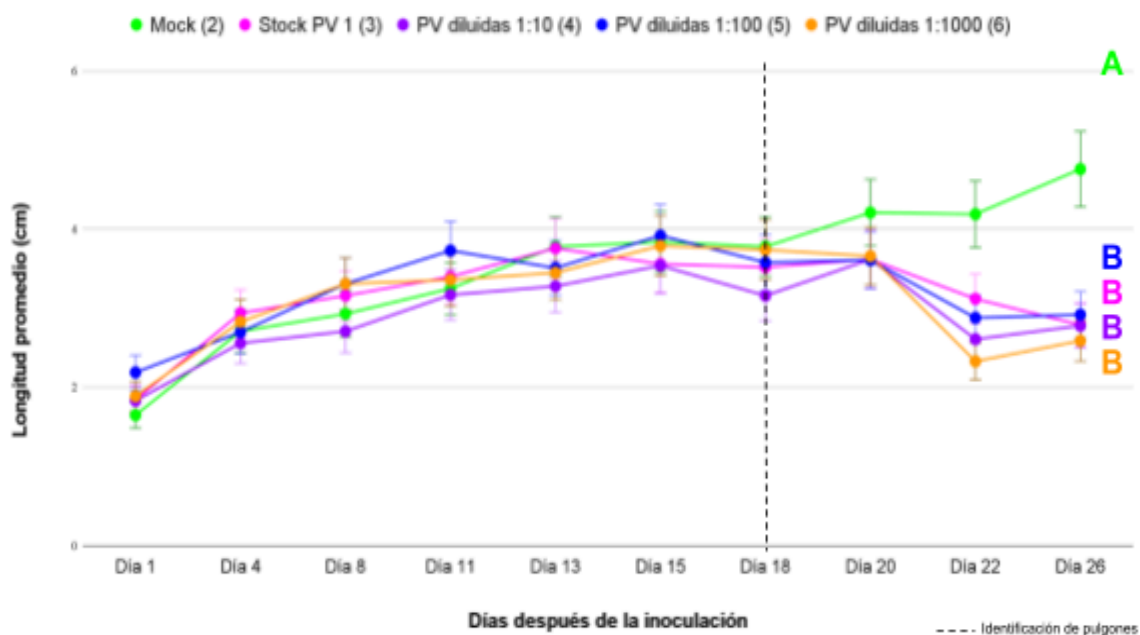


Figura 39. Análisis del promedio de longitud de hojas de plantas de chile en la tercera réplica de los experimentos de transmisión mecánica indicando la desviación estándar (\pm DE) del promedio. La línea verde corresponde al tratamiento Mock, la línea rosa al tratamiento Stock PV 1, la línea morada al tratamiento PV diluido 1:10, la línea azul al tratamiento PV diluido 1:100, y la línea naranja al tratamiento PV diluido 1:1000. Las letras indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos según la prueba Tukey ($p < 0.05$): A= grupo con mayor promedio de altura, B= grupo con menor promedio de altura. Líneas punteadas indican primer avistamiento de pulgones en los grupos de tratamiento Stock PV y sus diluciones.

Cabe señalar que las diferencias estadísticas observadas en el crecimiento de las plantas y en la longitud foliar, tanto en condiciones de daño mecánico con inoculación como sin ella, no pudieron atribuirse exclusivamente al efecto de la transmisión mecánica. Esto se debe a la presencia de insectos plaga detectada a los 18 dpi, la cual pudo interferir con el desarrollo de las plantas. Por lo tanto, se requieren experimentos adicionales para evaluar este efecto.

Discusión

La aplicación de los postulados de Koch-Rivers a través de los ensayos de transmisión mecánica proporcionó herramientas útiles para la evaluación de la presencia y el comportamiento de un agente viral en plantas de Chile, comparable con lo visto en campo en Valle de la Trinidad. Centrándose en la primera réplica de los ensayos de transmisión mecánica, se identificaron síntomas visibles con daños progresivos hasta los 22 dpi, donde muchos de los ejemplares de los grupos de tratamiento ya estaban secas o habían perdido las hojas con tratamiento, evocando una infección sistémica eficiente en las plantas que recibieron el inóculo. Además, se distinguió que tanto los tratamientos de CN como Mock presentaron un crecimiento saludable, indicando que aunque se realizó un daño mecánico, este no fue suficiente por sí solo para provocar síntomas, por lo que es posible descartar errores durante el procedimiento.

A partir del análisis de crecimiento de altura de la primera réplica, la afectación directa en el crecimiento se distinguió a partir del 18 dpi, sugiriendo una interrupción fisiológica del crecimiento vegetal. En el análisis de longitud foliar, se identificó el mismo patrón de crecimiento para los tres grupos de tratamiento, donde las que recibieron el inóculo viral, muestran que no solo se trató de una problemática que afecta únicamente al área inoculada, sino que se presentó como una afección sistémica que involucra el desarrollo vegetal en su totalidad.

