



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



“Caracterización de virus asociados a la enfermedad emergente en el cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) en el Valle de la Trinidad, Baja California”

TESIS
Para obtener el título de
BIOINGENIERA

Presenta

Vanessa Alejandra Bravo Medina

Directora de tesis CICESE: Dra. Jimena Carrillo Tripp.

Co-directora de tesis UABC: Dra. Dayanira Sheira Paniagua Meza.

Ensenada, Baja California, noviembre de 2025



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



"Caracterización de virus asociados a la enfermedad emergente en el cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) en el Valle de la Trinidad, Baja California"

TESIS

PARA CUBRIR LOS REQUISITOS NECESARIOS PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Bioingeniería

PRESENTA

Vanessa Alejandra Bravo Medina
362381

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


M.C. Idalia Montesinos Solano
SINODAL


M.A. Claudia Macías Rodríguez
SINODAL


Dr. David Cervantes Vásquez
SINODAL

"Por la Realización Plena del Ser"

C.c.p.- Archivo
C.c.p.- Minutario

Resumen

El tomatillo (*Physalis ixocarpa*) es una hortaliza de gran valor económico y cultural en México, cuya producción se ve amenazada por enfermedades emergentes de posible origen viral. En el Valle de la Trinidad, Baja California, se han registrado recientemente síntomas como clorosis, deformaciones en frutos y hojas enrolladas, lo que motivó esta investigación enfocada en la caracterización del agente causal. El estudio se planteó con el objetivo de determinar la posible implicación de virus en esta enfermedad emergente, mediante la aplicación de los postulados de Koch y Rivers, pruebas de transmisión mecánica, técnicas serológicas, moleculares y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Los ensayos de inoculación confirmaron la transmisibilidad del agente patógeno, siendo los síntomas más evidentes los que se manifestaron en plantas inoculadas con extracto crudo del material original. Por otro lado, se descartó la transmisión por semilla al no detectarse síntomas en plantas del grupo control negativo. Si bien las pruebas dirigidas de RT-PCR y ELISA no detectaron los virus conocidos probados de solanáceas, la observación mediante TEM permitió visualizar partículas virales con morfología rígida y filamentosa. La evidencia obtenida resalta la importancia de continuar con estudios de secuenciación de nueva generación para obtener el genoma completo y, por lo tanto, la identificación del virus involucrado. Este trabajo representa un paso clave en la vigilancia fitosanitaria del cultivo de tomatillo, aportando bases científicas para el desarrollo de estrategias de manejo que contribuyan a la sostenibilidad agrícola en la región, pues, independientemente de no tener la identidad genómica, es claro que el virus puede transmitirse de manera mecánica.

Palabras clave: *Physalis ixocarpa*, virus de plantas, enfermedad emergente, transmisión mecánica, microscopía electrónica de transmisión.

Abstract

Tomatillo (*Physalis ixocarpa*) is a vegetable of significant economic and cultural value in Mexico, whose production is increasingly threatened by emerging diseases, potentially of viral origin. In the Valle de la Trinidad, Baja California, symptoms such as chlorosis, fruit deformation, and leaf curling have recently been observed, prompting this investigation focused on characterizing the causal agent. This study aimed to determine the possible involvement of viruses in this emerging disease through the application of Koch's and Rivers' postulates, mechanical transmission assays, serological and molecular techniques, and transmission electron microscopy (TEM). Inoculation trials confirmed the transmissibility of the pathogenic agent, with the most evident symptoms observed in plants inoculated with crude extract from the original material. In contrast, seed transmission was ruled out, as no symptoms were observed in the negative control group. Although targeted RT-PCR and ELISA tests did not detect any of the known tested viruses of solanaceous hosts, TEM analysis revealed viral particles with rigid and filamentous morphology. The evidence highlights the need for further next-generation sequencing (NGS) studies to identify the complete genome of the virus involved. This work represents a key step in the phytosanitary surveillance of tomatillo crops, providing a scientific foundation for the development of management strategies that support agricultural sustainability in the region; as it highlight the fact that the virus could be disseminated by mechanical contact, even though no genomic sequence is available yet.

Keywords: *Physalis ixocarpa*, plant viruses, emerging disease, mechanical transmission, transmission electron microscopy.

Dedicatoria

A mi madre, a quien valoro profundamente por todo lo que hace para que estemos bien, que siempre, a pesar de las dificultades, ha hecho un esfuerzo constante por estar presente, brindarme apoyo incondicional y un amor que me ha guiado. Gracias por enseñarme con su ejemplo la fuerza, paciencia y la entrega que guían cada uno de mis pasos.

A mi padre, que ha sido mi ejemplo y guía a lo largo de mi vida, enseñándome con su trabajo, valores y consejos el camino a seguir. Su fortaleza y sabiduría han sido pilares fundamentales para que pueda enfrentar los retos y creer siempre en mí misma. También le agradezco todas esas charlas y consejos que siempre tengo presentes.

A mis hermanos, Jorge y Carolina, por su apoyo constante en mis decisiones, por estar ahí en cada momento de duda o celebración, y por ser compañeros de camino en la vida. A Jorge, en especial, por ser el brazo fuerte en casa y por su constante respaldo. Todo lo que hacen por mí para que pueda lograr mis metas lo valoro con el corazón, y deseo poder estar ahí para ustedes como ustedes lo han estado para mí. Su apoyo y presencia me dan el valor para esforzarme más y poder acompañarlos también en su camino.

Gracias a todos por su apoyo incondicional en cada etapa de este camino, por acompañarme siempre, por darme fuerza en mis decisiones y por motivarme a seguir adelante cuando más lo necesitaba.

De todo corazón, este logro no es solo mío, también les pertenece a ustedes, y es solo el inicio de un camino que aún queda por recorrer; nos queda seguir recorriéndolo juntos y celebrando cada avance.

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), en atención a la solicitud del gremio de productores de tomatillo y chile del Valle de la Trinidad. Agradezco la confianza depositada en este proyecto por parte de los productores y de las instituciones involucradas.

A la Dra. Jimena Carrillo-Tripp, gracias por brindarme la oportunidad de integrarme a su laboratorio y confiar en mí desde el inicio. Le agradezco profundamente su acompañamiento durante este proceso, así como su compromiso, paciencia y apoyo en cada etapa del proyecto. Destaco especialmente las oportunidades que me brindó al permitirme trabajar con independencia, así como su forma de guiarme, que fue clave para desarrollarme con mayor seguridad tanto en lo académico como en lo personal. Su ejemplo y dedicación han dejado una huella muy valiosa en mi formación.

A la M.C. Idalia Montesinos Solano, gracias por su apoyo técnico, sus enseñanzas, orientación, tiempo y gran disposición a lo largo de todo el proceso.

A todos los integrantes del Laboratorio de Virología Agrícola, gracias por su apoyo, compañerismo y por hacer de esta experiencia algo significativo y enriquecedor. Durante este tiempo, me hicieron sentir como en casa; son otra familia para mí. Trabajar con ustedes ha sido fundamental para mi crecimiento en esta etapa.

A CICESE, por brindarme la oportunidad de formar parte de esta institución y por el apoyo invaluable de cada equipo, laboratorio, doctores, doctoras, técnicos y técnicas con quienes tuve la oportunidad de colaborar durante este proyecto.

A la Universidad Autónoma de Baja California, por todas las enseñanzas recibidas, y a todos los docentes que, con su dedicación y compromiso, fueron un granito de arena fundamental en mi formación académica y profesional.

A la Co-directora, Dra. Dayanira Paniagua, por su guía y valiosos aportes durante todo el desarrollo de la carrera y por acompañarme en este trabajo.

Finalmente, a todas las personas que, de alguna manera, contribuyeron a este trabajo, les expreso mi más sincero agradecimiento.

Índice de contenidos

Resumen	3
Abstract	4
Dedicatoria	5
Agradecimientos	6
Índice de contenidos	7
Índice de figuras	9
Índice de tablas	12
Introducción	13
Antecedentes	20
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos	23
Objetivo general	23
Objetivos específicos	23
Metodología	24
Área de estudio y recolección de muestras	24
Diagnóstico dirigido para detectar virus de solanáceas	24
Pruebas de transmisibilidad del agente etiológico	26
Enriquecimiento y observación de partículas virales	29
Resultados	31
Descripción de las muestras de campo	31

Transmisibilidad del agente etiológico, postulados de Koch y Rivers	33
Diagnóstico de virus mediante técnicas moleculares y serológicas	47
Detección de partículas virales y su asociación con la enfermedad emergente	52
Discusión	59
Síntomas en campo	59
Ensayos de transmisión mecánica	59
Análisis estadístico del crecimiento	60
Pruebas moleculares y serológicas	60
Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	60
Conclusiones	62
Relevancia y proyecciones	63
Referencias	64

Índice de figuras

Figura 1. Entidades federativas productoras de tomatillo.	13
Figura 2. Consulta de avances de siembra y cosecha de tomatillo en Baja California en 2023, 2024 y mediados de 2025.	14
Figura 3. Diseño de placas para la detección de virus. (A) Virus del mosaico del tabaco. (B) Virus del fruto rugoso marrón del tomate.	26
Figura 4. Metodología utilizada para preparación del macerado.	27
Figura 5. Ejemplo de medición de plantas.	28
Figura 6. Procedimiento experimental para probar los postulados de Koch y Rivers.	29
Figura 7. Vista general de planta M1 (A), y síntomas detectados en los frutos, incluyendo circunferencias amarillas (B) y necrosis (C).	31
Figura 8. Fotografías de la planta M3 (A), frutos con lesiones circulares y decoloración (B), frutos afectados (C), hojas con tonalidades amarillentas (D) y fruto con síntomas severos (E).	32
Figura 9. Vista general de planta M4 (A), síntomas detectados en hoja (B) y fruto (C).	33
Figura 10. Escala visual utilizada para clasificar la severidad de los síntomas observados en plantas de tomatillo después de la inoculación mecánica.	34
Figura 11. Altura promedio de plantas de tomatillo en la primera réplica de transmisión mecánica a lo largo de 25 días después de la inoculación (dpi). Se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey correspondientes al día 25 dpi. Las barras de error denotan la desviación estándar.	35
Figura 12. Síntomas en plantas de tomatillo a 25 días post-inoculación (dpi) durante la primera réplica de transmisión mecánica. Los números indican la proporción de plantas sintomáticas respecto al total evaluado, y el color del recuadro que los contiene representa el nivel de severidad de los síntomas según la escala empleada: verde = sano, amarillo = leve, naranja = moderado, rojo = severo y negro = muerte.	36
Figura 13. Altura promedio de plantas de tomatillo hasta 53 dpi en la segunda réplica de transmisión mecánica. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey después del	

- análisis de ANOVA correspondiente al día 53 dpi. Las barras de error denotan la desviación estándar. 37
- Figura 14. Plantas de tomatillo en cada grupo a los 53 días post-inoculación (dpi) durante la segunda réplica de transmisión mecánica. Los números indican la proporción de plantas sintomáticas respecto al total evaluado. Escala de severidad: verde = sano, amarillo = leve, naranja = moderado, rojo = severo y negro = muerte. 38
- Figura 15. Ejemplos representativos de plantas de tomatillo a los 53 días post-inoculación (dpi) durante la segunda réplica de transmisión mecánica. 39
- Figura 16. Longitud promedio de hojas inoculadas de plantas de tomatillo a lo largo de 29 dpi en la segunda réplica del experimento de transmisión mecánica. Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas con base a la prueba de Tukey después de ANOVA a los 29 dpi. Las barras de error denotan la desviación estándar. 40
- Figura 17. Comparación de hojas de tomatillo a los 53 dpi en la segunda réplica de transmisión mecánica. Todas las imágenes se presentan a la misma escala. 41
- Figura 18. Altura promedio de plantas de tomatillo hasta los 27 dpi en la tercera réplica del experimento de transmisión mecánica. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey después de ANOVA realizada en datos de 27 dpi. Las barras de error denotan la desviación estándar. 42
- Figura 19. Plantas de tomatillo a los 27 días post-inoculación (dpi) durante la tercera réplica del ensayo de transmisión mecánica. Los números indican la proporción de plantas sintomáticas respecto al total evaluado. Escala de severidad: verde = sano, amarillo = leve, naranja = moderado, rojo = severo y negro = muerte. 43
- Figura 20. Ejemplares representativos de cada grupo a los 27 dpi en la tercera réplica de transmisión mecánica. 44
- Figura 21. Longitud promedio de hojas inoculadas en plantas de tomatillo hasta los 27 dpi (tercera réplica de experimentos de transmisión mecánica). Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey. Las barras de error denotan la desviación estándar. 45
- Figura 22. Diagnóstico de ToBRFV y TSWV por RT-PCR en muestras sintomáticas y controles. 48
- Figura 23. Diagnóstico de tobamovirus, potexvirus y potyvirus en muestras sintomáticas y controles mediante RT-PCR. 49

Figura 24. Prueba ELISA para TMV. (A) Resultados visuales. (B) Lectura de absorbancia a 405 nm con el equipo Multiskan SkyHigh. 50

Figura 25. Prueba ELISA para ToBRFV. (A) Resultados visuales. (B) Lectura de absorbancia a 405 nm con equipo Multiskan SkyHigh. 51

Figura 26. Imágenes TEM de partículas extraídas de plantas de campo M1, M3 y M4 (tejido foliar y de fruto sintomático). (A) Se observan partículas de morfología alargada y rígida, dispersas de manera uniforme sobre la superficie de la rejilla, con longitudes variables compatibles con partículas virales de tipo filamentoso. (B) En otro campo de la misma rejilla se aprecia una mayor concentración de partículas con características morfológicas similares, algunas de ellas agrupadas o superpuestas, lo que confirma la abundancia del agente viral en la muestra analizada. 53

Figura 27. Imágenes TEM de partículas extraídas de tejido foliar proveniente de plantas inoculadas durante la segunda réplica de transmisión mecánica bajo condiciones controladas en invernadero. (A) Se observan partículas alargadas, flexuosas y dispersas de manera uniforme sobre el campo, con una orientación aleatoria y distribución homogénea, características compatibles con viriones filamentosos. (B) En otro campo de la misma rejilla se aprecia una concentración ligeramente mayor de partículas, manteniendo la misma morfología y patrón de distribución, lo que confirma la presencia consistente del agente viral en la muestra analizada. 54

Figura 28. Histograma de longitudes de partículas detectadas en la muestra de tejido compuesto (hoja y fruto) de planta de campo. 56

Figura 29. Histograma de longitudes de partículas en muestra de hoja de planta infectada en invernadero. 56

Figura 30. Resultados de RT-PCR para detección de 18S ribosomal y tobamovirus. Las muestras se analizaron en el mismo orden en ambas secciones del gel: tomate sano germinado de semilla libre de virus (T2 y T3; carriles 1-2 y 11-12), tomatillo con síntomas del Valle de la Trinidad (M1 y M4; carriles 3-4 y 13-14), controles positivos de tomate infectado con tobamovirus (+1, +2 y + RNA; carriles 5-7 y 15-17), fracciones de partículas virales de tomatillo y tomatillo infectado en invernadero (Part. tom y Part. inver.; carriles 8-9 y 18-19), seguidos del marcador molecular de 1 kb (Ladder 1kb; carril 10) y el control negativo sin plantilla (NTC; carril 21). Los carriles 1-9 corresponden a la amplificación del gen ribosomal 18S (~844 pb), mientras que los carriles 11-21 muestran la detección con cebadores para tobamovirus (~1 kb). 57

Índice de tablas

Tabla 1. Modos de transmisión de virus fitopatógenos.	16
Tabla 2. Resumen de réplicas, tratamientos, número de plantas y condiciones experimentales.	28
Tabla 3. Características de las muestras de campo de tomatillo.	31
Tabla 4. Temperaturas promedio registradas durante el periodo experimental en las tres réplicas biológicas de los experimentos de transmisión mecánica.	46
Tabla 5. ARN total obtenido de muestras sintomáticas y controles negativos.	47
Tabla 6. Posibles géneros virales de las partículas observadas en tomatillo mediante TEM.	58

Introducción

El cultivo de tomatillo

El tomatillo (*Physalis ixocarpa*), también conocido como tomate de cáscara o tomate verde, es una especie nativa de México y un cultivo emblemático con profundo arraigo en la gastronomía nacional. Su fruto, recubierto por una cáscara semejante al papel y con una pulpa de sabor ácido y refrescante, es ampliamente utilizado en la preparación de salsas, guisos y otros platillos tradicionales, lo que lo convierte en un componente esencial de la cocina mexicana. Además de su relevancia cultural, el tomatillo representa una fuente de ingresos vital para pequeños y medianos productores, aportando de manera significativa a la economía agrícola del país. Su producción se concentra en estados como Sinaloa, Durango, Chiapas, Coahuila, Yucatán, Oaxaca y Baja California, destinados principalmente al consumo fresco y a la elaboración de salsas (SIAP-SAGARPA, 2015). A nivel nacional, la producción aumenta ligeramente en el ciclo primaveral con 52% del total, mientras que el 48% restante corresponde al periodo otoño-invierno.

En 2017, México destinó más de 43,000 hectáreas para la producción de tomatillo, alcanzando rendimientos de hasta 14 toneladas por hectárea, y en condiciones óptimas, se lograron cifras superiores a las 40 toneladas por hectárea; en cambio, durante 2022 se sembraron 40,650 ha con una producción total de 756,130 toneladas (SIAP, 2017-2022). Sin embargo, la sostenibilidad del cultivo enfrenta desafíos fitosanitarios, principalmente por enfermedades virales emergentes. La distribución de las principales entidades productoras se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Entidades federativas productoras de tomatillo.

Recuperado y modificado de:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/71249/MargenesComer_TomateVerde_Marzo2015.pdf

En Baja California en el año 2023 se registró una superficie de siembra de 576 hectáreas, de las cuales solo 570 fueron cosechadas mientras que las 6 hectáreas restantes fueron siniestradas, obteniendo una producción total de 16,112.09 toneladas, alcanzando un rendimiento promedio de 28.27 toneladas por ha. Por otro lado, en 2024 se sembraron 383 ha, las cuales se cosecharon completamente obteniendo una producción de 11,186.20. Hasta octubre del año 2025 se han sembrado 667 ha de las cuales se han cosechado 244 teniendo una producción 5,972 toneladas (Figura 2).

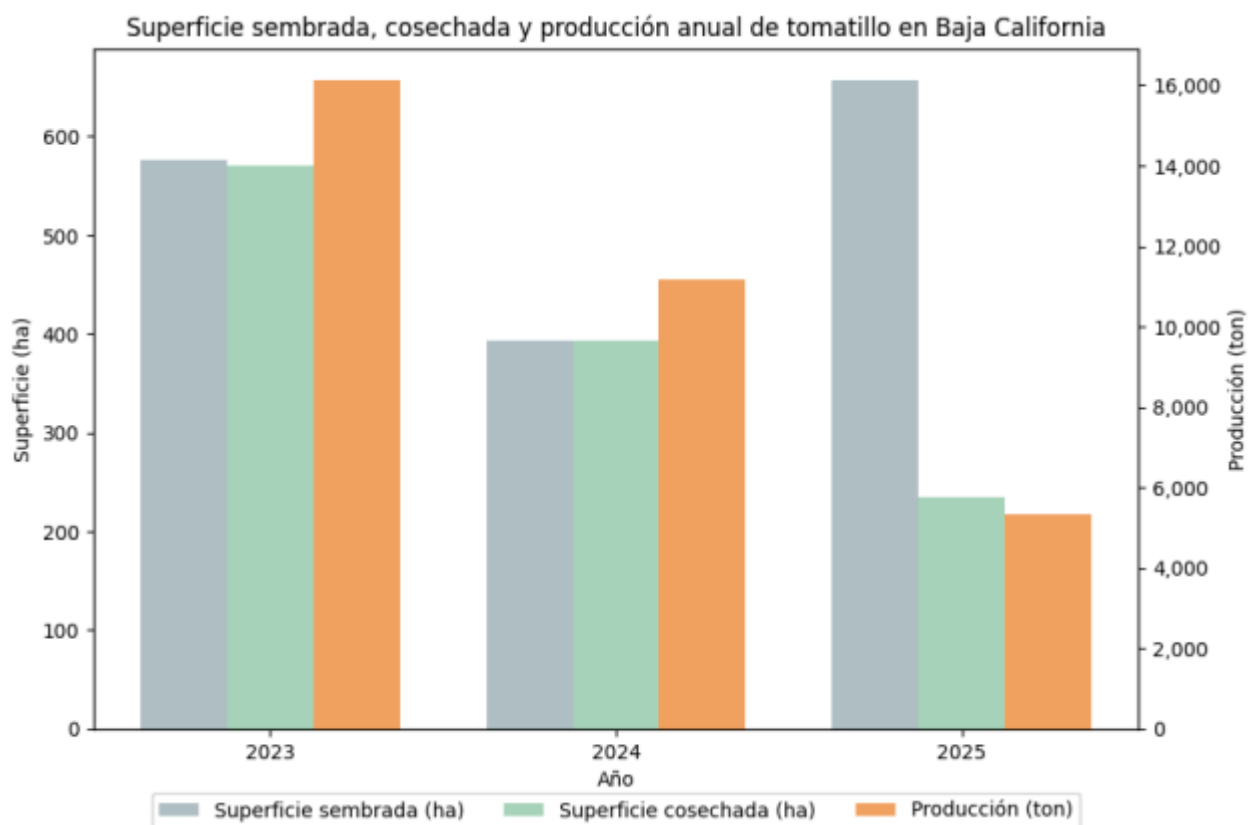


Figura 2. Consulta de avances de siembra y cosecha de tomatillo en Baja California en 2023, 2024 y mediados de 2025.

Recuperado y modificado de: https://nube.agricultura.gob.mx/avance_agricola/

A pesar del crecimiento sostenido en la superficie cultivada y en la producción en diversas regiones del país, el tomatillo enfrenta un riesgo creciente por la aparición de enfermedades virales emergentes, las cuales comprometen su productividad y calidad. Estas virosis representan un obstáculo importante para la sostenibilidad del cultivo, especialmente en zonas productoras del norte como Baja California, donde los reportes y estudios científicos aún son escasos.

Virosis en tomatillo

En México, el monitoreo y control de virus en cultivos hortícolas es aún limitado, lo que dificulta la identificación de brotes y la implementación de estrategias de manejo efectivas. La presencia de virus en tomatillo se ha reportado en diversas regiones del país, pero los estudios detallados sobre la prevalencia y caracterización de estos patógenos siguen siendo escasos, o nulos en zonas específicas como el Valle de la Trinidad.

Las enfermedades virales constituyen uno de los principales desafíos en la agricultura moderna, especialmente en cultivos hortícolas de alto valor como el tomatillo. La diversidad de virus que atacan a las solanáceas es amplia, y estos se agrupan en géneros y familias con base en características biológicas clave. Entre los más importantes que afectan a cultivos de solanáceas se encuentran:

- Género *Begomovirus* (familia *Geminiviridae*): Virus de ADN monocatenario transmitido por mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Provocan enrollamiento de hojas, mosaico amarillo y reducción drástica del tamaño del fruto, como se observa en el virus del rizado amarillo del tomate (TYLCV) o el virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV) (Díaz-Pendon, J. A., et al., 2010).
- Género *Orthospovirus* (familia *Tospoviridae*): Virus de ARN segmentado transmitido por trips (*Frankliniella occidentalis*). Se asocian con necrosis en hojas y tallos, así como manchas anulares cloróticas o bronceado del follaje, característicos del virus del bronceado del tomate (TSWV) (Tsompana y Moyer, 2008).
- Género *Potyvirus* (familia *Potyviridae*): Virus de ARN positivos transmitidos principalmente por pulgones (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii*), en forma no persistente. Causan mosaico, necrosis, deformaciones y afectan diversos cultivos, como el PVY en papa o el PRSV en papaya (Díaz, Quiñones et al., 2010).
- Género *Cucumovirus* (familia *Bromoviridae*): Virus de ARN monocatenario con genoma tripartito, transmitido por pulgones. Un ejemplo es el virus del mosaico del pepino (CMV), el cual tiene un rango de hospedero amplio e induce síntomas como mosaicos severos, distorsión foliar y enanismo, afectando a diversas solanáceas, incluida el tomatillo (Sánchez et al., 2021).

Estos virus no solo difieren en su biología, sino también en su modo de transmisión y la severidad de los síntomas, lo cual tiene implicaciones claves para su diagnóstico y manejo (Tabla 1).

Tabla 1. Modos de transmisión de virus fitopatógenos.

Modo de transmisión	Ejemplos de virus	Mecanismos o características clave	Vector
Mecánica (directa o indirecta)	Tobamovirus, potexvirus (Hull, 2002).	Ocurre por contacto físico entre plantas, herramientas contaminadas, manipulación humana o roce entre hojas. Virus con partículas muy estables.	No
Por semilla	Potyvirus, nepovirus, ilarvirus, comovirus (Mink, 1993); PSbMV (Wang y Maule, 1992).	El virus debe estar presente en los tejidos embrionarios del embrión; algunos de los virus también pueden infectar las cubiertas o tejidos accesorios de la semilla.	No
Vector insecto	Begomovirus, potyvirus, tospovirus	Transmisión mediante insectos como mosca blanca, pulgones o trips. Puede ser persistente o no persistente, dependiendo del virus-vector.	Sí
Por polen (polinización)	Tobamovirus	Algunos virus pueden adherirse al polen y transmitirse a través de la fecundación o por polinizadores como las abejas.	A veces (abejas)
Injertos / propagación vegetativa	Diversos grupos virales	Transmitido mediante esquejes, estacas, injertos, acodos o cualquier método de propagación clonal. Alta eficiencia si la planta madre está infectada.	No

Fuente: Adaptado de Llave, Ayllón y Cambra (2018), Hull (2002), Mink (1993), Wang y Maule (1992).

Los vectores juegan un papel clave en la diseminación de virus. Los principales son:

- Pulgones (Aphididae): Son vectores de transmisión no persistente o semipersistente. Adquieren el virus en segundos y lo transmiten rápidamente, lo que dificulta el control incluso con insecticidas.
- Mosca blanca (*Bemisia tabaci*): Vector persistente de begomovirus, requiere mayor tiempo de alimentación, pero permanece infectiva por días o incluso toda su vida.
- Trips (*Frankliniella* spp.): Adquieren tospovirus en fases larvarias y lo transmiten como adultos. Dificulta el control por su hábito oculto y comportamiento errático.
- Chinchas, saltahojas (chicharritas) y escarabajos: En menor medida, también pueden ser vectores de virus específicos (por ejemplo, BCTV es transmitido por la chicharrita del betabel, *Circulifer tenellus*).

- Nematodos u hongos: Algunos virus del suelo, como los nepovirus o tobnavirus, son transmitidos por nematodos (géneros *Xiphinema*, *Longidorus*) o incluso por hongos del suelo.

El conocimiento profundo de estos mecanismos es indispensable para diseñar estrategias integradas de manejo viral, que incluyan la eliminación de fuentes de inóculo, el monitoreo de vectores, la protección del cultivo en etapas vulnerables y el uso de variedades resistentes si están disponibles.

Diagnóstico de virus

Uno de los principales desafíos en el manejo de la virosis es la dificultad para su detección temprana. A diferencia de patógenos fúngicos o bacterianos, los virus no pueden ser cultivados en medios sintéticos, lo que hace necesario el uso de herramientas moleculares avanzadas para su identificación y caracterización. En este enfoque, el empleo de técnicas moleculares y serológicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), RT-PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real), y el ensayo de Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) se han convertido en estrategias cruciales para detectar la presencia de virus en plantas. La RT-PCR (retrotranscripción seguida de PCR), por ejemplo, es eficaz para identificar virus de ARN incluso antes de que los síntomas sean visibles; mientras que la prueba ELISA se destaca por su capacidad de detectar antígenos virales de manera rápida y precisa. Finalmente, la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) ha abierto nuevas oportunidades para obtener información genética detallada de los virus, permitiendo no solo su identificación, sino también su caracterización molecular, lo que resulta esencial para entender su evolución y planificar estrategias de control más efectivas, además de ser una técnica no dirigida que evita sesgos en la detección y permite la identificación precisa del virus.

Postulados de Koch/Rivers

La identificación precisa del agente causal de una enfermedad viral en cultivos es un desafío significativo en fitopatología. Para abordar este desafío, se utilizan los postulados de Koch, adaptados por Rivers (1937) para los agentes virales, como marco de referencia para demostrar la causalidad. En el caso de los virus, dada su naturaleza intracelular obligada, se requieren herramientas complementarias como plantas indicadoras, microscopía electrónica y técnicas moleculares avanzadas para confirmar su implicación en la enfermedad.

Los postulados de Koch son un compendio de cuatro principios establecidos, para producir una relación causal entre un microorganismo y una enfermedad, dichos principios fueron planteados por Robert Koch y Friedrich Loeffler en 1884, y publicados en 1890. En un inicio los principios se

establecieron para ser directamente aplicados para demostrar las causas del ántrax y la tuberculosis, sin embargo, tuvieron una gran impacto hacia otras enfermedades. Los postulados complementaron estrategias enfocadas a la identificación de patógenos, junto a las técnicas que se tenían al alcance en ese momento. Cabe destacar que se reconoció que no todos los patógenos cumplían todos los postulados, y esto se vio ampliamente reflejado en las enfermedades virales, específicamente a finales del siglo XIX, pues durante esta época los virus no se podían observar ni cultivar en un laboratorio, deteniendo el avance en el área de la virología. Actualmente, una gran cantidad de patógenos se consideran como causantes de enfermedades sin cumplir puntualmente todos los postulados de Koch, aunque éstos son muy útiles y continúan teniendo una gran influencia en el área de microbiología, no se necesita que se cumplan los cuatro principios para generar una relación causal (Tortora et al., 2007).

Postulados de Koch

1. El microorganismo debe estar presente en todos los casos de enfermedad y debe de encontrarse ausente en organismos sanos.
2. El microorganismo debe aislarse del organismo enfermo y cultivarse en un medio puro.
3. El microorganismo cultivado debe ocasionar la misma enfermedad cuando se inocular en un organismo sano y susceptible.
4. El microorganismo debe ser aislado del organismo experimentalmente infectado y justificar que es análogo al original.

De igual forma, los postulados de Rivers se establecieron como principios para la identificación de virus como causantes de una enfermedad. Dichos postulados fueron establecidos por Thomas M. Rivers en el año 1937 con el objetivo de adaptarse a virus, debido a que los postulados originales de Koch no se aplicaban en virus dada su naturaleza de parásitos celulares (Rivers, T.M, 1937).

Los postulados de Rivers representaron un avance fundamental en la virología, ya que permitieron establecer criterios más precisos para demostrar la relación causal entre un virus y una enfermedad. A diferencia de los postulados de Koch, que se basaban en el aislamiento y cultivo de bacterias en medios artificiales, Rivers reconoció la necesidad de métodos alternativos para el estudio de los virus, los cuales dependen de células vivas para su replicación. Gracias a estos principios, fue posible identificar agentes virales responsables de diversas enfermedades en humanos, animales y plantas, sentando las bases para el desarrollo de estrategias de diagnóstico, prevención y control de infecciones virales (Rivers, T.M, 1937).

Postulados de Rivers

1. El virus debe estar presente en cada caso de la enfermedad específica, mas no en individuos sanos.

Dicho principio explica que, para establecer una relación causal entre un virus y una enfermedad, es necesario demostrar que el virus está presente en todos los individuos enfermos o que muestran los síntomas característicos de la infección. Sin embargo, no debe encontrarse en organismos sanos, lo que permite diferenciarlo de microorganismos comensales o no patogénicos.

2. El virus debe poder aislarse del hospedero enfermo y crecer en un cultivo puro.

Una vez identificado en los individuos enfermos, el virus debe ser aislado y propagado en un cultivo. Y debido a que los virus requieren células vivas para replicarse, su aislamiento se realiza mediante cultivos celulares, huevos embrionados u otros modelos animales, plantas, o el hospedero natural que corresponda al virus en cuestión.

3. El virus aislado debe ocasionar la misma enfermedad cuando se inyecta en un hospedero sano y susceptible.

Si el virus es el causante de la enfermedad, el individuo inoculado debería presentar síntomas similares a los observados en los casos originales.

4. El virus debe poder ser aislado del hospedero infectado, evidenciando ser el mismo patógeno.

Después de la inoculación y el desarrollo de la enfermedad en el hospedero sano, el virus debe ser nuevamente aislado y caracterizado para confirmar que es el mismo patógeno originalmente identificado, asegurando que los síntomas observados no fueron causados por otros factores.

5. La enfermedad debe vincularse a una respuesta inmunológica en específico contra el virus infectado.

Finalmente, debe demostrarse que el organismo infectado genera una respuesta inmune específica contra el virus. Lo cual puede comprobarse mediante la detección de anticuerpos específicos en el hospedero animal, y en el caso de plantas, se puede corroborar por respuestas de defensa específicas a virus como el silenciamiento mediado por RNA.

Antecedentes

En el Valle de la Trinidad, ubicado en el municipio de Ensenada, Baja California, los cultivos de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) han presentado en los últimos años afectaciones cada vez más severas, generando preocupación entre los productores locales. Las plantas muestran síntomas como clorosis foliar, deformaciones en los frutos, enrollamientos de hojas y crecimiento anómalo de los tallos, manifestaciones que sugieren la posible presencia de una infección viral. La observación frecuente de vectores como trips, mosca blanca y pulgones, ha reforzado la hipótesis de que estos insectos podrían estar involucrados en la diseminación del agente causal, aunque su identidad aún no se ha confirmado.

El cultivo del tomatillo en esta región se establece a lo largo de tres etapas de siembra a lo largo del año, con cosechas escalonadas:

- Etapas tempranas: Siembras a finales de marzo a mayo, con cosecha en julio-agosto y temperaturas promedio 20-32°C.
- Etapas intermedias: Siembras de junio a julio, con cosecha en septiembre y temperaturas promedio 33-45°C.
- Etapas tardías: Siembras de agosto a septiembre, con cosecha en octubre y temperaturas promedio 35-44°C.

Durante los ciclos intermedios, los más cálidos del año, los productores reportan pérdidas de hasta un 50% de la producción, lo que representa un impacto económico considerable. Además, se ha registrado una reducción progresiva en el rendimiento y en el número de cortes de fruto, evidenciando la gravedad y persistencia del problema. De acuerdo con los testimonios recabados durante visitas de campo y entrevistas en coordinación con el Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California, los primeros casos se detectaron hace aproximadamente seis años en un predio aislado, y desde entonces la enfermedad se ha extendido gradualmente a otras zonas del valle. Los agricultores coinciden en que los síntomas se intensifican durante los periodos de mayor temperatura (42-45°C), coincidiendo con picos poblacionales de trips (20-30 individuos por planta), lo que sugiere una posible relación entre las condiciones ambientales, la dinámica de vectores y la severidad de síntomas (Ing. López Brizuela, com. personal, 2024).

Tradicionalmente, los esfuerzos de manejo fitosanitario en la región se han enfocado en el control de plagas y enfermedades fúngicas o bacterianas, como el tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y la

marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*). No obstante, en las últimas décadas, las enfermedades virales han emergido como una de las principales amenazas para la producción de solanáceas, incluyendo el tomatillo (Santos-Cervantes et al., 2007). Esta situación no solo se observa en Baja California, sino que forma parte de un panorama global de incremento en las infecciones virales, impulsado por factores como el cambio climático, el intercambio de material vegetal y las prácticas agrícolas intensivas.

A nivel mundial, los virus que afectan a las solanáceas representan un riesgo constante para la seguridad alimentaria, debido a su alta capacidad de transmisión y a la dificultad de erradicación una vez establecidos en campo. Su propagación ocurre a través de distintos mecanismos, como el contacto mecánico, el uso de semillas infectadas o la acción de vectores biológicos, siendo estos últimos los más eficientes en la diseminación de patógenos. Ejemplos de ello incluyen el virus del bronceado del tomate (TSWV), transmitido por trips, capaz de causar pérdidas de hasta 80% en cultivos de tomate; el virus del mosaico del pepino (CMV) transmitido por pulgones, que afecta el rendimiento y la calidad del fruto; y geminivirus como el virus de la parte superior rizada de la remolacha (BCTV), transmitido por saltahojas, que ocasiona daños severos en regiones semiáridas (Zhang et al., 2022; Santos-Cervantes et al., 2007). Estos ejemplos reflejan cómo los virus pueden adaptarse a distintas condiciones ambientales y hospederos, incrementando su persistencia y distribución.

En este contexto, el caso del tomatillo en el Valle de la Trinidad puede entenderse como parte de una interacción compleja entre plantas, virus, vector y ambiente, donde el aumento de las temperaturas, las prácticas de cultivo continuas y la presencia de insectos vectores podrían estar favoreciendo la aparición de una enfermedad viral emergente. A pesar de los avances científicos, el acceso a técnicas de diagnóstico molecular en regiones agrícolas continúa siendo limitado, lo que retrasa la detección oportuna y dificulta la implementación de estrategias de manejo específicas.

Por ello, la presente investigación tiene como propósito documentar y analizar la problemática emergente en el cultivo de tomatillo en el Valle de la Trinidad. Se busca caracterizar los síntomas observados en campo, identificar los posibles agentes virales involucrados y evaluar experimentalmente su transmisibilidad, siguiendo los postulados de Koch y Rivers. Con este enfoque, se pretende no solo determinar el agente causal, sino también generar información útil para el desarrollo de estrategias fitosanitarias más efectivas, enfocadas en el manejo de vectores y en la reducción del impacto económico y agronómico de las enfermedades virales en la región.

Justificación

El cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) es de gran importancia económica y cultural en México, con una producción significativa en estados como Sinaloa, Jalisco, Zacatecas y Baja California. Sin embargo, su productividad se ve amenazada por diversas enfermedades, entre las cuales las de origen viral han cobrado una relevancia creciente en los últimos años. En particular, en el Valle de la Trinidad, Baja California, se han observado síntomas como clorosis, deformaciones en frutos y hojas enrolladas, lo que sugiere la posible presencia de un patógeno viral que afecta el rendimiento y la calidad del cultivo.

A pesar de la importancia del tomatillo en la agricultura nacional, el monitoreo y la identificación de enfermedades virales en este cultivo han sido limitadas en México. Por ello, este trabajo busca caracterizar el agente causal de una enfermedad emergente observada recientemente en el cultivo de tomatillo mediante la aplicación de los postulados de Koch y Rivers, pruebas de inoculación, extracción de partículas virales y técnicas moleculares como RT-PCR, lo que permitirá confirmar o descartar la presencia e implicación de virus en dicha patología.

El desarrollo de este estudio es clave para la implementación de estrategias de manejo integrado que contribuyan a la sostenibilidad del cultivo y la reducción de pérdidas económicas en la región, beneficiando a los productores locales y generando conocimiento sobre la diversidad viral presente en el tomatillo para la formulación de medidas fitosanitarias más efectivas.

Hipótesis

Los síntomas de clorosis, deformaciones en frutos y hojas enrolladas observados en el cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) en el Valle de la Trinidad, Baja California, son causados por un patógeno emergente de identidad viral.

Objetivos

Objetivo general

Determinar la presencia de virus como posible causa de la enfermedad emergente que afecta al cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) en el Valle de la Trinidad, Baja California.

Objetivos específicos

- 1.- Establecer la transmisibilidad del agente etiológico mediante inoculación mecánica siguiendo los postulados de Koch y Rivers.
- 2.- Diagnosticar la presencia de virus de solanáceas, pertenecientes a diferentes grupos taxonómicos mediante RT-PCR y ELISA.
- 3.- Determinar la asociación de partículas virales con la enfermedad emergente en plantas de tomatillo sintomáticas.

Metodología

Área de estudio y recolección de muestras

El estudio se llevó a cabo en el Valle de la Trinidad, Baja California, una región agrícola donde el cultivo de tomatillo es extensivo. Se utilizó un muestreo dirigido por parte del personal del Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Baja California (CESVBC) para recolectar plantas sospechosas de infección viral, considerando variables como la etapa de crecimiento y la sintomatología observable. Además, se realizó una reunión con productores locales y representantes del CESVBC, donde se compartió información sobre condiciones de cultivo, incidencia de síntomas, prácticas de manejo y afectaciones económicas.

Las muestras fueron entregadas por el Ing. Pedro López del CESVBC, al Laboratorio de Virología Agrícola del CICESE, donde se registraron, clasificaron, identificaron (M1, M3 y M4) y se almacenaron para su conservación a -20°C hasta su procesamiento. La descripción detallada de las muestras de campo, incluyendo los síntomas observados y los posibles vectores presentes, se presenta en la sección de Resultados en descripción de las muestras de campo (Tabla 4).

Diagnóstico dirigido para detectar virus de solanáceas

Se seleccionaron tres muestras compuestas, derivadas de combinaciones de tejido foliar y de fruto de plantas sintomáticas recolectadas en distintos predios del Valle de la Trinidad. Cada muestra se dividió en dos submuestras: hoja (H) y fruto (F), obteniéndose un total de seis extractos: M1H, M1F, M3H, M3F, M4H y M4F. Como controles negativos se incluyeron dos muestras foliares (M5A y M5B) provenientes de plantas sanas del mismo lote de semilla comercial (Harris Moran Siqueiros, proporcionadas por el Ing. López Brizuela).