Mientras tanto, para los experimentos de la réplica 3, tanto en el registro de crecimiento de la altura de las plantas como en la longitud de las hojas, el grupo PV diluidas 1:1,000 fue el que obtuvo un crecimiento más ralentizado, observándose desde etapas tempranas a pesar de ser la dilución con menor concentración. En este caso se observó un comportamiento contraintuitivo, los ejemplares a los cuales se les aplicó un inóculo con mayor concentración, si bien mostraron síntomas, no presentaron una alta severidad; dado que, cuando la planta recibe una carga viral alta muestra un mecanismo de defensa donde induce muerte en células infectadas que termina en necrosis de la hoja, limitando la propagación del agente viral. En cambio, con la aplicación de un inóculo con menor dilución, la planta no desencadenó tal desprendimiento foliar, dando lugar al avance de la infección de manera sistémica y manifestando síntomas con mayor severidad. Agrios, G. (2005) establece que la simple acumulación de partículas virales, o bien, de su material genético dentro de tejidos vegetales aunque se presente en concentraciones elevadas no siempre implica la presencia de ejemplares con manifestaciones visibles de la enfermedad,

presentando síntomas atenuados o pudiendo ser asintomáticas, mientras que, aquellas que reciben cargas virales más bajas suelen manifestar síntomas más perceptibles.

Cabe destacar que los resultados de los grupos tratados con partículas virales podrían variar de los identificados con extracto de plantas enfermas dadas las diferencias de concentración del agente etiológico entre ambos casos. En los tratamientos con partículas virales, su aplicación se llevó a cabo una vez que en el extracto se detectaron partículas, por lo que su concentración fue considerablemente superior. En cambio, el tratamiento con extracto de plantas enfermas contiene partículas virales en menor concentración.

Los análisis estadísticos aplicados a los registros de crecimiento de las plantas de Chile en las réplicas, muestran un patrón consistente en la respuesta diferencial en el crecimiento y el desarrollo foliar de las plantas de Chile. En la primera réplica, tanto la altura como la longitud foliar evidencian efectos significativos en el grupo tratado con EPE en contraste con CN y Mock, por lo que se infiere que el tratamiento con EPE afecta los procesos fisiológicos de las plantas. En la segunda réplica se identificó que la única diferencia significativa se identifica entre los tratamientos Stock PV1 y PV diluidas 1:100, por lo cual, aunque de manera general se identifica un efecto en los tratamientos, la variación entre la mayoría de los tratamientos (especialmente CN y Mock) no se considera lo suficientemente amplia para evidenciar diferencias estadísticamente relevantes. Este resultado no es sorprendente dado que se tuvo que detener el experimento antes de lo planeado por la infestación de insectos plaga. Por otro lado, en la tercera réplica tanto la altura como la longitud foliar manifestaron diferencias significativas entre los grupos PV y sus diluciones en contraste con los grupos CN y Mock.

En los análisis moleculares e inmunológicos se obtuvieron resultados donde se lograron descartar virus como ToBRFV, TSWV, y grupos como tobamovirus y potyvirus. Esto puede indicar la presencia de un virus no reportado previamente o alguna variante de los virus probados.

Asimismo, se realizó la purificación parcial de partículas virales en muestras sospechosas de Chile, y, a partir de micrografías electrónicas de transmisión se visualizaron partículas virales con morfología icosaédrica, donde en algunas de ellas se observaron aristas definidas. Las partículas más prevalentes fueron aquellas de dimensiones entre 25 y 27 nm de diámetro.

Los datos recopilados sobre la morfología de las partículas virales en cuanto a su forma y dimensiones fueron contrastados con partículas de distintos géneros reportados en la literatura (Figura 40): *Bromovirus* (27–31 nm) y *Cucumovirus* (29 nm), ambos pertenecientes a la familia *Bromoviridae*; *Tymovirus* (30 nm) de la familia *Tymoviridae*; así como *Tombusvirus* (30–32 nm) y *Sobemovirus* (26–32 nm) de la familia *Tombusviridae* (Lefkowitz, E. J. et al. 2017; Thompson, J. et al. 2025). Sin embargo, es necesario realizar más experimentos para determinar con certeza la identidad del virus encontrado.