- Extracción de ARN

El ARN total fue extraído a partir del tejido vegetal utilizando el protocolo reportado por Gambino, G., et al. (2008) con modificaciones. El procedimiento incluyó la maceración del tejido con pistilo de pellet de polipropileno, incubación con buffer CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) al 2% de β -mercaptoetanol, homogeneización con el equipo PowerLyzer® (Qiagen®), y extracción orgánica con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El sobrenadante fue recuperado y el ARN precipitado con LiCl al 12 M e isopropanol a -20°C . Posteriormente, los precipitados fueron lavados con etanol al 70%, secados y resuspendidos en agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato). Se aplicó una segunda purificación para mejorar la calidad del ARN. La concentración y pureza fueron evaluadas mediante espectrofotometría UV (NanoDrop®), considerando aceptables las muestras con una relación A 260/280 entre 1.9 y 2.2.

- Ensayos de RT-PCR

La transcripción reversa se realizó con la enzima RevertAid® (Thermo Scientific®), usando hexámeros aleatorios, dNTPs, buffer 5X, inhibidor de RNAsas (RiboLock®) y ARN total (100 ng aprox.), en un volumen final de 4 µL. La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante incubación a 25 °C (10 min), 42 °C (30 min) y 70 °C (10 min). Posteriormente, se realizaron PCRs uniplex con DreamTaq® DNA Polymerase (Thermo Scientific®) en reacciones de 10 µL, con 1 µL de cDNA, buffer 10X, dNTPs y mezclas de cebadores específicos (5 µM cada uno). Los ciclos térmicos incluyeron desnaturalización inicial, 40 ciclos de amplificación (desnaturalización, alineamiento y extensión) y una extensión final. Se emplearon gradientes de temperatura de alineamiento (48–52 °C) para optimizar la especificidad de los cebadores utilizados. Los cebadores empleados correspondieron a secuencias previamente reportadas en la literatura para la detección dirigida de los siguientes virus o grupos virales de solanáceas:

- Virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV) (Zamboni et al., 2008, p. 122).
- Virus del bronceado del tomate (TSWV) (Luria et al., 2017).
- Tobamovirus (Luria et al., 2017).
- Potexvirus (Van der Vlugt y Berendsen, 2002).
- Potyvirus (Zheng et al., 2010).

Como control interno, se amplificó el gen 18S ribosomal (Gambino et al., 2006) para verificar la integridad del RNA y del cDNA. Los productos amplificados se visualizaron en geles de agarosa al 1–1.5%, teñidos con colorantes fluorescentes (HydraGreen® de ACTGene® o GelRed® de Biotium®), utilizando transiluminadores de luz UV (iBright® 1500, Invitrogen® o Bio-Rad®). Se incluyeron marcadores de tamaño molecular (escalera) de 1 Kb como referencia (GeneRuler® 1 kb DNA Ladder ThermoFisher®).

- Inmunoensayo (ELISA)

Con el fin de detectar la presencia del virus del mosaico del tabaco (TMV) y del virus del fruto rugoso marrón del tomate (ToBRFV), se realizaron pruebas de ELISA indirecto, utilizando los kits comerciales PathoScreen® (AGDIA®). La metodología se basó en los manuales técnicos del fabricante (AGDIA®, 2021) y consistió, de forma general, en el diseño de una placa con controles negativos y positivos junto con las muestras problema a analizar (Figura 3). Posteriormente, se preparó el buffer de extracción GEB (General Extract Buffer) y se maceraron los tejidos vegetales sintomáticos a una proporción 1:10 (tejido:buffer). Los extractos se aplicaron en los pocillos

previamente tratados con el anticuerpo de captura y se incubaron en caja húmeda a 8°C durante toda la noche. Tras realizar múltiples lavados con PBST (Phosphate Buffered Saline with Tween 20) 1X, se añadió el conjugado enzimático y el sustrato cromogénico PNP (p-nitrophenyl phosphate Substrate Buffer®).

La detección se realizó por medición de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm utilizando el lector de placas Multiskan SkyHigh®, lo que permitió confirmar o descartar la presencia viral en las muestras analizadas.

A				B			
	1		3		1		3
A	Blanco		Hoja de tomatillo	A	Blanco		Hoja de tomatillo
B	Blanco		Hoja de tomatillo	B	Blanco		Hoja de tomatillo
C	Negativo (-) Planta 1		Fruto de tomatillo	C	Negativo (-) Planta 1		Fruto de tomatillo
D	Negativo (-) Planta 2		Fruto de tomatillo	D	Negativo (-) Planta 2		Fruto de tomatillo
E			(+) ToBRFV planta 1	E			(+) ToBRFV planta 1
F			(+) ToBRFV planta 2	F			(+) ToBRFV planta 2
G			(+) TMV ELISA	G			(+) Planta 1
H			(+) TMV ELISA	H			(+) Planta 2

Figura 3. Diseño de placas para la detección de virus. (A) Virus del mosaico del tabaco. (B) Virus del fruto rugoso marrón del tomate.

Pruebas de transmisibilidad del agente etiológico

Con el objetivo de evaluar la capacidad de transmisión del agente etiológico y cumplir con los criterios de causalidad propuestos por los postulados de Koch (adaptados para fitopatógenos) y de Rivers (específicos para virus), se realizaron ensayos de inoculación mecánica bajo condiciones controladas en invernadero siguiendo el protocolo descrito por Dijkstra y de Jager (1998).

Las semillas utilizadas correspondieron a la variedad Harris Moran Siqueiros, proporcionadas por el Ing. López Brizuela, productor del Valle de la Trinidad. Estas se sembraron en charolas (semilleros) con sustrato comercial Cosmopeat® (Cosmocel®, México). Una vez germinadas, las plántulas se trasplantaron a macetas individuales, se etiquetaron para su identificación y se mantuvieron bajo condiciones controladas hasta alcanzar el estado adecuado para la inoculación.

Este diseño permitió evaluar de forma sistemática la capacidad del macerado de tejido sintomático para inducir síntomas similares en ejemplares sanos, lo cual constituye un criterio esencial dentro de los postulados de Rivers para la identificación de virus. La metodología general del proceso, desde la

obtención del macerado hasta su aplicación en los diferentes tratamientos, se resume en la Figura 4. Cabe destacar que el macerado se distribuyó en alícuotas individuales para evitar ciclos de congelación y descongelación que pudieran reducir la actividad del agente viral.



Figura 4. Metodología utilizada para preparación del macerado.

Se llevaron a cabo tres réplicas biológicas independientes, en las cuales se evaluaron distintos tratamientos de inoculación. En la primera réplica se incluyeron grupos control y tratamientos con inóculos obtenidos de hoja y fruto de plantas sintomáticas. En las réplicas subsecuentes se ajustó el diseño experimental, utilizando un macerado combinado de ambos tejidos y añadiendo un tratamiento con dilución 1:50 del inóculo. En todas las réplicas se mantuvieron condiciones ambientales controladas y se registraron la temperatura promedio, el número de plantas por grupo y la duración del ensayo, como se resume en la Tabla 2.

Los grupos experimentales se definieron de la siguiente manera:

- Control negativo: Ejemplares sanos no inoculados, utilizados como referencia para descartar síntomas no asociados al tratamiento.
- Mock: Individuos tratados únicamente con PBS 1X (solución fosfato salina), que sirvieron como control del daño mecánico causado por la inoculación.
- Tratamiento inoculado - hoja: Plantas expuestas a un macerado preparado a partir de tejido foliar sintomático.
- Tratamiento inoculado- fruto: Ejemplares inoculados con un macerado elaborado con tejido sintomático proveniente de frutos.
- Tratamiento- extracto (mix): Se utilizó un macerado combinado de tejido sintomático de tejido foliar y fruto.
- Tratamiento inoculado diluido: Individuos tratados con un macerado sintomático (mix) diluido 1:50 con PBS 1X.

Tabla 2. Resumen de réplicas, tratamientos, número de plantas y condiciones experimentales.

Réplica - Tratamiento y número de plantas		Temperatura promedio	Fechas
1ra	Control negativo: 6 Mock: 6 Inóculo-hoja: 8 Inóculo-fruto: 7	27°C	04 - 28 de noviembre de 2024
2da	Control negativo: 12 Mock: 12 Extracto (mix): 12 Extracto diluido 1:50: 12	23.1°C	28 de febrero - 21 abril de 2025
3ra	Control negativo: 10 Mock: 11 Extracto (mix): 11 Extracto diluido 1:50: 11	25°C	02 - 28 de mayo de 2025

Este ajuste metodológico permitió observar la respuesta de las plantas tanto a un inóculo más representativo del tejido completo como a una concentración reducida del mismo, fortaleciendo la evaluación de la transmisibilidad del agente causal bajo los principios de los postulados de Koch y Rivers.

Una vez definidos los grupos experimentales, se estableció una línea base de crecimiento mediante la medición inicial de la altura de cada planta (desde el nivel del sustrato hasta el ápice) y de la longitud de una hoja seleccionada. En cada caso, la regla se colocó sobre el sustrato sin enterrarse, utilizándose únicamente como soporte vertical (Figura 5), lo que garantizó consistencia en las mediciones a lo largo del experimento. Estos registros fueron esenciales para detectar posibles alteraciones en el desarrollo vegetal, ya que algunos virus pueden inducir enanismo u otras deformaciones características de la infección viral. Realizar las mediciones previas a la inoculación permitió comparar de manera precisa la evolución de las plantas y distinguir los efectos asociados al tratamiento viral.



Figura 5. Ejemplo de medición de plantas.

Posteriormente, se procedió con la inoculación de los tratamientos, siguiendo el protocolo resumido en la Figura 6. En este proceso se aplicó carborundo sobre la hoja naciente para generar microlesiones que facilitarían la entrada del inóculo al tejido vegetal, conforme a lo descrito por Dijkstra y de Jager (1998). Seguidamente, se depositaron 3 μ L del macerado correspondiente (o PBS 1X en el grupo mock) sobre la hoja tratada y se realizó una ligera fricción con un pistilo para favorecer la absorción. Finalmente, las hojas se enjuagaron con agua destilada para eliminar los residuos del abrasivo y del inóculo, garantizando la uniformidad del procedimiento.

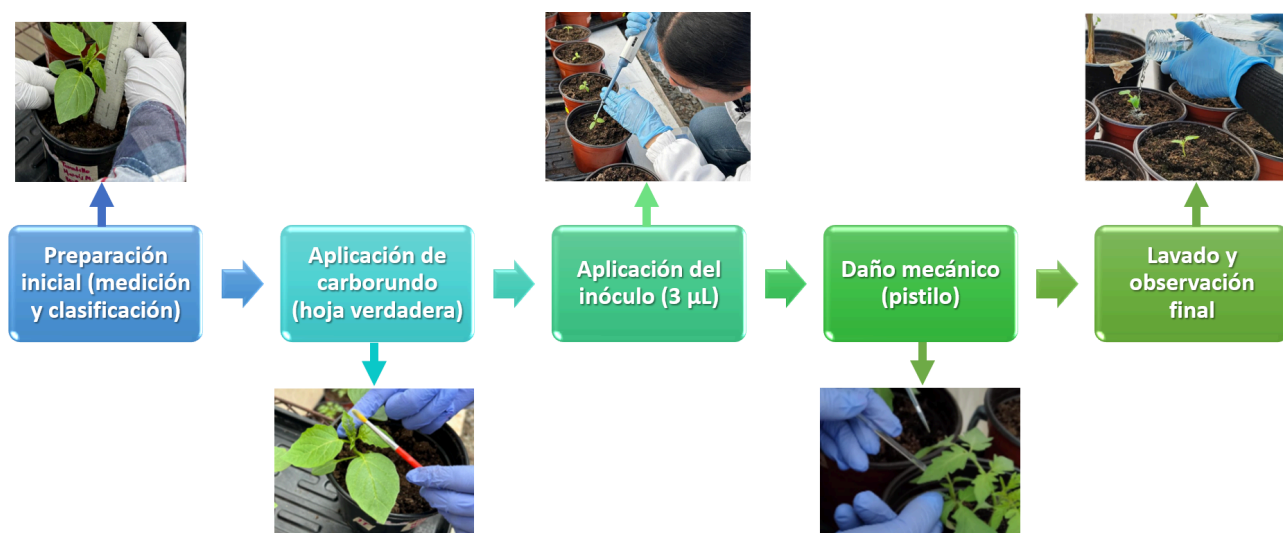


Figura 6. Procedimiento experimental para probar los postulados de Koch y Rivers.

Enriquecimiento y observación de partículas virales

La concentración de partículas virales se realizó a partir de tejidos foliares y/o de frutos previamente identificados con síntomas evidentes de infección, tales como clorosis, enrollamiento foliar o deformación de frutos. Se utilizó como base el protocolo descrito por Chapman (1988) para la extracción de partículas de tobamovirus con adaptaciones, y tomando como referencia la metodología de Feng y Chen et al., (2017), para el enriquecimiento de partículas virales en extractos vegetales.

El material vegetal sintomático seleccionado (correspondiente a los ejemplares con mayor intensidad de sintomatología observada en la muestra original de campo y en las pruebas de transmisión mecánica) se maceró en buffer de fosfato salino (PBS 1X, pH 7.4), continuando con pasos de centrifugación y filtrado para eliminar restos celulares. El sobrenadante se concentró mediante ultracentrifugación y el pellet obtenido se resuspendió en buffer TES 1X (Tris-HCl, NaCl, EDTA, pH 7.5) para favorecer la recuperación de las partículas virales. El extracto resultante se clarificó nuevamente y se destinó a la observación por microscopía electrónica de transmisión (TEM).

La visualización de partículas se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada del CICESE (LNMA), utilizando rejillas de cobre. Para su preparación, se colocaron 10 μL de muestra sobre cada rejilla, dejándola en adsorción durante 2 minutos antes de retirar el exceso por capilaridad con papel absorbente. Seguidamente, se añadieron 10 μL de acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 2 minutos para el contraste negativo, retirando nuevamente el exceso con papel absorbente. Finalmente, las rejillas se secaron bajo una lámpara a temperatura ambiente durante 30 minutos y se conservaron a temperatura ambiente hasta su observación.

La caracterización incluyó la evaluación del número, forma y tamaño de las partículas observadas, hasta completar una población definida de 200 partículas por rejilla. Las mediciones se realizaron utilizando el software Fiji® (Schindelin et al., 2012), una distribución mejorada de ImageJ® que integra múltiples complementos para el análisis de imágenes científicas. Por lo tanto, permite cuantificar de manera precisa la longitud de las partículas virales a partir de las micrografías electrónicas obtenidas por TEM.

Para el análisis, las imágenes fueron calibradas con base en la escala incluida en cada micrografía, estableciendo la relación píxeles-micrómetros mediante la herramienta Set Scale. Después, se delimitaron las partículas individuales utilizando la función Measure dentro del menú Analyze, registrando parámetros de longitud. Los datos obtenidos fueron exportados a una hoja de cálculo para la elaboración de histogramas de distribución de tamaños. Este procedimiento permitió obtener un conteo representativo y estandarizado de las dimensiones promedio de las partículas, garantizando la reproducibilidad del análisis.

Resultados

Descripción de las muestras de campo

Se recibieron tres plantas de tomatillo que presentaban síntomas compatibles con virosis y presencia de plagas, de acuerdo a la información proporcionada por los productores (Tabla 3). Entre los síntomas más destacados se observaron el enrollamiento de hojas, manchas amarillas, necrosis y presencia de orificios foliares.

Tabla 3. Características de las muestras de campo de tomatillo.

Etiqueta. Muestra- Predio	Planta	Fecha de siembra de plántula	Fecha de muestreo	Síntomas observados	Plagas detectadas por productores
(M1). Muestra 1 - Predio A	Tomatillo	12 de septiembre de 2024	24 de octubre de 2024	Planta clorótica, hojas enchinadas, anillos concéntricos en fruto	Gusano soldado, trips y arañita roja
(M3). Muestra 2- Predio A	Tomatillo (Variedad siqueiros)	22 de julio de 2024	24 de octubre de 2024	Planta clorótica, planta flácida, anillos concéntricos en fruto	Gusano soldado
(M4). Muestra 2 - Predio B	Tomatillo (Variedad siqueiros)	22 de julio de 2024	24 de octubre de 2024	Planta clorótica, planta flácida, anillos concéntricos en fruto	Gusano soldado

En los frutos se identificó arrugamiento, manchas de color café con tonalidades amarillentas, superficie rugosa, fragilidad estructural, acuosidad y presencia de circunferencias amarillas (Figuras 7, 8 y 9).



Figura 7. Vista general de planta M1 (A), y síntomas detectados en los frutos, incluyendo circunferencias amarillas (B) y necrosis (C).

En la Figura 8, se observan síntomas como manchas, perforaciones, frutos con lesiones y decoloración. Específicamente, en la 8C se muestra un conjunto de frutos afectados, algunos de los cuales presentan signos avanzados de daños, como zonas excesivamente blandas. Un aspecto relevante señalado por los agricultores es que, en la etapa terminal de la enfermedad, el fruto se vuelve casi líquido (8E), lo que impide su manipulación sin que se rompa, imposibilitando su comercialización debido a la pérdida total de calidad del producto.

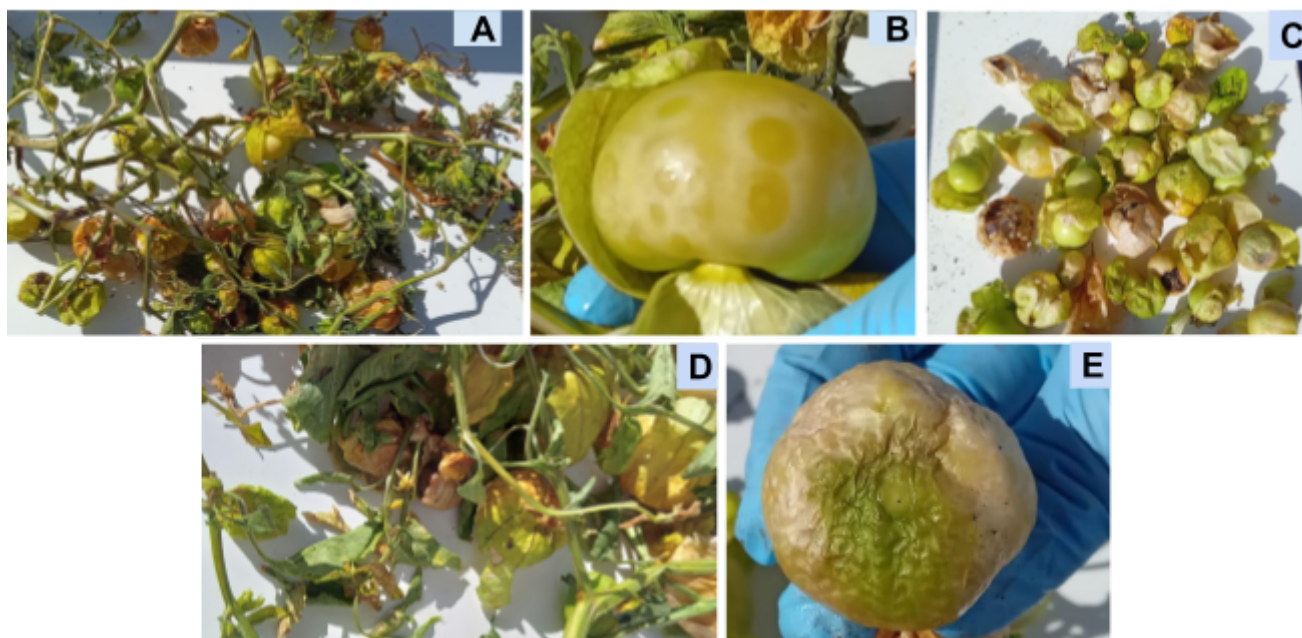


Figura 8. Fotografías de la planta M3 (A), frutos con lesiones circulares y decoloración (B), frutos afectados (C), hojas con tonalidades amarillentas (D) y fruto con síntomas severos (E).

En la Figura 9, se aprecian los síntomas observados en la planta M4. En 9A, la planta completa muestra un aspecto general de marchitez, amarillamiento y pérdida de vigor, con varios frutos que presentan tonalidades irregulares. En la 9B, las hojas evidencian manchas cloróticas y necróticas, así como pequeñas perforaciones características asociadas a daño sistémico. En la figura 9C, el fruto exhibe lesiones extensas con áreas deprimidas y decoloradas, que progresan hasta generar tejidos blandos y colapsados, lo que indica un avance severo del deterioro.

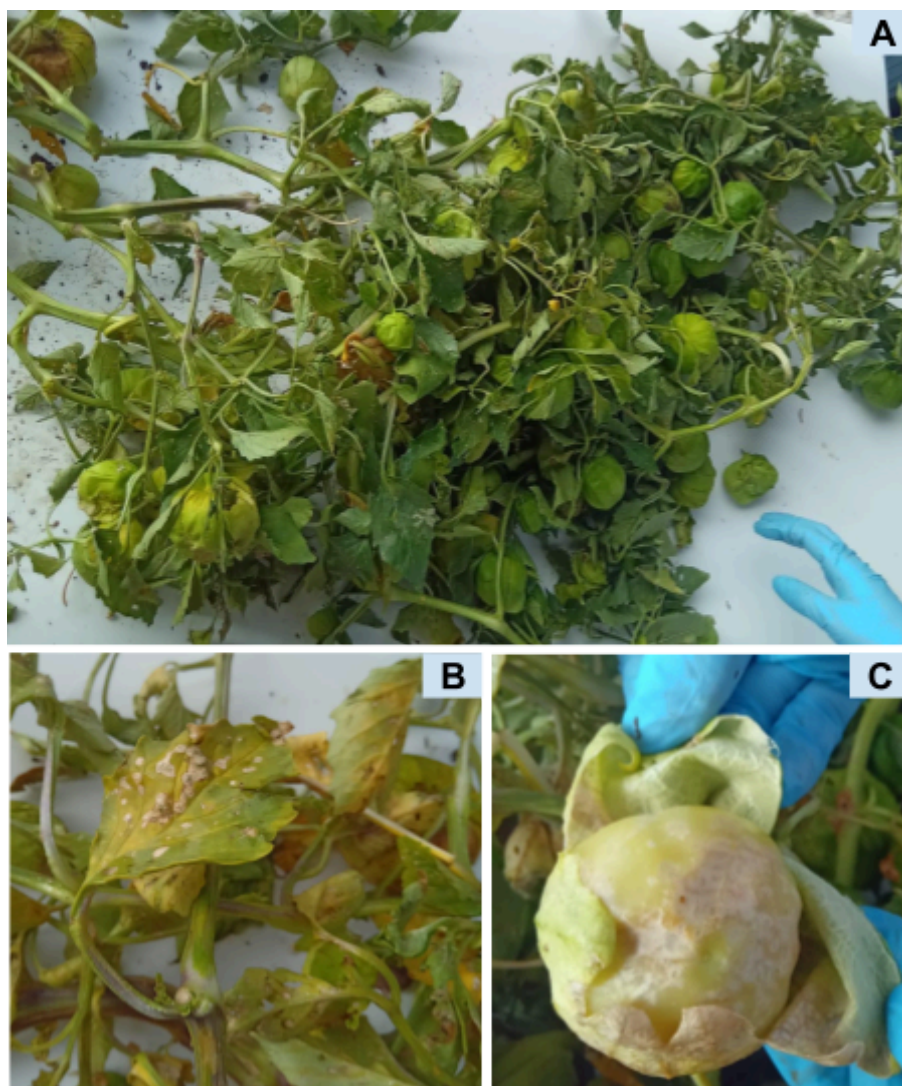


Figura 9. Vista general de planta M4 (A), síntomas detectados en hoja (B) y fruto (C).

Transmisibilidad del agente etiológico, postulados de Koch y Rivers

Se realizaron tres inoculaciones en condiciones controladas dentro de un invernadero, en distintas etapas del desarrollo de las plantas para evaluar la transmisibilidad del agente causal. La variable principal fue la altura de las plantas considerada como indicador del impacto del agente sobre el crecimiento y desarrollo del tomatillo. Además, se registraron los síntomas visibles en las plantas inoculadas mediante una escala visual de severidad con cinco categorías: 0 = sano, 1 = leve, 2 = moderado, 3 = severo y 4 = muerte. Esta escala permitió clasificar y comparar la intensidad del daño observado entre los distintos tratamientos (Figura 10).





Nivel	Descripción breve	Ejemplo visual
0 = Sano	Planta normal, color verde sin síntomas	
1 = Leve	Pequeñas manchas cloróticas, amarillamiento o mosaico tenue	
2 = Moderado	Amarillamiento, mosaico evidente, ligera deformación foliar, enanismo	
3 = Severo	Enanismo notorio, clorosis marcada, necrosis parcial y enrollamiento	
4 = Muerte	Planta colapsada, necrosis total o muerte	



Figura 10. Escala visual utilizada para clasificar la severidad de los síntomas observados en plantas de tomatillo después de la inoculación mecánica.

Para comparar los tratamientos se utilizó un análisis de varianza (ANOVA), el cual permite evaluar si existen diferencias significativas en la media de una variable entre varios grupos. En este análisis, el valor F corresponde al estadístico de prueba ANOVA, los grados de libertad (gl) indican la cantidad de variabilidad considerada y el valor de p representa el nivel de significancia, donde $p < 0.05$ se interpreta como diferencias estadísticas entre tratamientos. En los casos donde se encontraron diferencias, se aplicó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, que permite identificar específicamente entre qué tratamientos se presentan dichas diferencias, controlando el error asociado a las comparaciones múltiples.

La primera inoculación se llevó a cabo durante el mes de noviembre del 2024, cuando las plantas presentaban dos hojas verdaderas, que son las hojas desarrolladas después de los cotiledones y con la morfología típica de la especie. Esta inoculación se realizó 20 días después de la siembra, bajo una

temperatura ambiental promedio de aproximadamente 27 °C. La altura de las plantas se registró en diferentes días post-inoculación (dpi).

El análisis de varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre tratamientos ($F = 1.156$; $gl = 3$; $p = 0.348$), por lo que la prueba de Tukey tampoco evidenció variaciones estadísticas entre grupos (Figura 11).

Aunque los controles negativo y mock tendieron a mostrar plantas ligeramente más altas, la variabilidad dentro de los grupos impidió que las diferencias fueran estadísticamente significativas. Sin embargo, se observaron síntomas severos como enanismo, clorosis y enrollamiento foliar en el grupo inoculado con extracto de hoja, y síntomas moderados en el grupo tratado con extracto de fruto (Figura 12).

Es decir, en esta réplica, en el último día de observación, no se puede concluir que los tratamientos hayan afectado de manera significativa la altura de las plantas por la variabilidad intraespecífica.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Estadístico F	p-valor
Tratamiento	61.745899	3.0	1.155916	0.347907
Residual	409.532619	23.0		

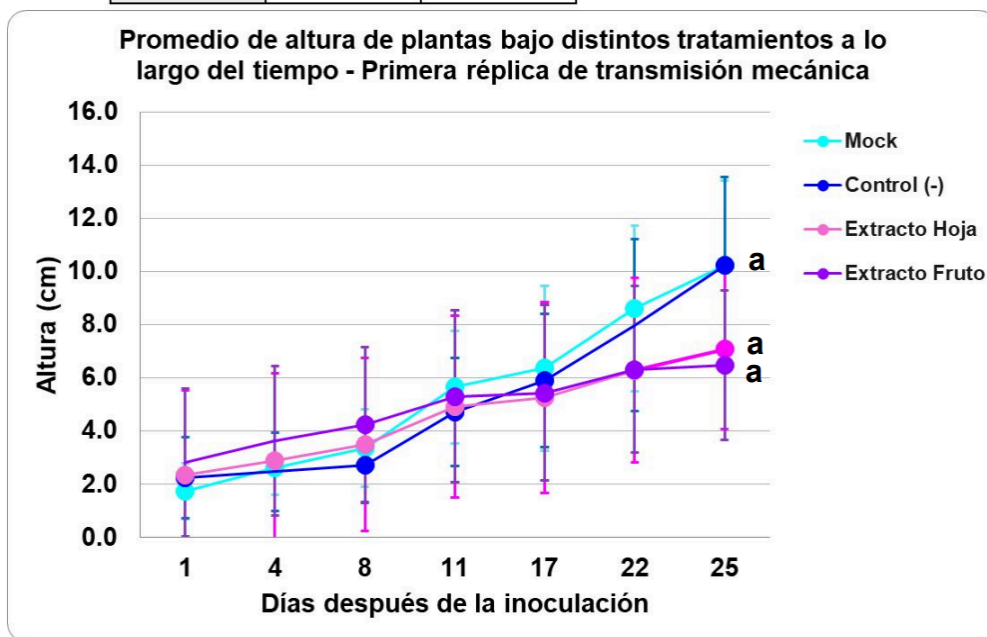


Figura 11. Altura promedio de plantas de tomatillo en la primera réplica de transmisión mecánica a lo largo de 25 días después de la inoculación (dpi). Se muestran los resultados del análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey correspondientes al día 25 dpi. Las barras de error denotan la desviación estándar.

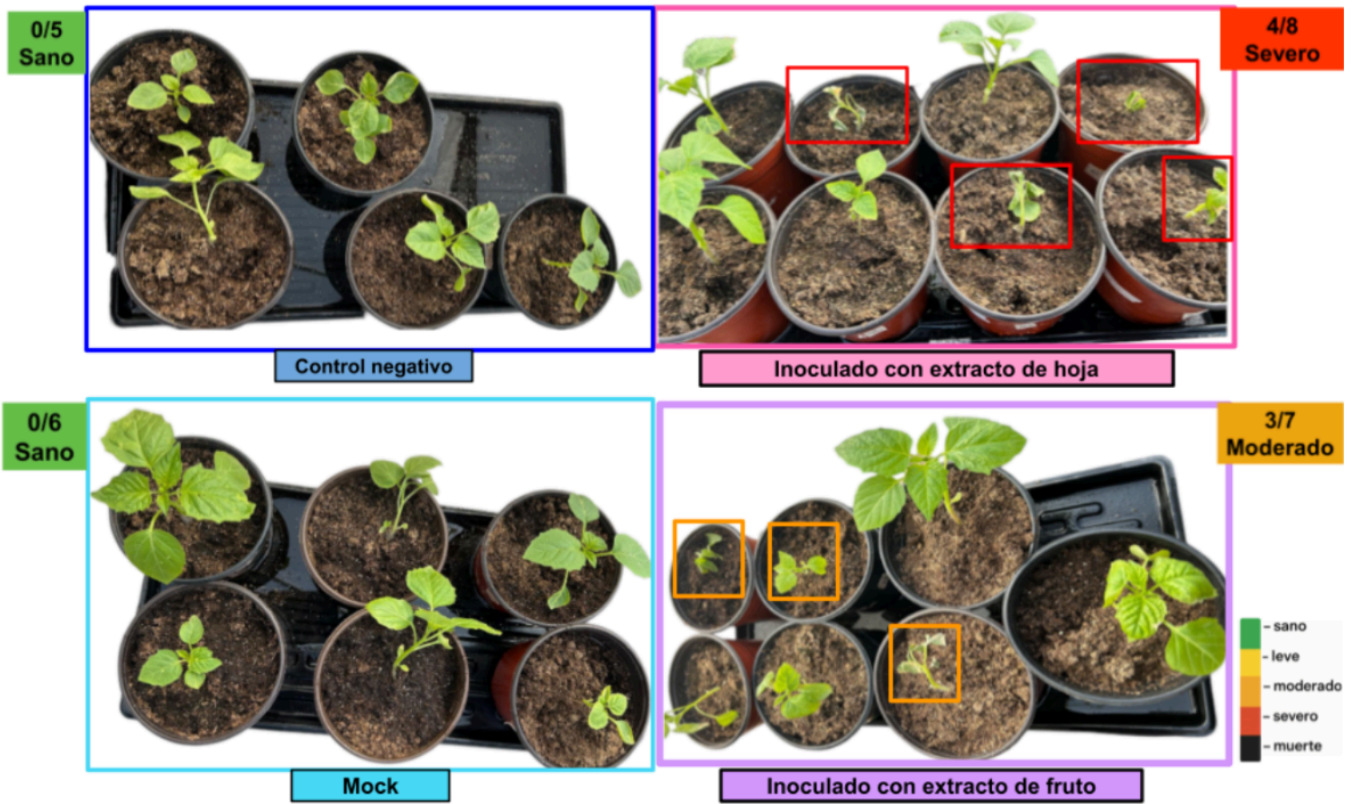


Figura 12. Síntomas en plantas de tomatillo a 25 días post-inoculación (dpi) durante la primera réplica de transmisión mecánica. Los números indican la proporción de plantas sintomáticas respecto al total evaluado, y el color del recuadro que los contiene representa el nivel de severidad de los síntomas según la escala empleada: verde = sano, amarillo = leve, naranja = moderado, rojo = severo y negro = muerte.

La segunda inoculación se realizó durante febrero y abril de 2025, con una temperatura promedio de 23.1°C. Las semillas fueron sembradas y las plántulas trasplantadas 22 días después de la siembra. La inoculación se realizó 10 días después del trasplante, es decir, 31 días después de la siembra. En este caso, se consideraron dos variables; altura de las plantas y longitud de la hoja tratada.

En este ensayo, el ANOVA mostró diferencias altamente significativas en la altura de las plantas entre tratamientos ($F = 29.43$; $gl = 3$; $p < 1.486770 \times 10^{-10}$). La prueba de Tukey (Figura 13) evidenció que los controles negativo y mock alcanzaron las mayores alturas (a), el extracto diluido 1:50 presentó un efecto intermedio (b) y el extracto puro provocó la menor altura (c). Estos resultados indican que la aplicación del extracto afecta negativamente el crecimiento de las plantas, mientras que la dilución atenúa dicho efecto.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Estadístico F	p-valor
Tratamiento	254.000833	3.0	29.234064	1.486770×10^{-10}
Residual	127.431667	44.0		

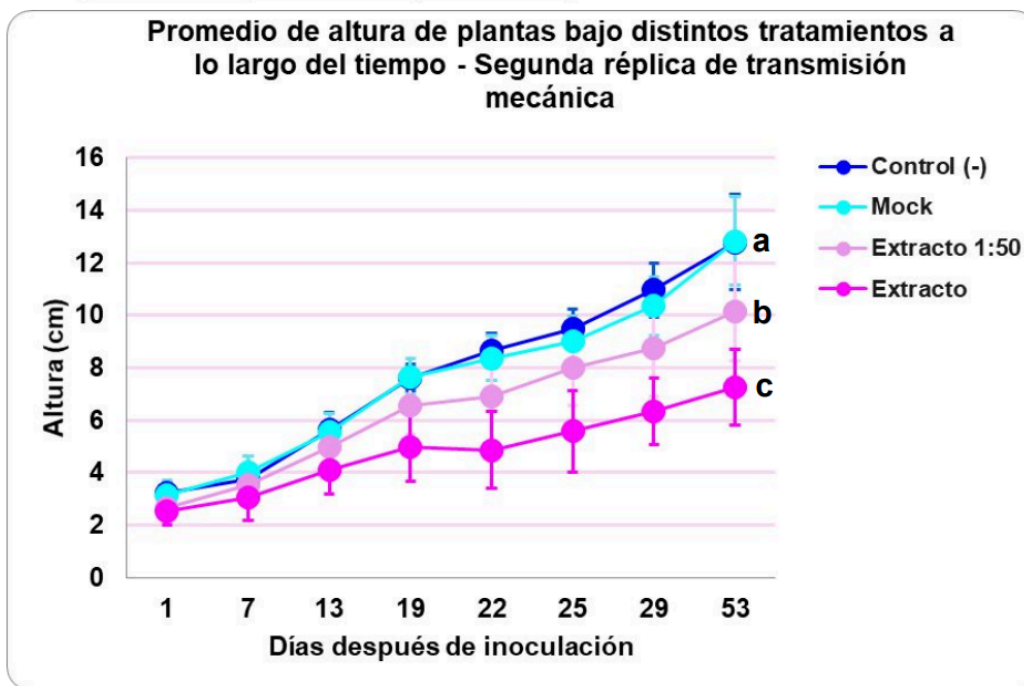


Figura 13. Altura promedio de plantas de tomatillo hasta 53 dpi en la segunda réplica de transmisión mecánica. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey después del análisis de ANOVA correspondiente al día 53 dpi. Las barras de error denotan la desviación estándar.

Además de la reducción en altura, las plantas inoculadas con extracto puro presentaron síntomas característicos asociados a infección, como clorosis, moteado y deformaciones en las hojas, que fueron evidentes desde las primeras semanas post-inoculación. Las plantas tratadas con extracto puro manifestaron clorosis, moteado, deformaciones foliares y enanismo, observándose síntomas en 9 de 12 plantas. En el tratamiento diluido, 6 de 12 plantas mostraron amarillamiento y enrollamiento de hojas, con síntomas de menor severidad, contrastando con los controles que permanecieron asintomáticos (Figuras 14 y 15).

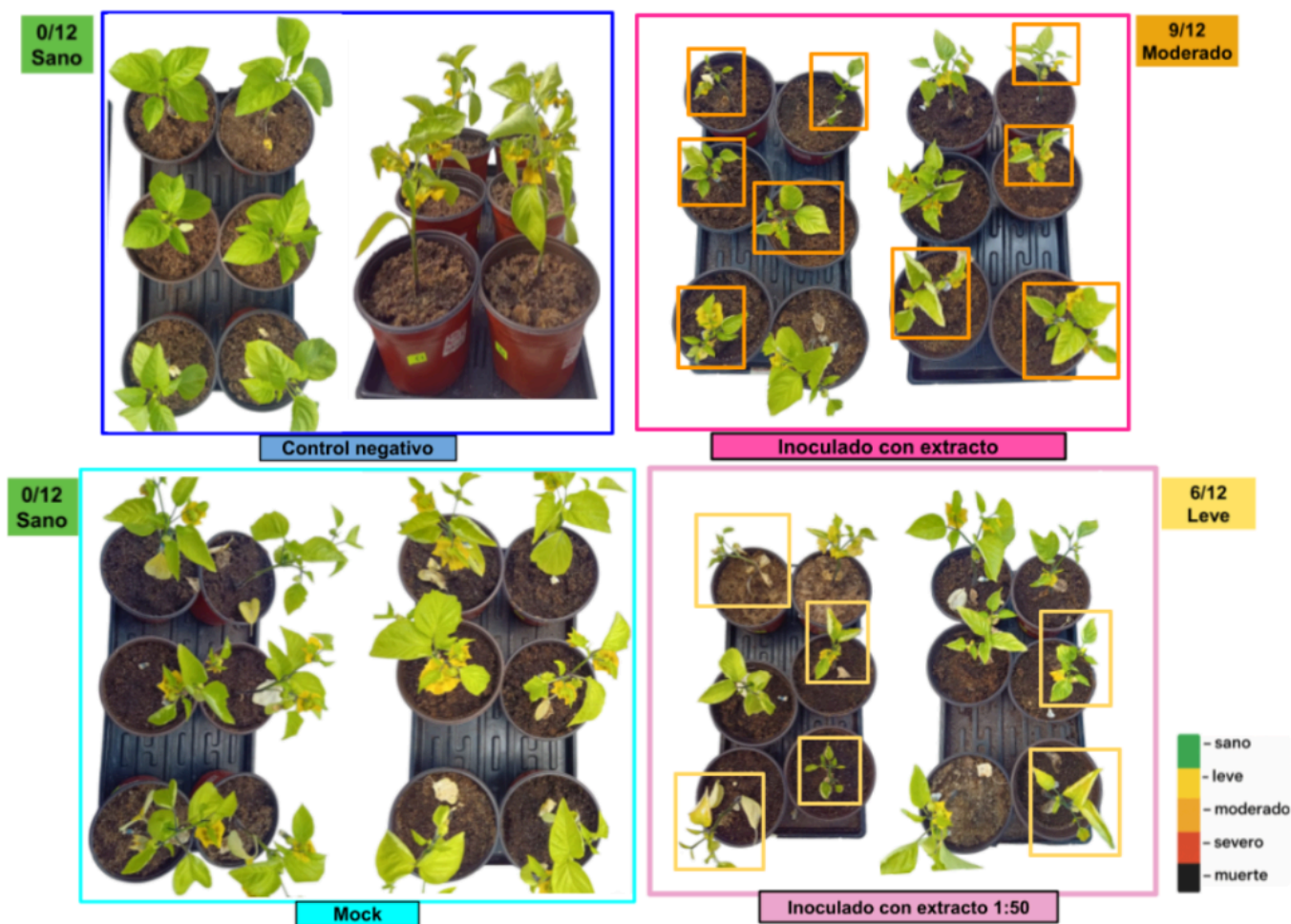


Figura 14. Plantas de tomatillo en cada grupo a los 53 días post-inoculación (dpi) durante la segunda réplica de transmisión mecánica. Los números indican la proporción de plantas sintomáticas respecto al total evaluado. Escala de severidad: verde = sano, amarillo = leve, naranja = moderado, rojo = severo y negro = muerte.