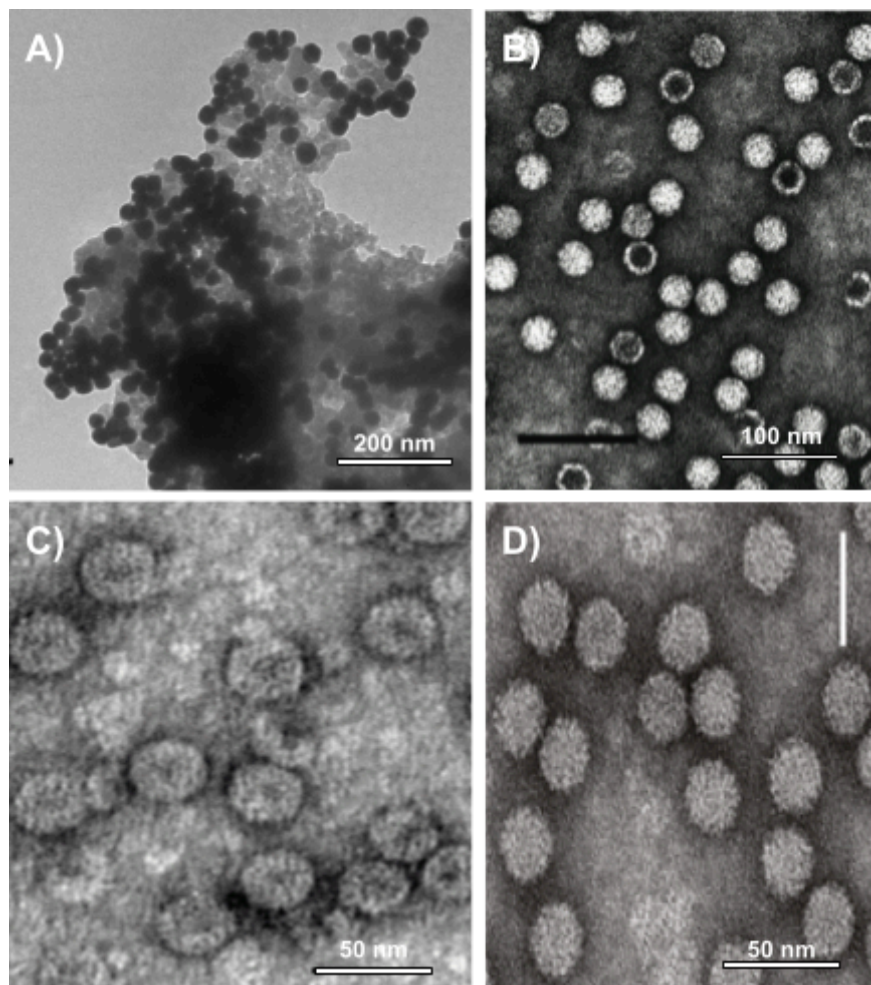


Figura 40. Comparación entre micrografías electrónicas de contraste negativo de partículas virales pertenecientes a familias y géneros que podrían corresponder al agente viral analizado en este estudio. A) Micrografía electrónica obtenida en el presente estudio. B) Micrografía electrónica representativa de virus del género *Tymovirus* (Lefkowitz, E. J. et al. 2017). C) Micrografía electrónica de partículas de virus de la familia *Bromoviridae* (Thompson, J. et al. 2025). D) Micrografía electrónica de partículas de virus del género *Tombusvirus* (Lefkowitz, E. J. et al. 2017).

Según los análisis realizados, la interpretación de la sintomatología registrada, el vínculo con insectos plaga, la identificación de las formas de transmisión, y el tipo y tamaño de partículas virales, se proponen las siguientes familias y géneros virales que podrían ser los agentes causales de la enfermedad detectada en el cultivo de chile en la región de Valle de la Trinidad (Tabla 13).

Tabla 13. Grupos de virus a los que posiblemente pertenece el agente etiológico de la enfermedad emergente en el cultivo de chile, Valle de la Trinidad (Hulo, C. et al. 2011; Lefkowitz, E. J. et al. 2017; Robles Hernández, L., et al. 2010; Thompson, J. et al. 2025)

Familia	Género	Partículas virales	Genoma	Tipo de transmisión	Vectores	Sintomatología de la enfermedad
<i>Tymoviridae</i>	<i>Tymovirus</i>	30 nm	6-6.7 Kb (RNA)	Se transmiten con facilidad a través de inoculación mecánica en todo el tejido principal de la planta hospedera.	Escarabajos de las familias <i>Chrysomelidae</i> y <i>Curculionidae</i> de forma semipersistente con baja eficacia de propagación.	Mosaico, moteado amarillo intenso, rayas cloróticas, clarificación de nervaduras, mosaicos y patrones grabados en hojas y enanismo.
<i>Bromoviridae</i>	<i>Bromovirus</i>	27 nm - 31 nm	8 Kb (RNA)	Se transmite por inoculación mecánica, polen, semillas e insectos vectores de manera no persistente.	Escarabajos y pulgones con baja eficiencia de transmisión. Posible transmisión por nematodos.	Mosaico, anillos concéntricos, retraso de crecimiento.
<i>Bromoviridae</i>	<i>Cucumovirus</i>	29 nm	8 Kb (RNA)	Inoculación mecánica, propagación no persistente entre vectores.	Propagación no persistente a través de áfidos.	Retraso de crecimiento, enanismo, mosaico, deformación, reducción del limbo foliar, necrosis en hojas, pecíolos y tallos.

<i>Tombusviridae</i>	<i>Tombusvirus</i>	30 nm - 32 nm	3.7-4.7 Kb (RNA)	Transmitidos por inoculación mecánica, contacto con material vegetal contaminado y semillas infectadas, puede estar presente en agua y suelo superficial infectado sin requerir vectores.	Propagación por escarabajos y hongo quítrido del género <i>Olpidium</i> .	Necrosis en hojas, moteado, deformaciones, arrugamiento y daños en el follaje.
<i>Solemoviridae</i>	<i>Sobemovirus</i>	26 nm -32 nm	4-6 Kb (RNA)	Se transmiten fácilmente mecánica y abióticamente por suelo y agua contaminados.	Transmisión mecánica no especificada mediante piezas bucales de escarabajos, pulgones, saltamontes y chinches míridos.	Presenta moteado y mosaico en hojas, lesiones necróticas, esclarecimiento de nervaduras, enanismo y esterilidad.
<i>Secoviridae</i> Subfamilia: <i>Comovirinae</i>	<i>Nepovirus</i>	28-30 nm	Bipartito RNA-1= 7.5 Kb RNA-2= 3.9 Kb	Transmitidos por semillas y polen.	Transmitidos de manera no persistente por nematodos longidoridos (<i>Xiphinema</i> , <i>Longidorus</i> o <i>Paralongidorus</i> spp.) Algunas especies se transmiten por ácaros.	Mancha anular, moteado y manchas, anillos concéntricos y líneas irregulares en hojas y frutos.

Todos los datos recopilados demuestran que se cumple de manera parcial con los postulados descritos por Koch-Rivers adecuados a la virología. Pese a los avances logrados, no fue posible llevar a cabo el aislamiento de partículas amplificadas en plantas de invernadero, ni la identificación definitiva del agente viral, esta limitación se debió a que no fue posible concretar una sesión en el Microscopio de Transmisión Electrónica (TEM) derivado a fallas técnicas del equipo durante el desarrollo del proyecto. Asimismo, se requieren más pruebas y experimentos complementarios a fin de identificar de manera precisa el agente causal viral implicado en este estudio.

Respecto a la detección de insectos plaga, lo descrito por Avyllón, M. et al. (2018) permite comprender su presencia en los experimentos realizados, ya que los insectos se conducen a través de estímulos. Principalmente se guían por señales visuales como colores verde claro y amarillo (500-600 nm de longitud de onda) ya que los pulgones muestran una mejor afinidad a las plantas que presentan síntomas de amarillamiento, promoviendo la diseminación posterior a plantas sanas.

La detección de pulgones se registró en el grupo de tratamiento Stock PV 1 a los 18 dpi de la tercera réplica, este grupo mostraba tonalidades más claras de verde, acercándose a tonos amarillos, mientras tanto, el color predominante de las plantas del CN a los 18 dpi era de tonalidades verdes oscuras (Figura 41).

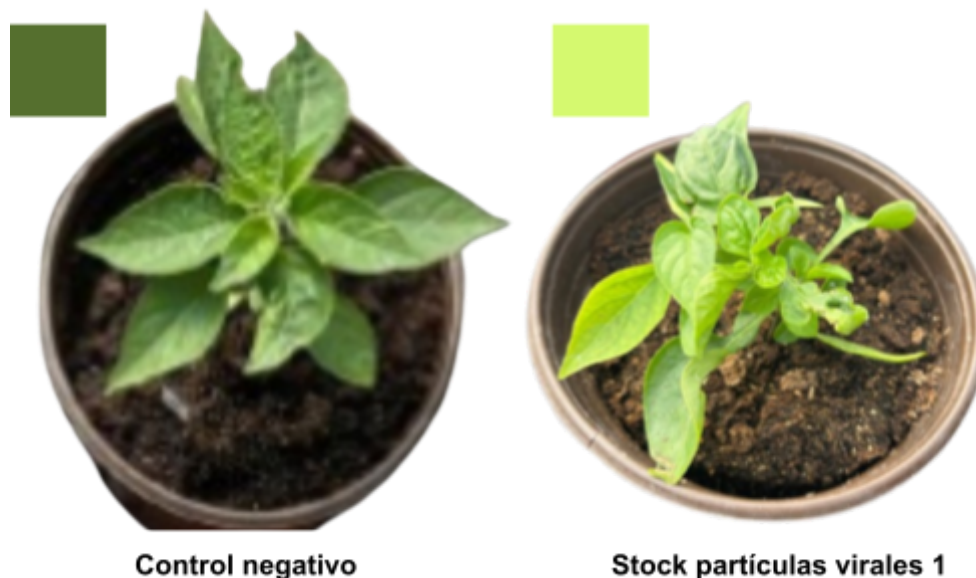


Figura 41. Comparativa de los colores de los grupos de tratamiento CN y Stock PV 1 de la tercera réplica de inoculación mecánica a los 18 dpi.

Mauck, K. et al. (2010) explica que los pulgones al principio prefieren plantas sintomáticas, luego, tras un intervalo de tiempo de alimentación en plantas enfermas, las abandonan y se transfieren a plantas sanas; lo que implica que los virus pueden manipular el comportamiento de su vector facilitando su propagación.