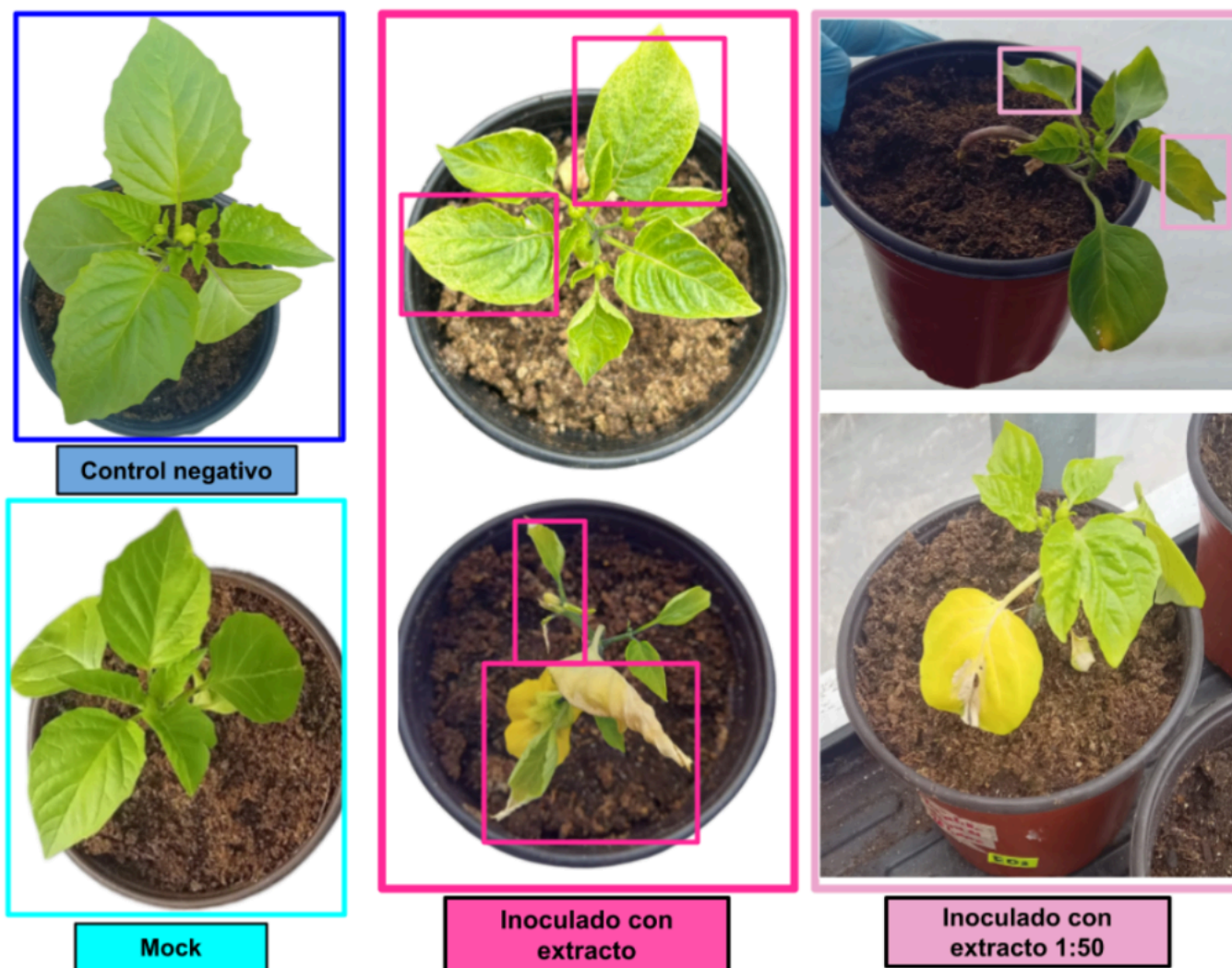


Figura 15. Ejemplos representativos de plantas de tomatillo a los 53 días post-inoculación (dpi) durante la segunda réplica de transmisión mecánica.

En cuanto a la longitud de la hoja inoculada, también se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$), en el día 29 dpi, el tratamiento mock presentó la mayor longitud (a), mientras que el extracto sin diluir y diluido fueron similares estadísticamente (b) (Figura 15). Además, las hojas inoculadas con extracto presentaron detención del crecimiento a partir del día 19 post-inoculación, enrollamiento y, en algunos casos desprendimiento de dicha hoja. Estos resultados confirman que el extracto limita el desarrollo foliar, aunque su dilución reduce parcialmente este efecto.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Estadístico F	p-valor
Tratamiento	17.133889	2.0	14.075637	0.000038
Residual	20.085000	33.0		

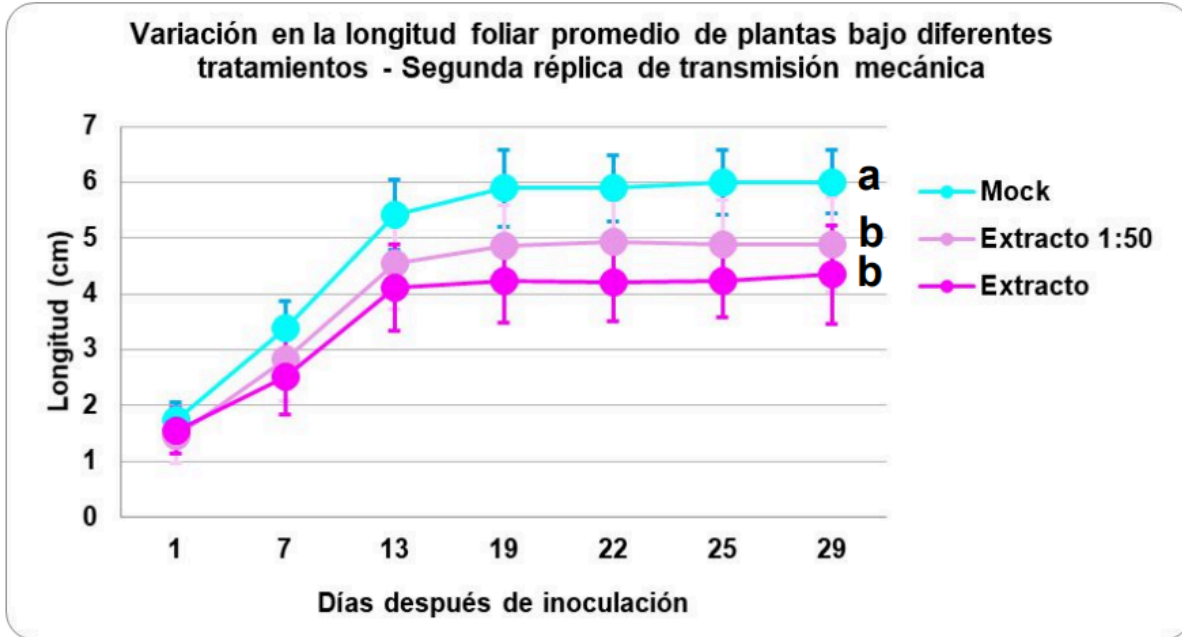


Figura 16. Longitud promedio de hojas inoculadas de plantas de tomatillo a lo largo de 29 dpi en la segunda réplica del experimento de transmisión mecánica. Letras diferentes (a,b) indican diferencias significativas con base a la prueba de Tukey después de ANOVA a los 29 dpi. Las barras de error denotan la desviación estándar.

Para complementar los datos cuantitativos de longitud foliar, en la Figura 17 se presentan imágenes representativas de las hojas recolectadas de cada grupo en esta réplica. Se pueden apreciar claramente las diferencias en tamaño, forma y coloración entre los tratamientos. Las hojas de las plantas inoculadas con extracto puro muestran un menor tamaño y deformaciones visibles, además de una marcada clorosis especialmente evidente en las venas, donde se observa un amarillento que indica un posible daño vascular o estrés fisiológico. Por otro lado, las hojas del grupo tratado con dilución 1:50 presentan alteraciones menos severas, tanto en tamaño como en coloración. En contraste, las hojas de los grupos control negativo y mock mantienen un tamaño y morfología normales, sin signos visibles de enfermedad.

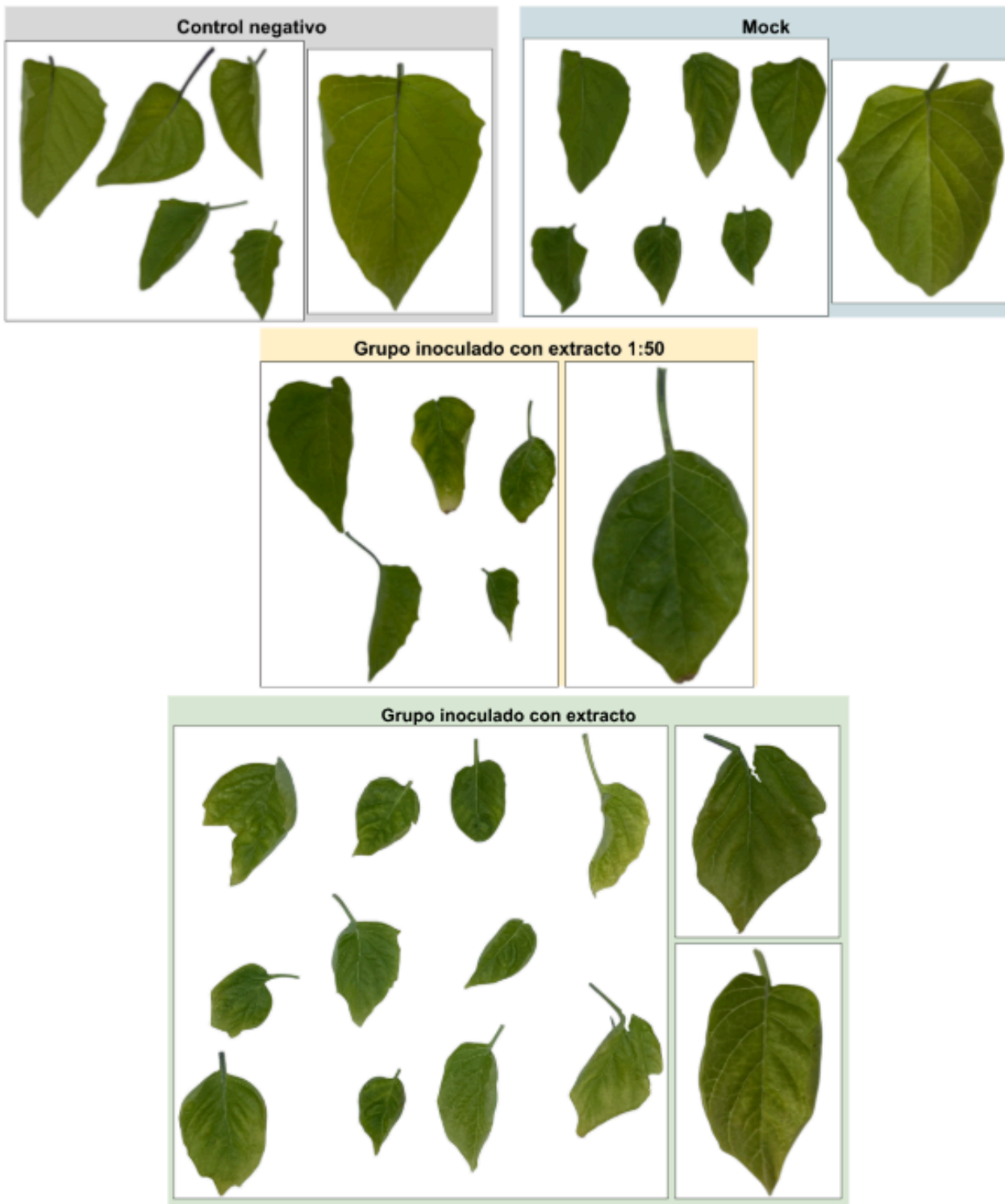


Figura 17. Comparación de hojas de tomatillo a los 53 dpi en la segunda réplica de transmisión mecánica. Todas las imágenes se presentan a la misma escala.

La tercera inoculación se realizó durante el mes de mayo de 2025, bajo una temperatura promedio aproximada de 25 °C. Las plántulas fueron trasplantadas 26 días después de la siembra, y la inoculación se llevó a cabo cuatro días después del trasplante, es decir, a los 30 días post-siembra. En esta réplica, se utilizó como inóculo un macerado preparado a partir de tejido vegetal recolectado de plantas sintomáticas provenientes de la segunda réplica, lo que permitió evaluar la capacidad del agente para mantenerse infeccioso a lo largo de múltiples ciclos de transmisión. Durante los 27 días posteriores a la inoculación, se midieron la altura de las plantas y la longitud de la hoja tratada para evaluar posibles efectos fisiológicos de la infección.

El ANOVA mostró diferencias altamente significativas en la altura de las plantas entre tratamientos ($p < 4.076319 \times 10^{-12}$) y la prueba de Tukey (Figura 18) indicó que mock y control negativo alcanzaron las mayores alturas (a), el extracto puro causó una reducción significativa (b), y el extracto diluido 1:50 presentó la menor altura (c) en el último día de observación 27 dpi. Esto indica que la aplicación de extracto, incluso diluido, puede limitar el crecimiento de las plantas.

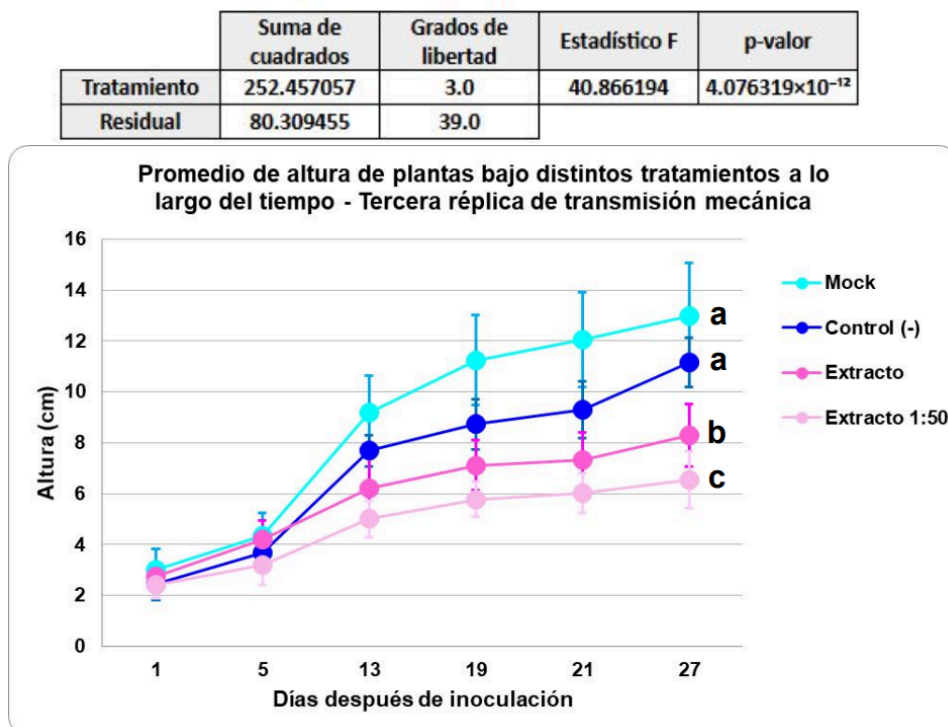


Figura 18. Altura promedio de plantas de tomatillo hasta los 27 dpi en la tercera réplica del experimento de transmisión mecánica. Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey después de ANOVA realizada en datos de 27 dpi. Las barras de error denotan la desviación estándar.

Los síntomas registrados a los 27 dpi fueron consistentes: hojas más pequeñas, cloróticas y deformadas, afectando a 7 de 11 plantas en extracto puro y a 11 de 11 en extracto diluido, este último con mosaico en nervaduras y enanismo (Figuras 19 y 20). La reducción en el crecimiento y la aparición de estos síntomas indican que el agente presente en el tejido sintomático afecta el desarrollo de la planta de forma dosis-dependiente.

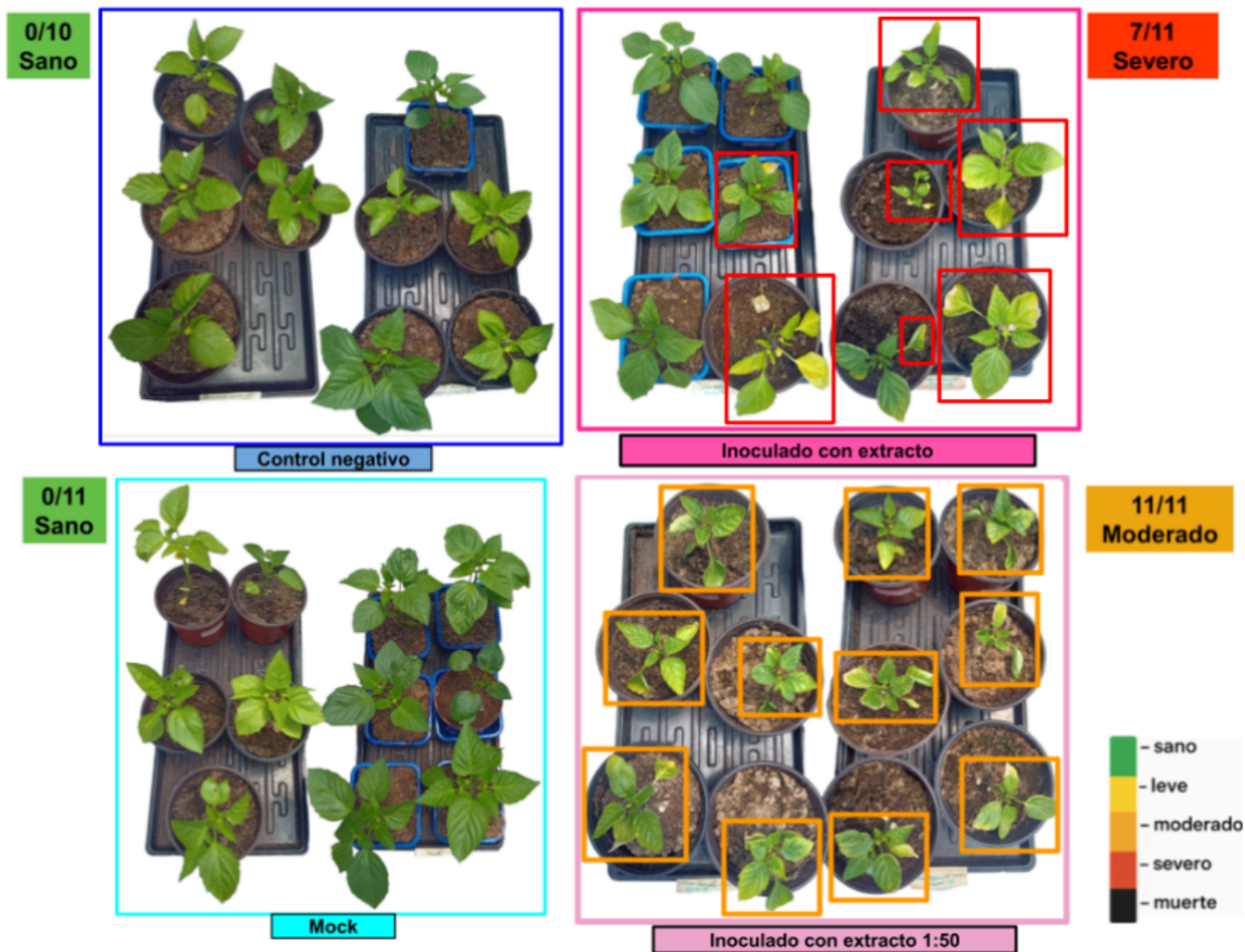


Figura 19. Plantas de tomatillo a los 27 días post-inoculación (dpi) durante la tercera réplica del ensayo de transmisión mecánica. Los números indican la proporción de plantas sintomáticas respecto al total evaluado.

Escala de severidad: verde = sano, amarillo = leve, naranja = moderado, rojo = severo y negro = muerte.