En la Figura 42 A) se muestran los primeros avistamientos de pulgones en el grupo de Stock PV 1 a los 18 dpi, en comparación con la Figura 42 B) donde la presencia de insectos es hasta los 45 dpi, indicando la preferencia inicial de los pulgones por las plantas

sintomáticas y su dispersión a plantas sanas del grupo CN durante el tercer experimento de transmisión mecánica. Sin embargo, se requieren mayores pruebas y experimentos dirigidos para corroborar estas observaciones, así como para determinar con mayor precisión los factores que influyen en el comportamiento de los insectos plaga.

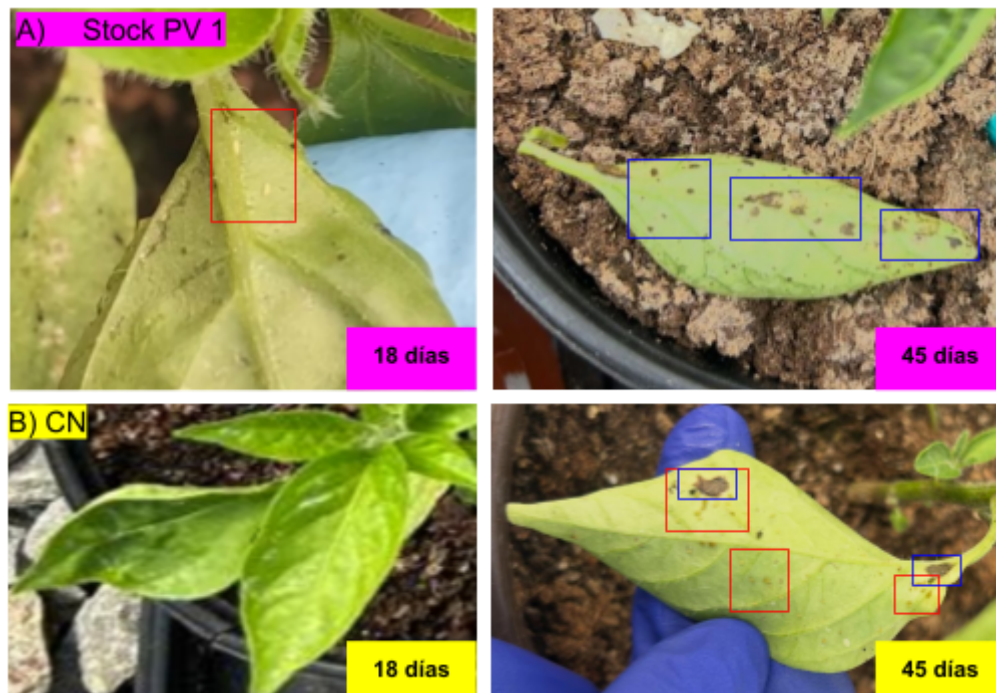


Figura 42. Comparativa de efectos de los pulgones a los 18 y 45 dpi en los grupos Stock PV 1 y CN de la tercera réplica de los experimentos de inoculación mecánica. **Cuadro rojo:** presencia de pulgones (insectos plaga), **cuadro azul:** síntomas identificados.

Conclusiones

Los ensayos realizados permitieron demostrar que la enfermedad que afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas de Chile en el Valle de la Trinidad se atribuye a un agente de naturaleza viral que puede transmitir y reproducir el mismo cuadro sintomático en condiciones de invernadero, satisfaciendo los criterios esenciales de los postulados de Koch y Rivers. Esto se demostró con las réplicas de transmisión mecánica que reflejaron el transcurso de una infección sistémica a través de síntomas progresivos como enrollamiento severo en hojas, amarillamiento, marchitez, necrosis foliar, clorosis, disminución de follaje y deformación en hojas en los grupos de tratamiento que recibieron el inóculo viral hasta su senescencia.

Los resultados estadísticos apoyan la conclusión de que los grupos de tratamiento con extracto de plantas enfermas y partículas virales afectan significativamente el crecimiento y desarrollo foliar de las plantas de Chile, minimizando la altura y longitud de hojas respecto al tiempo. Se establece que tanto en altas como en bajas concentraciones de partículas virales se producen impactos negativos en el desarrollo vegetal. Por tal motivo, una cantidad mínima de partículas virales puede ser suficiente para comenzar una infección viral, explicando que aún ante bajas concentraciones se producen síntomas y alteración en el crecimiento de las plantas.

Mediante los análisis moleculares e inmunológicos no se detectó la presencia de los virus usualmente reportados en plantas solanáceas descritos en la literatura, lo que permite concluir que estos no se encontraban presentes en la muestra de Chile analizada, o se trata de variantes virales no detectables con estos métodos. No obstante, esto no descarta la presencia de otros virus que pudieran estar relacionados con la enfermedad descrita.

El análisis a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM) permitió detectar partículas con morfología icosaédrica con diámetros predominantes entre 25-27 nm, las cuales coinciden con características de virus pertenecientes a los géneros *Tymovirus* (familia *Tymoviridae*), *Bromovirus* y *Cucumovirus* (familia *Bromoviridae*), *Tombusvirus* (familia *Tombusviridae*), *Sobemovirus* (familia *Sobemoviridae*) y *Nepovirus* (familia *Secoviridae*).