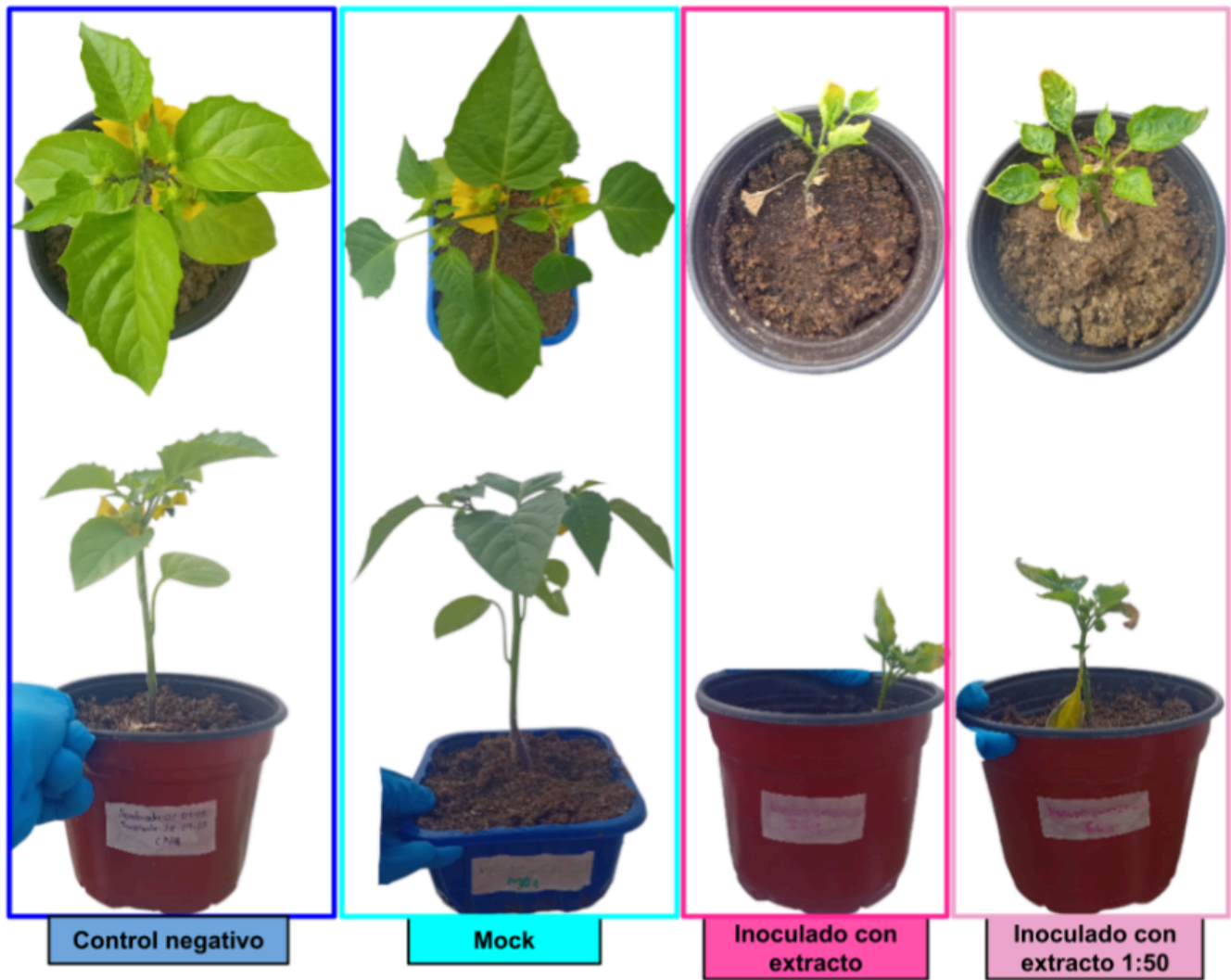


Figura 20. Ejemplares representativos de cada grupo a los 27 dpi en la tercera réplica de transmisión mecánica.

Respecto a la longitud de la hoja tratada, el ANOVA mostró diferencias altamente significativas ($p < 2.135903 \times 10^{-7}$). El tratamiento mock presentó las mayores longitudes (a), mientras que extracto puro y diluido mostraron una estadística similar y tendencia descendente entre ellos (b) (Figura 21).

Esta reducción en la longitud promedio de las hojas inoculadas se observó a partir del día 13 post-inoculación, probablemente debido al agente infeccioso sobre el tejido foliar, que reduce el crecimiento activo de las hojas, provoca enrollamiento y, finalmente, su desprendimiento, lo que explica que la gráfica en la figura 21 tienda a acercarse a cero con el paso de los días.

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Estadístico F	p-valor
Tratamiento	229.485455	2.0	26.762436	2.135903×10 ⁻⁷
Residual	128.623636	30.0		

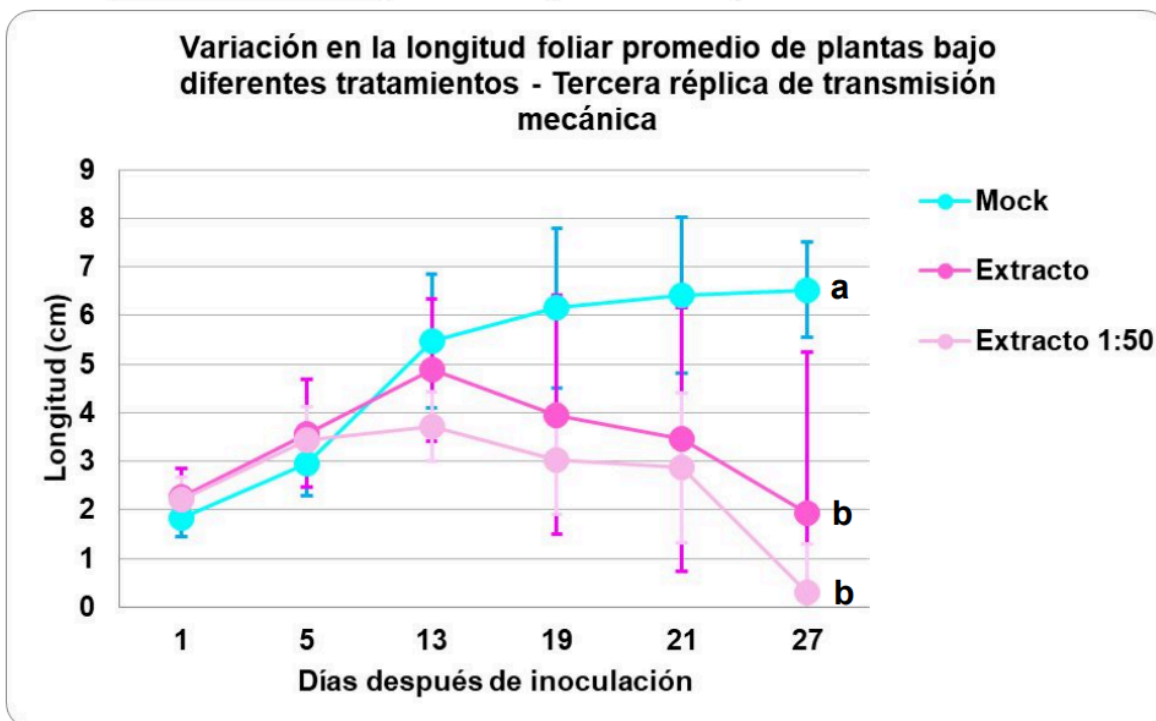


Figura 21. Longitud promedio de hojas inoculadas en plantas de tomatillo hasta los 27 dpi (tercera réplica de experimentos de transmisión mecánica). Letras diferentes indican diferencias significativas según prueba de Tukey. Las barras de error denotan la desviación estándar.

En conjunto, las tres inoculaciones mostraron un patrón consistente: los tratamientos con extracto infectado redujeron la altura y el desarrollo foliar en comparación con los controles. El macerado empleado en la tercera réplica, obtenido de plantas sintomáticas de la segunda, mantuvo su capacidad infecciosa, lo que demuestra la transmisibilidad del agente entre ciclos de planta a planta.

Por otro lado, las temperaturas promedio registradas durante las tres réplicas (Tabla 4) podrían haber influido en la velocidad de desarrollo de los síntomas y en el crecimiento vegetal. En la primera réplica, con temperaturas más altas (~27 °C), los síntomas se manifestaron de forma rápida y clara a los 16 dpi. Los números de plantas afectadas (4 de 8 en el grupo con extracto de hoja y 3 de 7 en el grupo con extracto de fruto) corresponden a aquellas en las que los síntomas fueron claramente evidentes por primera vez, es decir, al inicio de expresión observable de la enfermedad. En ambos tratamientos, las plantas más afectadas mostraron un estado crítico, prácticamente llegando a la necrosis completa.

En la segunda réplica, con temperaturas más bajas (~23 °C), la expresión de los síntomas y la reducción del crecimiento fueron evidentes a los 22 dpi, siendo más pronunciadas a los 29 dpi. En el grupo tratado con extracto puro (12 plantas totales), se observaron diferencias significativas respecto a los controles en 9 plantas, con reducción de hasta la mitad de la altura y presencia de mosaico foliar en algunas nervaduras; estos casos corresponden al inicio de manifestación clara de los síntomas. En el grupo tratado con extracto diluido (12 plantas totales), los síntomas fueron menos frecuentes, detectándose únicamente en 6 plantas al inicio de expresión.

La tercera réplica, con temperaturas intermedias (~25 °C), presentó un patrón consistente de afectación a los 19 dpi, lo que indica que, aunque la temperatura puede modular la rapidez y severidad de los síntomas, el agente causal mantiene su capacidad infecciosa en un rango de condiciones ambientales, lo que puede reflejar lo que sucede en campo. En el grupo tratado con extracto puro (12 plantas totales), los síntomas fueron muy evidentes en 7 plantas desde el inicio de expresión sintomática, mientras que en el grupo con extracto diluido (11 plantas totales), se observaron diferencias con los controles en todas las plantas, manifestadas como enrollamiento foliar y reducción de altura.

Tabla 4. Temperaturas promedio registradas durante el periodo experimental en las tres réplicas biológicas de los experimentos de transmisión mecánica.

Réplica	Periodo	Temperatura promedio (°C)
1 ^a	4 a 28 noviembre - 2024	27.0 °C
2 ^a	28 febrero a 21 abril - 2025	23.1 °C
3 ^a	2 a 28 mayo - 2025	25.0 °C

Diagnóstico de virus mediante técnicas moleculares y serológicas

Se llevó a cabo la extracción de ARN total a partir de muestras de tejido foliar y de fruto de plantas sintomáticas y controles negativos. La concentración de ARN obtenida varió entre 73.5 y 1006.5 ng/μL, con una pureza óptima reflejada en valores de relación A260/280 entre 1.90 y 2.14, rango que indica una adecuada proporción de ácidos nucleicos respecto a proteínas y otros contaminantes (Tabla 5). Dichos valores confirman que las muestras presentaban una pureza aceptable, adecuadas para continuar con análisis moleculares mediante RT-PCR.

Tabla 5. ARN total obtenido de muestras sintomáticas y controles negativos.

Muestra	ng/μL RNA	A260/280
M5A (negativo)	851.4	2.14
M5B (negativo)	342.0	2.13
M1H	101.3	2.03
M1F	144.1	1.90
M3H	1006.5	2.11
M3F	73.6	1.93
M4H	218.4	1.95
M4F	456.4	2.14

Después de ello, se realizaron ensayos de RT-PCR, con el apoyo técnico de la M.C. Idalia Montesinos Solano, utilizando cebadores específicos disponibles en el laboratorio de Virología Agrícola del CICESE dirigidos a los virus más comunes en solanáceas: ToBRFV, TSWV, tobamovirus, potexvirus y potyvirus. En estos ensayos se incluyó un control negativo sin plantilla (NTC), que consiste en una reacción que contiene todos los reactivos excepto el RNA de la muestra, con el fin de confirmar que no haya contaminación en los reactivos o en el procedimiento.

Para la detección de ToBRFV, se emplearon cebadores con un producto esperado de ~475 pb (Figura 22). En este análisis se incluyeron muestras sintomáticas (carriles 1-8, 10-12), un control positivo (carril 13) y un control negativo (NTC; carril 14). En los geles no se observó amplificación específica en las muestras analizadas, mientras que el control positivo mostró la banda esperada y el NTC no presentó señal, confirmando la validez del ensayo. Adicionalmente, se amplificó el gen ribosomal 18S como prueba de calidad del RNA y del cDNA; en todos los casos se encontró la banda esperada (~844 pb).

En el caso de la detección de TSWV, se utilizaron condiciones de alineamiento a 45°C, con un producto esperado de ~800 pb (Figura 22). Las muestras sintomáticas se cargaron en los carriles 12–20, junto con un control positivo (carril 21) y un NTC (carril 22). En los resultados no se observaron bandas específicas en las muestras, mientras que el control positivo mostró la amplificación esperada y el NTC no evidenció señal.

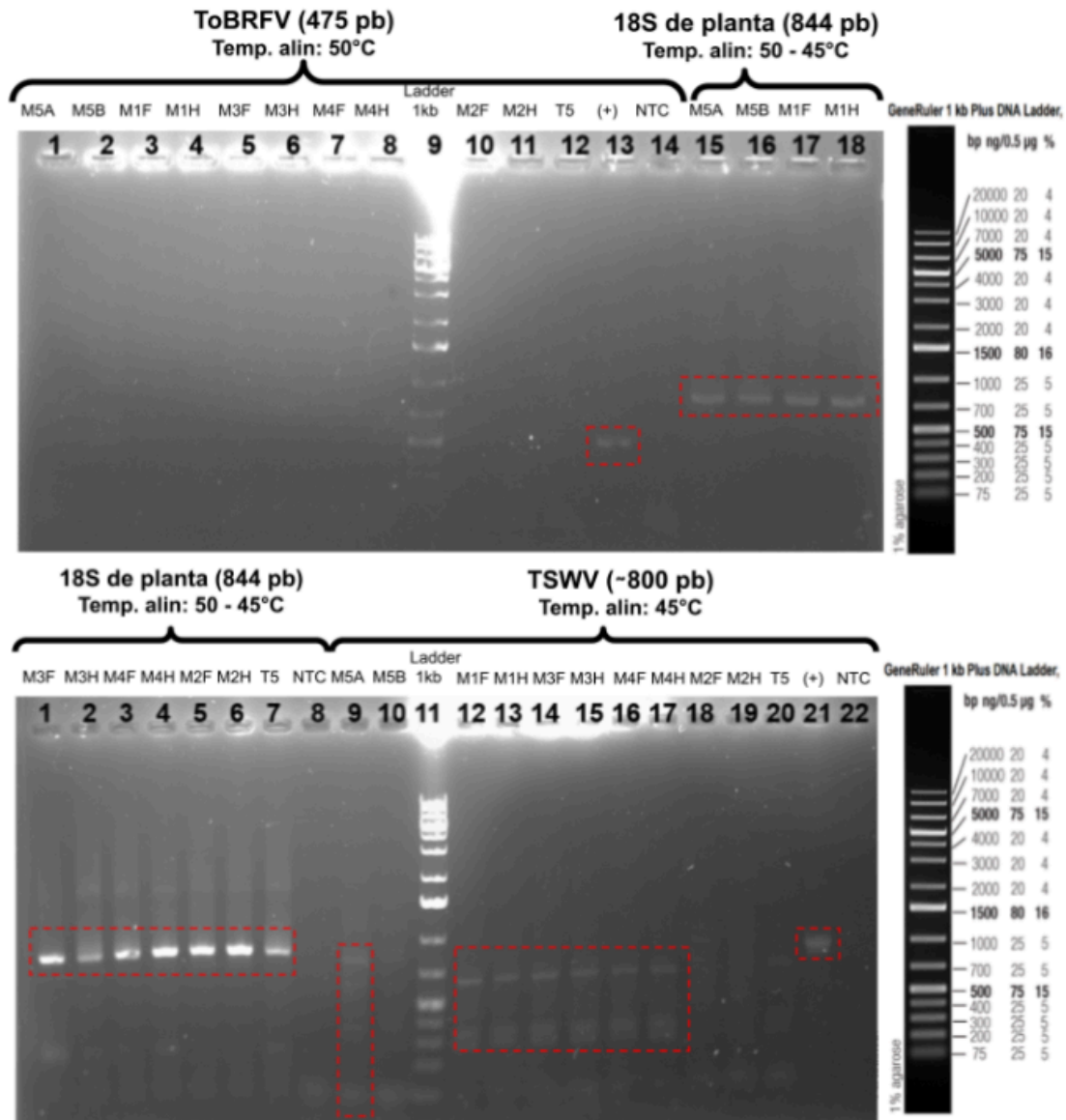


Figura 22. Diagnóstico de ToBRFV y TSWV por RT-PCR en muestras sintomáticas y controles.

Para Tobamovirus (carriles 1–12), se utilizó una temperatura de alineamiento de 50 °C y se esperaba un producto de ~1 kb (Figura 23). Varias muestras sintomáticas (carriles 3–11) mostraron amplificación; sin embargo, resultaron ser bandas inespecíficas, lo que podría indicar reacciones cruzadas o condiciones

de alineamiento subóptimas. El control negativo (NTC, carril 12) no presentó bandas, descartando contaminación. Para potexvirus (carriles 14-25), se evaluaron muestras en los carriles 14–24 y el NTC en el carril 25 (Figura 23). En este ensayo no se detectaron productos de amplificación en las muestras ni en el control negativo.

Finalmente, para la detección de potyvirus (carriles 1-6, 8-14), se analizaron muestras en los carriles 1–6 y 8–13, junto con un control positivo en el carril 14 y un NTC en el carril 1 (Figura 23). En este caso, las muestras no mostraron amplificación específica, mientras que el control positivo generó la banda esperada y el NTC permaneció sin señal.

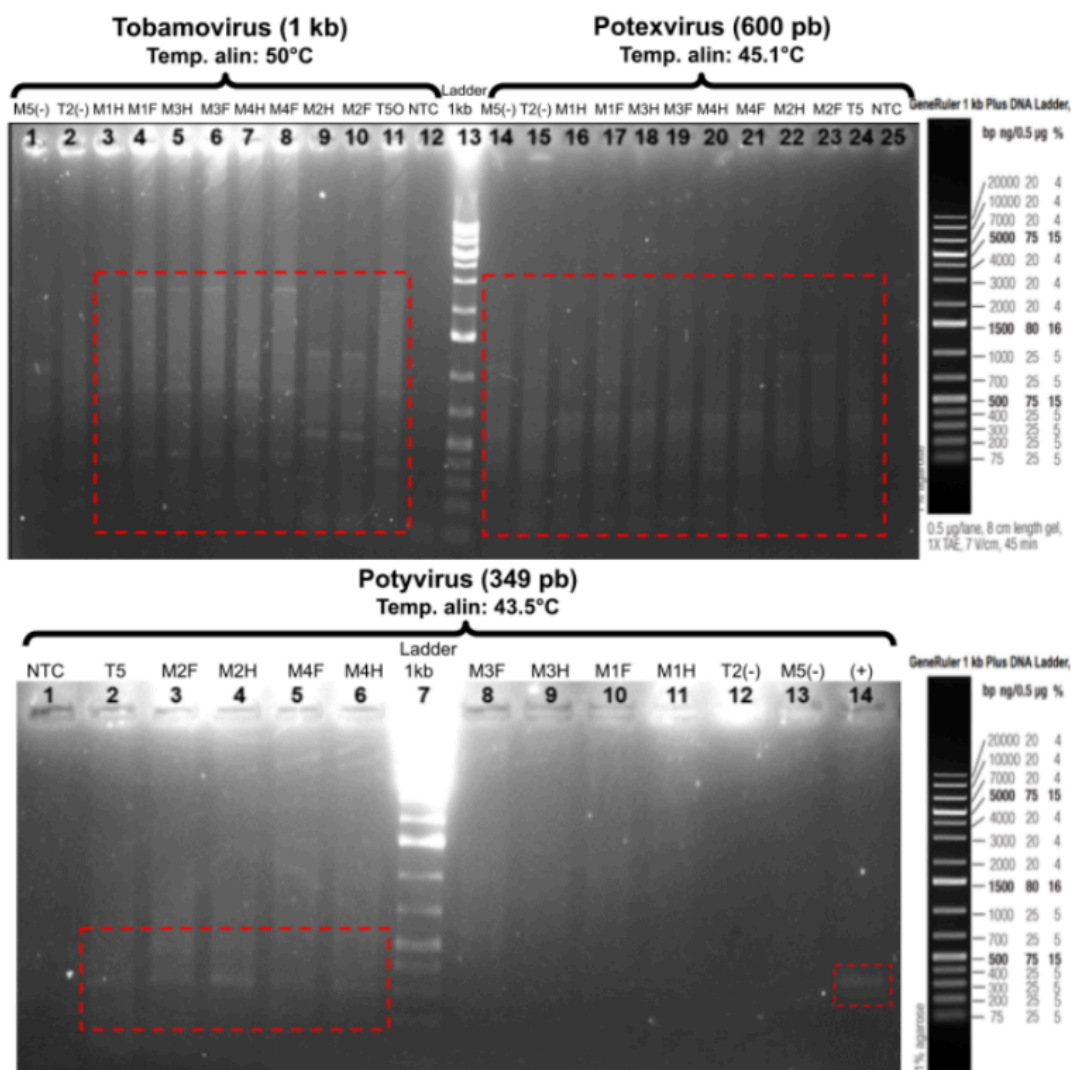


Figura 23. Diagnóstico de tobamovirus, potexvirus y potyvirus en muestras sintomáticas y controles mediante RT-PCR.

Por su parte, en la primera prueba ELISA, realizada con un kit comercial dirigido a la detección del virus del mosaico del tabaco (TMV), los resultados se interpretaron tanto de forma visual como mediante lector de microplacas Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 405 nm.

En la Figura 24 se muestran los resultados, los cuales indican que el procedimiento se realizó correctamente y sin evidencia de contaminación. Para asegurar la validez del ensayo, se incluyeron blancos (controles negativos provistos por el kit) y controles negativos conocidos (- Planta 1 y 2), los cuales no presentaron cambio de color, lo que indica la ausencia de reacciones inespecíficas.

Las muestras seleccionadas para la detección, correspondientes a tejidos foliares (hoja de tomatillo) y de fruto (fruto de tomatillo), tampoco mostraron cambio de color, lo que demuestra la ausencia del virus TMV en las plantas evaluadas. En contraste, las muestras positivas de ToBRFV (pocillos E3 y F3), mostraron un leve color amarillo, consistente con una reacción positiva moderada, como ha sido reportada por el fabricante del kit. En cuanto a los valores de absorbancia obtenidos con el equipo Multiskan SkyHigh, las muestras evaluadas (plantas de campo y controles negativos) mostraron valores bajos (máximo de 0.1509). En comparación, las muestras positivas a ToBRFV arrojaron valores intermedios (0.3629), mientras que los controles positivos del kit mostraron valores considerablemente más altos (3.2336 y 3.4185), confirmando la correcta detección en estos controles y la ausencia del virus TMV en las muestras evaluadas.