Se reafirma que el control de la virosis en cultivos de Chile y en enfermedades virales en general deben fundamentarse en estrategias preventivas constituidas a través del

manejo integrado teniendo en cuenta medidas de restricción primaria, disminución de la propagación secundaria, así como planes de mitigación ante efectos de infección considerando el contexto productivo, económico y social.

Por último, este estudio sienta las bases para la identificación del agente causal viral vinculado a la enfermedad observada en los cultivos de chile de Valle de la Trinidad, facilitando evidencia inicial sobre morfología, tamaño de partículas virales, sintomatología en plantas y posibles patrones de dispersión. Dichos resultados facilitan un primer paso sólido que permitirá guiar futuras investigaciones con enfoques moleculares, biológicos y genéticos con el objetivo de confirmar de forma específica el agente viral responsable de la enfermedad.

Referencias

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology (5th ed.)*. San Diego, California: Elsevier Academic Press.
- AGRO EXCELLENCE. (7 de Diciembre de 2022). *Importancia del cultivo de chile verde en México*. Obtenido de Agroindustria y tecnología: <https://agroexcellence.com.mx/importancia-del-cultivo-de-chile-verde-en-mexico/>
- Avyllón, M. et al. (2018). *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides* (1 ed.). (S. (. Fitopatología), Ed.) Bubok Publishing S.L. Obtenido de <https://libcon.rec.uabc.mx:2321/es/ereader/uabc/51447>
- BAYER. (3 de Enero de 2022). *TSWV / (Virus de la marchitez bronceada del tomate)*. Obtenido de Vegetables Sudamérica: <https://www.vegetables.bayer.com/cl/es-cl/recursos/growing-tips/tswv----virus-de-la-marchitez-bronceada-del-tomate-.html>
- Bos, L. (1981). Hundred years of Koch's Postulates and the history of etiology in plant virus research. *Netherlands Journal Of Plant Pathology*, 20. doi:<https://doi.org/10.1007/bf01976645>
- Cahill, M. et al. (1996). Determinación basal y detección de resistencia al imidacloprid en Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae). *ResearchGate*, 86, 343-349. doi:10.1017/S000748530003491X
- Cisneros, M. A. (2025). Analysis and characterization of the diversity of viral particles of the vine mealybug (*Planococcus ficus* Signoret 1875) in the vineyards of Baja California. Ensenada, Baja California, México: CICESE.
- Cohen, S. et al. (1988). Estudios epidemiológicos del virus del rizado amarillo de la hoja del tomate (TYLCV) en el valle del Jordán, Israel. *Springer Nature*, 16, 259-270. doi:16:259-270
- Cohen, J. (2017). 1 - La evolución de los postulados de Koch. *ELSEVIER*, 1, 1-3. doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-6285-8.00001-0>
- Delgado Ortíz, M. I. y Hernández Mujica, J. L. (2015). Los virus, ¿son organismos vivos? Discusión en la formación de profesores de Biología. *redalyc*(61), 8. doi:ISSN: 0864-196X
- DGSIAP. (2025). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. *Gobierno de México*, https://hube.agricultura.gob.mx/cierre_agricola/.
- Dijkstra, J. y De Jager, C. (1998). *Practical Plant Virology*. Springer. doi:10.1007/978-3-642-72030-7

- Duran Vila, N., y Moreno, P. (2000). *Enfermedades de los cítricos*. (S. E. Fitopatología, Ed.) Madrid: Grupo Mundi-Prensa. Obtenido de <https://redivia.gva.es/handle/20.500.11939/7287>
- Feng, Y. et al. (2017). Descubrimiento de genomas virales conocidos y nuevos en el pulgón de la soja mediante secuenciación profunda. *APS Journals*, 1, 36-45. doi:<https://doi.org/10.1094/PBIOMES-11-16-0013-R>
- Folimonova, S. Y. (2013). Desarrollo de una comprensión de la protección cruzada por el virus de la tristeza de los cítricos. *PubMed*, 4, 76. doi:10.3389/fmicb.2013.00076.
- Foster, G. D. y Taylor, S. C. (1998). *Plant virology protocols: from virus isolation to transgenic resistance* (Vol. 81). Totowa, New Jersey: Humana Press.
- French, E. R. y Hebert, T. (1982). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura.
- Funderburk, J. et al. (2009). Managing Thrips and Tospoviruses in Tomato (ENY859). *UNIVERSITY OF FLORIDA*, 12. Obtenido de https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/11884/managing_thrips_tospoviruses_tomato_2011a.pdf?form=MG0AV3
- Gambino, G. et al. (2008). Un método rápido y eficaz para la extracción de ARN de diferentes tejidos de la vid y otras plantas leñosas. *PubMed*, 19(6), 520-525. doi:<https://doi.org/10.1002/pca.1078>
- González Garza, R. (2017). Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 591-610. doi:10.18781/R.MEX.FIT.1706-1
- Hooks, C. y Fereres, A. (2006). Protección de cultivos frente a virus transmitidos por pulgones de forma no persistente: una revisión sobre el uso de plantas barrera como herramienta de gestión. *Science Direct*, 120(1-2), 1-16. doi:350:433-442
- Hull, R. (2014). *Plant Virology* (5 ed.). Norwich, UK: Elsevier. Obtenido de ISBN: 978-0-12-384871-0
- Hulo, C. et al. (1 de Enero de 2011). ViralZone: un recurso de conocimiento para comprender la diversidad de virus. *Nucleic Acids Research*, 39(1), D576–D582. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>
- Ingwell, L. et al. (2012). Los virus de las plantas alteran el comportamiento de los insectos para mejorar su propagación. *National Libraty of Medicine*, 2(578). doi:10.1038/srep00578
- Inoue Nagata, A., et al. (2022 de Mayo de 2022). Perfil de taxonomía de virus ICTV: Potyviridae 2022. *MICROBIOLOGY SOCIETY*, 103(5). doi:<https://doi.org/10.1099/jgv.0.001738>

- Ishibashi, K. et al. (14 de Agosto de 2023). Tobamovirus: antiguas y nuevas amenazas para el cultivo del tomate. *SPRINGER NATURE Link*(89), 305-321. doi:<https://doi.org/10.1007/s10327-023-01141-5>
- Labourdette, V. B. (Enero de 2023). *Universidad Nacional de Rosario*. Obtenido de Ser vivo: <https://rehip.unr.edu.ar/items/5b8a98fa-0fc1-4151-8f40-d85058116d7e>
- Lefkowitz, E. J. et al. (13 de Octubre de 2017). Taxonomía de virus: la base de datos del Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV). *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D708–D717. doi:<https://doi.org/10.1093/nar/gkx932>
- Li, F. (25 de Julio de 2022). Occurrence, distribution, and management of tomato yellow leaf curl virus in China. *Phytopathology Research*(28). doi:<https://doi.org/10.1186/s42483-022-00133-1>
- López Moya, J., y López Abella, D. (1996). *Transmisión de virus de plantas por insectos vectores* (Vol. 1). Patología Vegetal. Obtenido de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6437132>
- Luria, N. et al. (2020). Aislamiento y caracterización de un nuevo cripavirus, el primer miembro de la familia Dicistroviridae que infecta a la cochinilla del algodón *Phenacoccus solenopsis*. *Springer Nature*, 165, 1987-1994. doi:<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04702-7>
- Luria N, et al. (2017). A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-22 Resistance Genes. *PLOS One*, 12(1). doi:[10.1371/journal.pone.0170429](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429)
- Mauck, K. et al. (2010). Las señales químicas engañosas inducidas por un virus vegetal atraen a los insectos vectores a huéspedes inferiores. *National Library of Medicine*, 107(8). doi:[10.1073/pnas.0907191107](https://doi.org/10.1073/pnas.0907191107).
- National Human Genome Research Institute. (17 de Julio de 2025). *Glosario parlante de términos genómicos y genéticos*. Obtenido de National Human Genome Research Institute: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Virus>
- Opal, S. M. (2010). Chapter 64 - The potential role of infectious agents in diseases of unknown etiology. En S. M. Opal, *Enfermedades infecciosas (tercera edición)* (Vol. 1, págs. 696-701). ISBN 9780323045797. doi:<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780323045797000642?via%3Dihub>
- Pérez Moreno, L. et al. (2004). Identificación de Virus Fitopatógenos en Cultivos Hortícolas de Importancia Económica en el Estado de Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(2), 12. doi:<https://www.redalyc.org/pdf/612/61222205.pdf>
- Rabia Ilyas, M. (15 de Agosto de 2022). Ser visto o no ser visto: infección latente por tobamovirus. *MDPI*, 11(16). doi:<https://doi.org/10.3390/plants11162166>