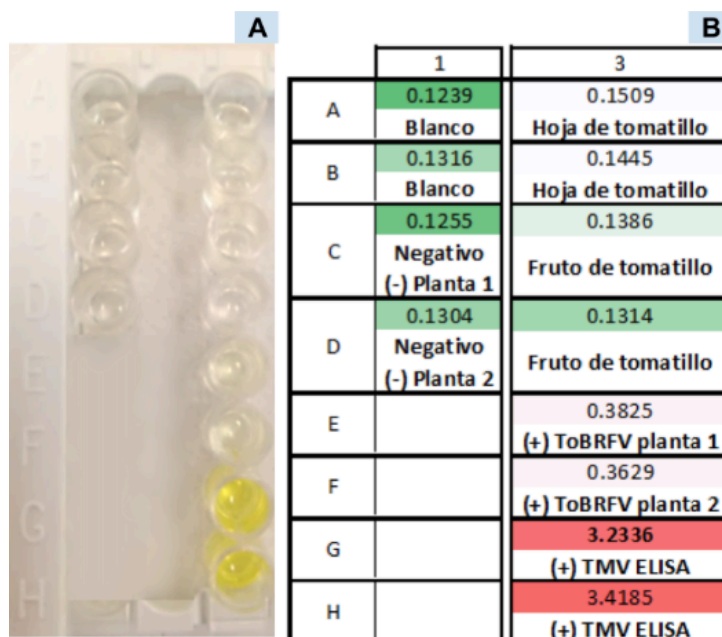


Figura 24. Prueba ELISA para TMV. (A) Resultados visuales. (B) Lectura de absorbancia a 405 nm con el equipo Multiskan SkyHigh.

En la segunda prueba ELISA (Figura 25), realizada con un kit específico para el virus ToBRFV, los resultados obtenidos mediante el mismo lector a 405 nm también mostraron diferencias claras entre los controles positivos y negativos.

Los controles negativos (blanco, negativo -planta 1 y 2) mantuvieron valores bajos de absorbancia, señalando la ausencia de infección, mientras que los positivos conocidos (ToBRFV de planta, + planta 1 y 2) presentaron valores elevados de absorbancia (entre 3.9 y 4.0) y una intensa coloración amarilla, confirmando la funcionalidad del sistema y la presencia del virus ToBRFV en dichos controles.

Las muestras analizadas de tejido foliar y de fruto de tomatillo mostraron valores bajos (0.1485 - 0.2009) y ausencia de coloración visible, por lo que no alcanzaron el umbral de positividad y se consideran negativas a la presencia del virus ToBRFV.



Figura 25. Prueba ELISA para ToBRFV. (A) Resultados visuales. (B) Lectura de absorbancia a 405 nm con equipo Multiskan SkyHigh.

La ausencia de detección de ToBRFV, TSWV, tobamovirus, potexvirus, potyvirus mediante RT-PCR, así como de ToBRFV y TMV mediante ELISA, sugiere que el agente causal podría corresponder a un virus no cubierto por los cebadores o anticuerpos utilizados, o bien estar presente en concentraciones inferiores a los límites de detección. Estos resultados subrayan la importancia de complementar el diagnóstico con técnicas no dirigidas, como la secuenciación metagenómica, para la identificación del patógeno responsable de la enfermedad.

Detección de partículas virales y su asociación con la enfermedad emergente

Para la detección de partículas virales en tomatillo, se empleó microscopía electrónica de transmisión (TEM), una técnica que permite la visualización directa de estructuras subcelulares con resolución nanométrica. Se analizaron extractos obtenidos de dos tipos de muestras: (1) tejido foliar y de fruto sintomático colectado de plantas M1, M3 y M4, proporcionado por agricultores del Valle de la Trinidad, y (2) tejido foliar recolectado de plantas inoculadas en la segunda réplica experimental de los ensayos de transmisión en condiciones controladas de invernadero, que desarrollaron síntomas compatibles con infección viral.

Las muestras fueron procesadas siguiendo el protocolo de extracción y purificación descrito previamente, que incluyó etapas de centrifugación diferencial y ultracentrifugación para eliminar restos celulares y concentrar las partículas virales. Posteriormente, se resuspendió en buffer TES 1X y se clarificaron antes de su preparación para TEM. El material concentrado se tiñó mediante contraste negativo con acetato de uranilo, lo que permitió mejorar la definición y el contraste de las partículas observadas. En las micrografías electrónicas se identificaron estructuras alargadas y rígidas distribuidas de manera uniforme sobre la superficie de las rejillas y con longitudes comprendidas entre 20 y 399 nm (Figuras 26 y 27). La morfología y dimensiones observadas son consistentes con las descritas para virus filamentosos que infectan solanáceas.

En las muestras de campo (Figura 26), las partículas presentaron una alta densidad y disposición heterogénea, en ocasiones agrupadas o superpuestas, lo que indica una fuerte acumulación viral en los tejidos foliares y de fruto. En contraste, las muestras derivadas de plantas inoculadas (Figura 27) mostraron partículas con morfología similar pero menor concentración, lo que demuestra la transmisión exitosa del agente infeccioso y su replicación en las plantas experimentales bajo condiciones controladas.

Estos resultados proporcionan evidencia directa de la presencia de partículas virales asociadas a la enfermedad emergente en el cultivo de tomatillo. La coincidencia en la morfología, tamaño y distribución entre las muestras de campo y las obtenidas en los ensayos de transmisión confirma la relación causal entre el agente viral observado y los síntomas característicos detectados en ambas etapas del estudio.

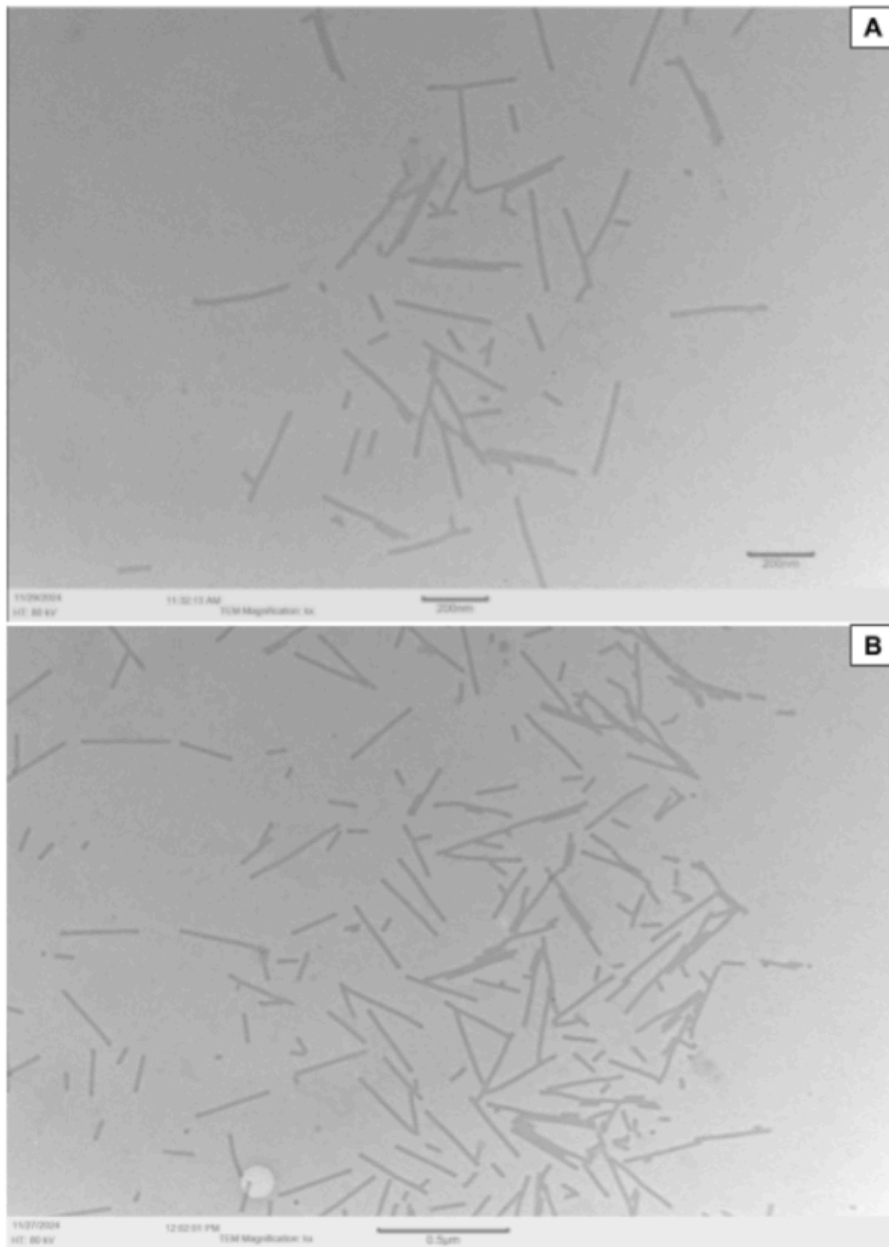


Figura 26. Imágenes TEM de partículas extraídas de plantas de campo M1, M3 y M4 (tejido foliar y de fruto sintomático). (A) Se observan partículas de morfología alargada y rígida, dispersas de manera uniforme sobre la superficie de la rejilla, con longitudes variables compatibles con partículas virales de tipo filamentosas. (B) En otro campo de la misma rejilla se aprecia una mayor concentración de partículas con características morfológicas similares, algunas de ellas agrupadas o superpuestas, lo que confirma la abundancia del agente viral en la muestra analizada.

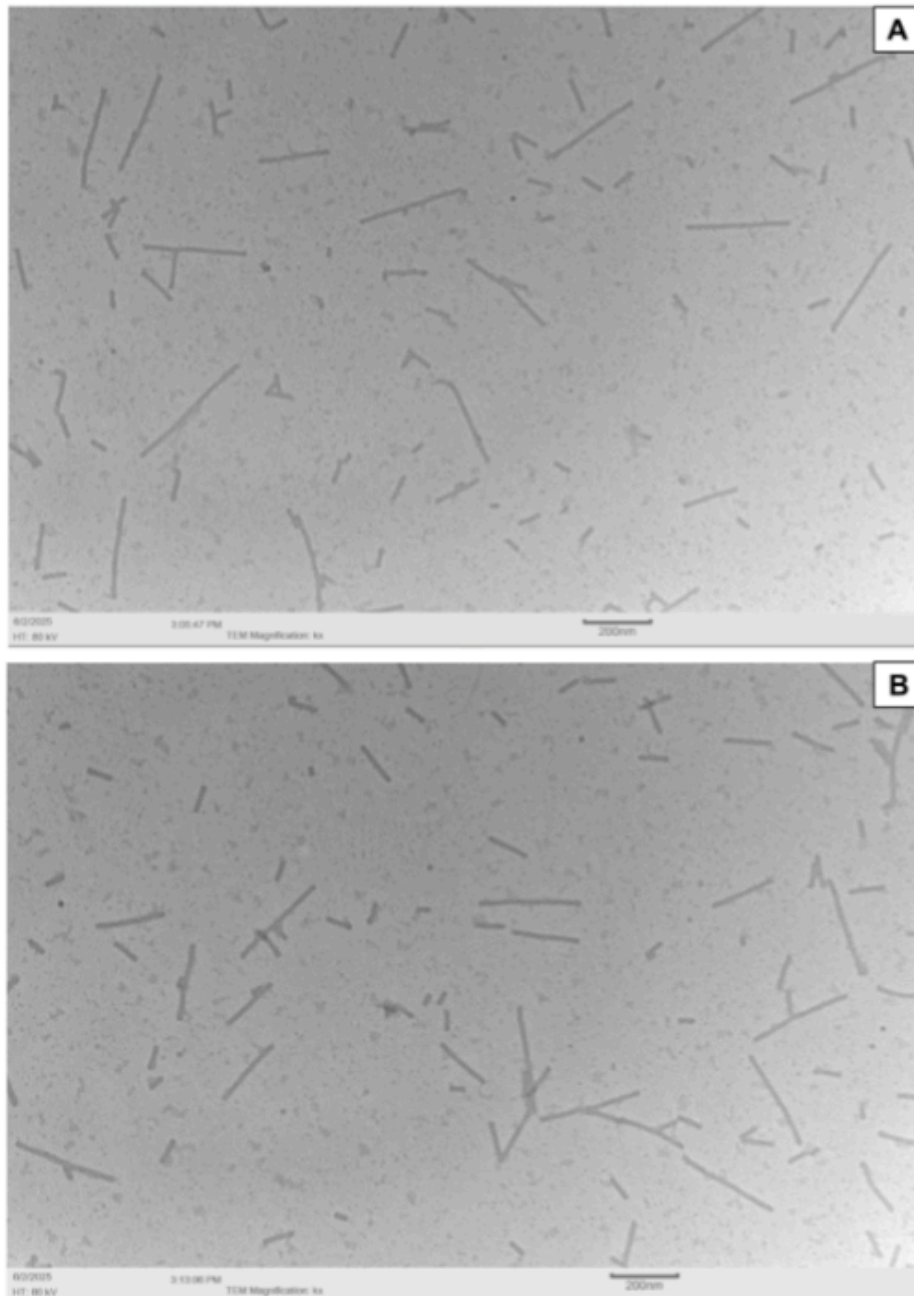


Figura 27. Imágenes TEM de partículas extraídas de tejido foliar proveniente de plantas inoculadas durante la segunda réplica de transmisión mecánica bajo condiciones controladas en invernadero. (A) Se observan partículas alargadas, flexuosas y dispersas de manera uniforme sobre el campo, con una orientación aleatoria y distribución homogénea, características compatibles con viriones filamentosos. (B) En otro campo de la misma rejilla se aprecia una concentración ligeramente mayor de partículas, manteniendo la misma morfología y patrón de distribución, lo que confirma la presencia consistente del agente viral en la muestra analizada.

A partir de las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), se cuantificó la longitud de 200 partículas virales en cada muestra utilizando el software ImageJ, generando un conjunto de datos representativo para caracterizar la morfología del agente. Este análisis permitió corroborar la homogeneidad morfológica observada visualmente en las imágenes TEM, evidenciando que la mayoría de las partículas presentan una estructura rígida y filamentosas.

Para representar objetivamente la distribución de tamaños de las partículas, se construyeron histogramas (Figuras 28 y 29) diferenciando entre plantas de campo (en morado) y plantas inoculadas en condiciones controladas mediante transmisión mecánica (en gris). Para garantizar que los histogramas reflejaran objetivamente la distribución de tamaños, los bins y rangos se determinaron mediante la regla de Freedman-Diaconis (Freedman y Diaconis, 1981). Esta regla calcula automáticamente el ancho de cada bin en función de la dispersión de los datos (IQR) y el tamaño de la muestra, evitando la arbitrariedad en la selección de intervalos y permitiendo una comparación objetiva entre diferentes conjuntos de partículas.

El análisis de los histogramas mostró diferencias sutiles en la distribución de tamaños entre las muestras. En el tejido compuesto (hoja y fruto) proveniente de campo, la mayoría de las partículas midieron entre 23 y 96 nm (Figura 28). En las hojas de plantas inoculadas en condiciones controladas se detectaron principalmente partículas de 26–100 nm, con una menor proporción en el rango intermedio de 101–174 nm (Figura 29). Estas diferencias podrían reflejar variaciones en la integridad del tejido procesado o leves efectos derivados de la preparación de las muestras.

A pesar de estas variaciones, el número de bins y la distribución general de tamaños fueron comparables entre ambas muestras. En ambos casos, se observaron picos concentrados en el rango más pequeño (23–100 nm), mientras que los rangos intermedios (101–174 nm) y grandes (175–397 nm) estuvieron menos representados. La presencia consistente de partículas rígidas en todas las muestras y la similitud en la distribución de tamaños respaldan la hipótesis de un agente viral común. Esta conclusión se refuerza con la detección repetida del virus en tejidos con distintos grados de severidad sintomática y en plantas inoculadas bajo condiciones controladas.

En conjunto, estos resultados proporcionan evidencia sólida de que el agente etiológico que afecta al cultivo de tomatillo en el Valle de la Trinidad es viral y transmisible por vía mecánica, contribuyendo al entendimiento de su morfología, distribución de tamaños y consistencia entre diferentes condiciones de infección.

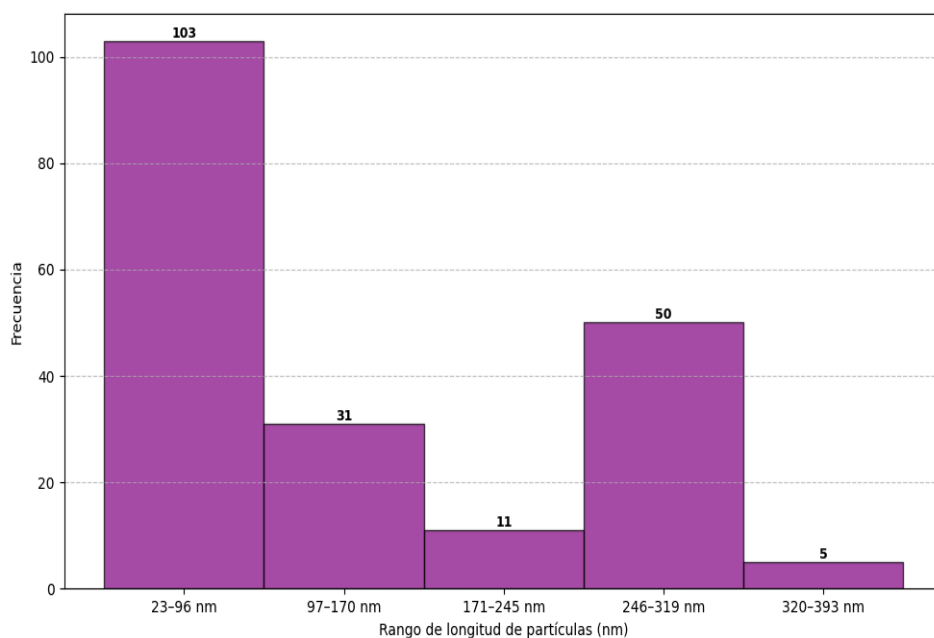


Figura 28. Histograma de longitudes de partículas detectadas en la muestra de tejido compuesto (hoja y fruto) de planta de campo.

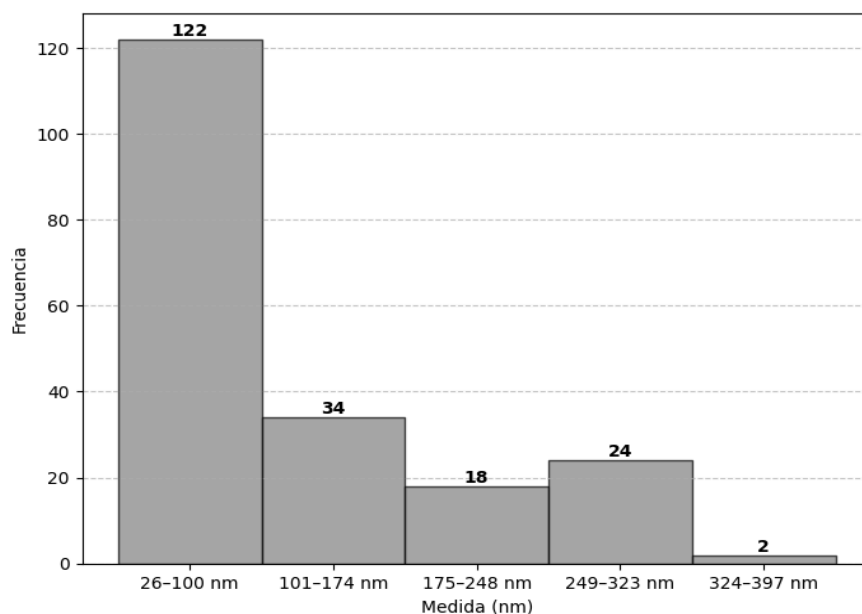


Figura 29. Histograma de longitudes de partículas en muestra de hoja de planta infectada en invernadero.

Con el fin de evaluar si las partículas rígidas y alargadas observadas mediante TEM correspondían a un agente viral transmisible del género *tobamovirus*, se realizó una RT-PCR, incluyendo el gen ribosomal 18S (Gambino et al., 2006) como control de calidad del RNA total. Los resultados se muestran en la Figura 30.

En la sección correspondiente a 18S (carriles 1–7), las muestras de tomatillo sano (T2 y T3), plantas con síntomas del Valle de la Trinidad (M1 y M4) y los controles positivos de tomate infectado con Tobamovirus (+1, +2 y +RNA) mostraron la banda esperada (~844 pb). Las fracciones de partículas virales enriquecidas (Part. tom y Part. inver.; carriles 8–9) no amplificaron 18S, lo cual se atribuye al protocolo de enriquecimiento que elimina RNA ribosomal de la célula.