- Rivers, T. M. (1937). Viruses and Koch's postulates. *Journal of Bacteriology*, 33(1). doi:<https://doi.org/10.1128/jb.33.1.1-12.1937>
- Rodríguez Hernández, A. et al. (31 de Julio de 2023). *Virus en plantas: Amenazas emergentes para la seguridad alimentaria y la economía agrícola*. Obtenido de Centro de Investigación en Química Aplicada, Gobierno de México: <https://ciqa.mx/VirusenPlantas.aspx>
- Robles Hernández, L., et al. (2010). Virus fitopatógenos que afectan al cultivo de chile en México y análisis de las técnicas de detección. *TECNOCIENCIA CHIHUAHUA*, 4(2). doi:<https://doi.org/10.54167/tch.v4i2.715>
- Ruiz, Y. (19 de Junio de 2023). *Ocupa BC 3er lugar nacional en producción agrícola*. Obtenido de Consejo de Desarrollo de Tijuana: <https://cdt.org.mx/noticias/ocupa-bc-3er-lugar-nacional-en-produccion-agricola/>
- Salem, N. et al. (2022). Localization and Mechanical Transmission of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Tomato Seeds. *Plant Disease*, 106(1), 275-281. doi:<https://doi.org/10.1094/pdis-11-20-2413-re>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (01 de Agosto de 2017). *Chile (Capsicum spp.)**. Obtenido de Gobierno de México- Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/chile-capsicum-spp>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (06 de Junio de 2022). *Revisaron productores y autoridades siembras del cultivo de chile en la zona costa de BC*. Obtenido de Gobierno de México- Representación AGRICULTURA Baja California: <https://www.gob.mx/agricultura%7Cbajacalifornia/articulos/revisaron-productores-y-autoridades-siembras-del-cultivo-de-chile-en-la-zona-costa-de-bc>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (29 de Abril de 2023). *Lidera cultivo de chile, las siembras del ciclo Primavera-verano 2023*. Obtenido de Gobierno de México- Representación AGRICULTURA Baja California: <https://www.gob.mx/agricultura%7Cbajacalifornia/articulos/lidera-cultivo-de-chile-las-siembras-del-ciclo-primavera-verano-2023>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (27 de Abril de 2024). *Encabezan cultivo de chile y tomate las siembras del Primavera-Verano 2024 en la Zona Costa de BC*. Obtenido de Gobierno de México- Representación AGRICULTURA Baja California: <https://www.gob.mx/agricultura/bajacalifornia/articulos/encabezan-cultivo-de-chile-y-tomate-las-siembras-del-primavera-verano-2024-en-la-zona-costa-de-bc>
- Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas. (2025). *Gobierno de Argentina - SENASA*. Obtenido de Cucumber Mosaic Virus:

<https://www.sinavimo.gob.ar/plaga/cucumber-mosaic-virus#:~:text=Enanismo%2C%20amarillamiento%2C%20mosaico%2C%20deformaci%C3%B3n,las%20plantas%20se%20recuperan%20parcialmente>

Thompson, J. et al. (2025). ICTV Virus Taxonomy Profile: Bromoviridae 2025. *JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY*, 106(1). Obtenido de <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.002069>

Volcy, C. (2008). Genesis and evolution of Koch postulates and their relationship with phytopathology. A review. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n1/v26n1a13.pdf>

Waterworth, H. y Hadidi, A. (1998). ECONOMIC LOSSES DUE TO PLANT VIRUSES. *Plants Virus Disease Control*. Obtenido de <https://www.ars.usda.gov/research/publications/publication/?seqNo115=80125>

Zamboni, U. et al. (2008). Extracción total de ARN del madroño (*Arbutus unedo*) y otras plantas leñosas. *iForest*, 1(4), 122-125. doi: <https://doi.org/10.3832/ifor0465-0010122>

Zheng, L. et al. (2010). Un nuevo par de cebadores universales para la detección de potyvirus. *BSPP*, 59(2), 211-220. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02201>

Anexo I. Preparación de buffers y soluciones

Tabla 1. Preparación de buffer de extracción CTAB adicionado con β -mercaptoetanol (2%), pH 8.0 (Gambino, G. et al. 2008)

Reactivo	Concentración final
Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato (Tris-HCl) 1M pH 8	100 mM
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M	50 mM
Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB)	2 % (v/v)
Cloruro de sodio (NaCl) 5 M	1.4 M
Agua tratada con dietilpirocarbonato (H ₂ O-DEPC)	Aforar a 250 mL

Tabla 2. Preparación de buffer SSTE, pH 8.0 (Gambino, G. et al. 2008)

Reactivo	Concentración final
Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato(Tris-HCl) 1M pH 8	10 mM
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M	1 mM
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	1 % (p/v)
Cloruro de sodio (NaCl) 5 M	1 M
Agua tratada con dietilpirocarbonato (H ₂ O-DEPC)	Aforar a 100 mL

Tabla 3. Preparación de buffer de extracción general (GEB) (1:10), pH 7.2 (Agdia ®).

Reactivo	Concentración final
Polvo GEB	3.3% (p/v)
Polisorbato 20 (TWEEN 20)	2.0% (p/v)
Agua destilada estéril	Aforar a 50 ml

Tabla 4. Preparación de buffer PBST 1X, pH 7.2 (Agdia ®).

Reactivo	Concentración final
PBST 20X	5% (v/v)
Agua destilada estéril	95%

Tabla 5. Preparación de buffer de extracción de viriones (1% (v-v) 2 mercaptoetanol en buffer fosfato 0.5 M), pH 7.2 (Foster, G. D. y Taylor, S. C. 1998).

Reactivo	Concentración final
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	10 mM
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	10 mM
2-mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)	1% (v/v)
Agua destilada estéril	Aforar a 400 ml

Tabla 6. Preparación de buffer fosfato 10 mM, pH 7.2 (Foster, G. D. y Taylor, S. C. 1998).

Reactivo	Concentración final
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	10 mM
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	10 mM
Agua destilada estéril	Aforar a 400 ml

Tabla 7. Preparación de buffer PBS 1X, pH 7.4 (Feng, Y. et al. 2017).

Reactivo	Concentración final
Cloruro de sodio (NaCl)	0.137 M
Fosfato disódico (Na_2HPO_4)	0.01 M
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	0.0018 M
Agua destilada estéril	Aforar a 400 ml