En la sección de detección de Tobamovirus (carriles 11–21), los controles positivos generaron un amplicón de ~1 kb, mientras que las muestras de tomatillo y las fracciones de partículas virales no mostraron amplificación (carriles 13, 14, 18 y 19), continuando con el control negativo sin plantilla de cDNA (NTC; carril 21) que permaneció limpio, confirmando la ausencia de contaminación.

Estos resultados indican que las partículas no corresponden a un Tobamovirus detectable con estos cebadores, aunque su morfología y transmisibilidad sugieren otro virus filamentosos presente en las plantas de tomatillo del Valle de la Trinidad.

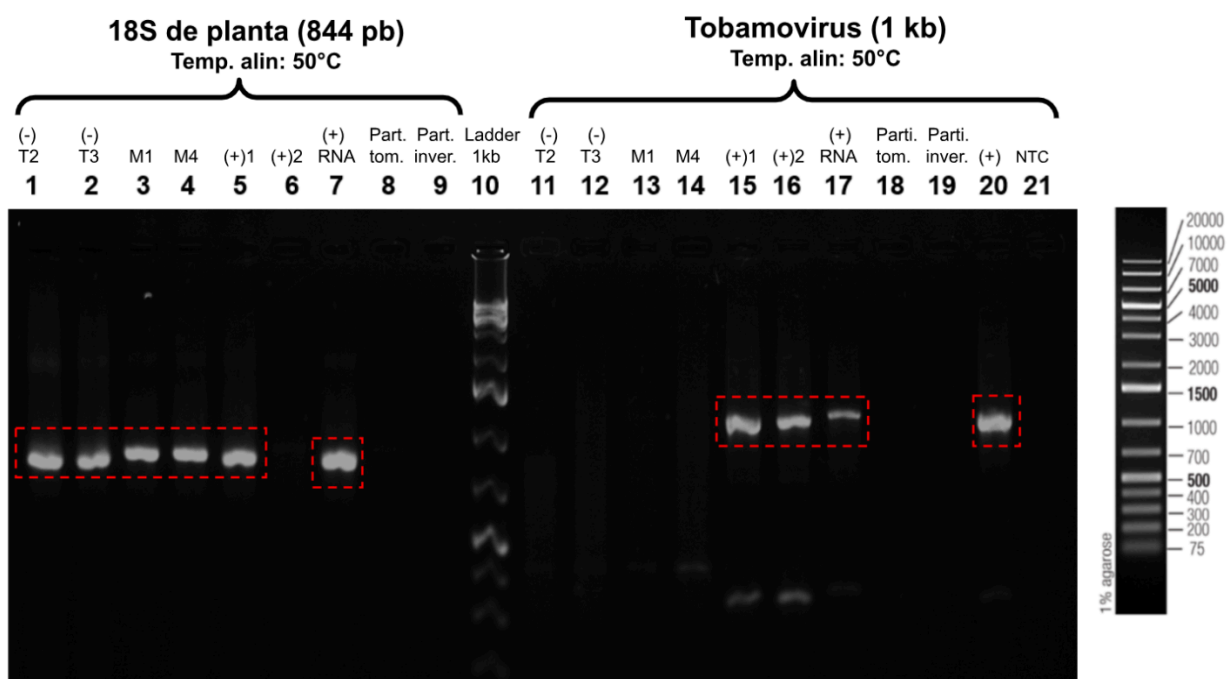


Figura 30. Resultados de RT-PCR para detección de 18S ribosomal y tobamovirus. Las muestras se analizaron en el mismo orden en ambas secciones del gel: tomate sano germinado de semilla libre de virus (T2 y T3; carriles 1-2 y 11-12), tomatillo con síntomas del Valle de la Trinidad (M1 y M4; carriles 3-4 y 13-14), controles positivos de tomate infectado con tobamovirus (+1, +2 y + RNA; carriles 5-7 y 15-17), fracciones de partículas virales de tomatillo y tomatillo infectado en invernadero (Part. tom y Part. inver.; carriles 8-9 y 18-19), seguidos del marcador molecular de 1 kb (Ladder 1kb; carril 10) y el control negativo sin plantilla (NTC; carril 21). Los carriles 1-9 corresponden a la amplificación del gen ribosomal 18S (~844 pb), mientras que los carriles 11-21 muestran la detección con cebadores para tobamovirus (~1 kb).

La observación de partículas rígidas y alargadas en TEM permitió plantear hipótesis respecto a su posible pertenencia a géneros de virus fitopatógenos que comparten estas características morfológicas, como se resume en la Tabla 6. La distribución de tamaños registrada en los histogramas mostró correspondencias con los rangos descritos en tobamovirus, tobavirus, furovirus, pomovirus y benyvirus, sin que sea posible atribuir de manera concluyente a un género particular con los estudios realizados hasta aquí, la identificación específica requiere estudios moleculares complementarios.

Tabla 6. Posibles géneros virales de las partículas observadas en tomatillo mediante TEM.

Género (Familia)	Morfología reportada	Rango de tamaño (nm)	Tamaño de genoma (kb)	Coincidencia con partículas observadas en TEM	Facilidad de transmisión mecánica	Transmisión/ Vector asociado
<i>Tobamovirus</i> (<i>Virgariidae</i>)	Varillas rígidas segmentadas	300-310	3 - 6.5 kb	300 nm	Muy alta y eficiente	Contacto mecánico, semillas
<i>Tobravirus</i> (<i>Virgariidae</i>)	Varillas rígidas segmentadas	46-115 (RNA 1) 180-215 (RNA 2)	6.8 y 4.5 kb	50-89 y 90-209 nm	Muy alta y eficiente	Nematodos del suelo (<i>Trichodorus</i> y <i>Paratrichodorus</i>)
<i>Furovirus</i> (<i>Virgariidae</i>)	Varillas rígidas segmentadas	140-160 (RNA 1) 260-300 (RNA 2)	6-7 kb y 3.5-3.6 kb	210 a 300 nm	Posible, pero ineficiente	Hongos del suelo (<i>Polymyxa graminis</i>)
<i>Pomovirus</i> (<i>Virgariidae</i>)	Varillas rígidas segmentadas	65-80 (RNA 1) 150-160 (RNA 2) 290-310 (RNA 3)	6, 3.5 y 3 kb	60-89 nm y algunas >290 nm	Posible, pero ineficiente	Protista del suelo (<i>Spongospora subterranea</i>)
<i>Benyvirus</i> (<i>Benyviridae</i>)	Varilla rígidas segmentadas	Longitudes predominantes; 85 (RNA 1) 100 (RNA 2) 265 (RNA 3) 390 (RNA 4)	Los cuatro o cinco segmentos tienen un tamaño entre 1.3 y 6.7 kb	90-209, 210-399 nm	Difícil	Parásito fúngico del suelo, no se han identificado vectores insectiles

Nota: Tabla elaborada con base en los rangos de tamaño en la literatura (Hull, 2014) y en la comparación con las longitudes de partículas observadas en este trabajo. La información constituye un análisis preliminar para plantear hipótesis sobre el agente causal de la enfermedad emergente en tomatillo.

Discusión

Síntomas en campo

Durante las visitas al Valle de la Trinidad se observaron síntomas inusuales y severos en cultivos de tomatillo (*Physalis ixocarpa*), caracterizados por clorosis, anillos concéntricos, enrollamiento foliar y frutos blandos con decoloración. Estos cuadros sintomatológicos son consistentes con los descritos para infecciones virales en solanáceas (Dikova, 2019), aunque presentaron particularidades en la severidad del daño en los frutos. Los productores locales reportaron pérdidas económicas directas debido a la fragilidad de los frutos y la rápida propagación de los síntomas, lo que limitó su comercialización. Este tipo de observaciones en campo, junto con la información obtenida de los agricultores, permite contextualizar el impacto potencial del agente causal, no solo desde el punto de vista biológico, sino también en términos de riesgo para la seguridad alimentaria y la sustentabilidad de las comunidades rurales.

Ensayos de transmisión mecánica

Los ensayos corroboraron la naturaleza infecciosa del agente, ya que reprodujeron síntomas similares a los observados en campo, principalmente en tejido foliar. Un aspecto relevante fue el registro detallado de las fechas de siembra, germinación e inoculación, lo que permitió relacionar la aparición de síntomas con las condiciones ambientales, como la temperatura, por ejemplo la fecha de trasplante e inoculación se determinó en función del desarrollo de las plántulas, la cual dependió de ella: a mayor temperatura, las semillas germinaban y las plántulas crecían más rápido, permitiendo realizar estas etapas en menos días. En las distintas réplicas, las plántulas fueron trasplantadas e inoculadas entre 20 y 31 días post-siembra (dps), según el ritmo de crecimiento y las condiciones climáticas de cada réplica.

Las réplicas del bioensayo se realizaron en diferentes estaciones del año, donde se registraron temperaturas promedio de 27°C en la primera réplica, 23.1 °C en la segunda y 25°C en la tercera (dentro del invernadero). El hecho de que la manifestación de síntomas fuera más rápida en la primera réplica sugiere que temperaturas más elevadas favorecen la replicación viral y la expresión sintomatológica, en concordancia con reportes que señalan que la temperatura puede modular tanto la tasa de infección como la severidad de los síntomas en virosis de plantas (Gutiérrez-Sánchez et al., 2023).

Además, el efecto dosis-dependiente entre extracto puro y diluido (1:50) refuerza la hipótesis de que el agente posee alta estabilidad y capacidad infectiva, lo que lo convierte en un riesgo potencial para cultivos en ambientes variables. En la tercera réplica, el extracto diluido mostró síntomas leves pero presentes en todas las plantas, mientras que en el extracto puro los síntomas fueron más marcados pero

solo en algunas plantas, evidenciando que la concentración del inóculo influye en la severidad de la enfermedad, esta diferencia se reflejó estadísticamente, siendo el tratamiento diluido significativamente diferente de los controles.

Análisis estadístico del crecimiento

El análisis estadístico mediante ANOVA mostró diferencias significativas en altura y longitud foliar entre tratamientos, lo que sugiere que la reducción en el crecimiento podría estar asociada a la aplicación del extracto infeccioso, más que a factores aleatorios. Posteriormente, la prueba de Tukey permitió identificar que tanto el extracto puro como la dilución 1:50 difirieron significativamente de los controles, lo que indica un posible efecto fisiológico del inóculo en las plantas. Estos resultados concuerdan con lo reportado en otras solanáceas, como tomate y chile, donde infecciones virales se asocian con reducciones en parámetros morfológicos y de rendimiento (Scholthof et al., 2011).

Pruebas moleculares y serológicas

El uso de primers dirigidos a virus comúnmente asociados a solanáceas (ToBRFV, TSWV, tobamovirus, potexvirus y potyvirus) no permitió amplificación detectable, mientras que las pruebas ELISA contra antígenos de virus conocidos (TMV y ToBRFV) resultaron igualmente negativas. Estos resultados plantean la posibilidad de que el agente causal de la enfermedad emergente no pertenezca a los grupos virales más frecuentemente reportados, o que se trate de una variante altamente divergente que escapa a la detección por métodos convencionales. Cabe señalar que la RT-PCR depende de la complementariedad exacta entre los primers y el genoma viral, por lo que agentes emergentes o con secuencias divergentes pueden pasar inadvertidos (Mumford et al., 2016). Del mismo modo, la sensibilidad de ELISA se ve limitada por la disponibilidad de anticuerpos específicos, lo que restringe su capacidad para detectar patógenos desconocidos (Clark y Adams, 1977). En este sentido, la ausencia de detección mediante técnicas dirigidas enfatiza la necesidad de complementar el diagnóstico con aproximaciones no dirigidas, como la secuenciación masiva (NGS) y la metagenómica, ampliamente utilizadas en la identificación de virus emergentes en cultivos de importancia agrícola (Roossinck, 2015).

Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La observación mediante TEM constituyó un punto clave en la caracterización preliminar del agente. La micrografía de la Figura 26 corresponde al resultado de múltiples observaciones previas, en las cuales fue necesario optimizar tanto el procedimiento de extracción de partículas virales como la cantidad de muestra empleada para la preparación de la rejilla, estableciéndose una concentración óptima de 0.8 ng/ μ L. En las muestras originales enviadas por los agricultores, así como en las plantas amplificadas

mediante ensayos de transmisión (cumpliendo los postulados de Koch-Rivers), se observaron partículas filamentosas de morfología consistente con virus de genoma de RNA de plantas. La confirmación de partículas tanto en muestras de campo como en plantas inoculadas en invernadero reduce la posibilidad de que la sintomatología sea producto de factores abióticos o contaminantes, y apoya firmemente la hipótesis de un virus como agente causal.

El análisis de las longitudes observadas en las partículas mostró varios rangos: 23-100 nm, 101-174 nm, 175-248 nm, 249-323 nm y 324-397 nm. Inicialmente se intentó definir los intervalos de manera manual mediante rangos equimolares, buscando que cada bin contuviera aproximadamente el mismo número de partículas, sin embargo, debido a la dispersión de los datos, este enfoque no permitió definir claramente la población completa de partículas. Por ello, los histogramas se construyeron siguiendo la regla de Freedman-Diaconis (Freedman y Diaconis, 1981), lo que permitió establecer los bins de manera objetiva y reproducible. Esta metodología facilitó la comparación de los picos observados experimentalmente con los tamaños reportados en la literatura de virus de varilla de plantas, incluyendo tobamovirus, tobavirus, pomovirus, furovirus y benyvirus, cuyos rangos reportados coinciden con los picos observados experimentalmente (Hull, 2014). Todos estos virus poseen genoma de RNA y presentan capacidad de transmisión mecánica, aunque difieren en su eficiencia de transmisión natural y en sus vectores asociados. Por ello, la identidad del virus deberá confirmarse mediante estudios moleculares posteriores.

La validación molecular de las fracciones de partículas aportó evidencia complementaria. En dichas fracciones no se detectó amplificación del gen de referencia 18S, como era esperado debido a que el protocolo de enriquecimiento elimina RNA ribosomal y favorece la recuperación de partículas virales. Asimismo, los cebadores generales dirigidos a tobamovirus no generaron amplificación en las fracciones, aunque sí en los controles positivos. Este resultado no descarta la pertenencia del agente al género Tobamovirus, sino que sugiere una posible variante con divergencia suficiente para evadir la detección con los cebadores utilizados.

La persistencia de partículas en múltiples ciclos de inoculación sugiere que el agente es estable y capaz de mantener su infectividad bajo condiciones controladas. Este hallazgo es relevante, ya que indica que la enfermedad emergente puede dispersarse eficientemente en cultivos de tomatillo y representa un riesgo potencial para la producción regional y nacional, no solo la del Valle de la Trinidad.

Conclusiones

La enfermedad emergente que afecta al cultivo de tomatillo (*Physalis ixocarpa*) en el Valle de la Trinidad está asociada con un agente infeccioso viral transmisible por vía mecánica, capaz de alterar significativamente el crecimiento vegetal, tanto en altura como en elongación foliar. La reproducción experimental de los síntomas, consistente con los observados en campo, confirma la naturaleza biológica del agente y su capacidad para afectar de manera directa la salud de las plantas.

La ausencia de detección de virus comunes mediante RT-PCR y ELISA, junto con la observación de partículas filamentosas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) en muestras independientes, indica que el agente corresponde a un virus emergente o a un virus previamente no caracterizado en esta especie de planta. Esta evidencia resalta la necesidad de implementar enfoques metagenómicos para la identificación precisa del agente, así como estudios complementarios sobre su biología, rango de hospedantes, mecanismos de transmisión y persistencia en semillas o tejidos vegetales.

Los hallazgos de este estudio tienen importantes implicaciones prácticas y científicas. En términos de manejo agrícola, el conocimiento de la transmisibilidad mecánica y la alta estabilidad del agente permite anticipar riesgos de propagación en cultivos, enfatizando la importancia de estrategias preventivas y vigilancia fitosanitaria continua. Desde un enfoque científico, el estudio contribuye al entendimiento de enfermedades emergentes en solanáceas y amplía la base de datos sobre virus vegetales en la región, ofreciendo evidencia concreta que puede orientar investigaciones futuras sobre resistencia varietal y métodos de mitigación del impacto de patógenos virales emergentes.

Finalmente, este trabajo muestra la relevancia de fortalecer programas de monitoreo y manejo integrado de enfermedades en cultivos regionales, especialmente en zonas vulnerables al cambio climático ya que, como se observó en este trabajo, la sintomatología de la enfermedad se agudiza conforme aumenta la temperatura. Los resultados obtenidos no solo aportan información valiosa para la protección del tomatillo en Baja California, sino que también sientan las bases para estudios posteriores que permitan comprender mejor la dinámica de enfermedades emergentes y garantizar la sostenibilidad de los sistemas agrícolas locales.

Relevancia y proyecciones

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran la presencia de un agente infeccioso, estable y transmisible, capaz de inducir síntomas consistentes y reducir significativamente el crecimiento del tomatillo (*P. ixocarpa*). La combinación de observaciones en campo, interacción con productores, ensayos de transmisión mecánica, análisis estadístico, pruebas moleculares y TEM proporciona un marco integral para el estudio de enfermedades emergentes en cultivos de importancia económica. Estos hallazgos no solo permiten dimensionar el problema actual, sino que también orientan futuras investigaciones hacia la identificación molecular precisa del virus, el análisis de su epidemiología y la implementación de estrategias de manejo fitosanitario preventivas. La aplicación de metodologías de secuenciación de nueva generación y estudios de variabilidad genética serán esenciales para determinar la identidad del agente y diseñar herramientas diagnósticas específicas que permitan proteger la producción de tomatillo en Baja California y evitar su diseminación a otras regiones agrícolas del país.

Referencias

Chapman, S.N. (1998). Tobamovirus Isolation and RNA Extraction. In: Foster, G.D., Taylor, S.C. (eds) *Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology™*, vol 81. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-385-6:123>

Clark, M. F., y Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34(3), 475–483. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-34-3-475>

Díaz, Acela, Quiñones, Madelaine, Arana, Franklyn, Soto, Marianela, y Hernández, Annia. (2010). Potyvirus: Características generales, situación de su diagnóstico y determinación de su presencia en el cultivo del pimiento en Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 25(2), 69-79. Recuperado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522010000200001&lng=es&tlng=es.

Díaz-Pendón, J. A., Cañizares, M. C., Moriones, E., Bejarano, E. R., Czosnek, H., y Navas-Castillo, J. (2010). Tomato yellow leaf curl viruses: ménage à trois between the virus complex, the plant and the whitefly vector: Tomato yellow leaf curl viruses. *Molecular Plant Pathology*, 11(4), 441–450. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00618>

Dijkstra, J., y de Jager, C. P. (1998). Virus inoculation: Mechanical inoculation of plants. En *Practical Plant Virology: Protocols and Exercises* (pp. 1–3). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-72030-7>

Dikova, B. (2019). Virus diseases on some vegetable fruits from Solanaceae family. *Rasteniievadni Nauki = Bulgarian Journal of Crop Science*, 56(2), 31–36.

Feng, Y., Krueger, E. N., Liu, S., Dorman, K., Bonning, B. C., & Miller, W. A. (2017). Discovery of Known and Novel Viral Genomes in Soybean Aphid by Deep Sequencing. *Phytobiomes Journal*, 1(1), 36–45. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-11-16-0013-R>

Freedman, D., & Diaconis, P. (1981). On the histogram as a density estimator: L2 theory. *Zeitschrift für Wahrscheinlichkeitstheorie und Verwandte Gebiete*, 57, 453–476.

Gambino, G. y Gribaudo, I. (2006). Simultaneous detection of nine grapevine viruses by reverse transcription-polymerase chain reaction with co-amplification of a plant RNA as internal control. *Virology*, 96, 1223–1229.

Gambino, G., Perrone, I., y Gribaudo, I. (2008). A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19(6), 520–525. <https://doi.org/10.1002/pca.1078>

Gutiérrez-Sánchez, Á., Cobos, A., López-Herranz, M., Canto, T., y Pagán, I. (2023). Environmental conditions modulate plant virus vertical transmission and survival of infected seeds. *Phytopathology*, 113(9), 1773–1787. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-11-22-0448-V>

Hull, R. (2002). *Matthews' Plant Virology*, 4th ed. Academic Press, London, 1001 pp.

Hull, R. (2014). *Plant virology* (5th ed.). Academic Press. ISBN: 978-0-12-384871-0.

Llave, C. Ayllón, M. Á. y Cambra, M. (2018). *Enfermedades de plantas causadas por virus y viroides*: (ed.). Madrid, Spain: Bubok Publishing S.L. Recuperado de <https://libcon.rec.uabc.mx:2321/es/ereader/uabc/51447?page=1>.

Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., et al. (2017). A new Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-22 resistance genes. *PLoS ONE*, 12(1), e0170429.

Mink, G. I. 1993. Pollen and seed transmitted viruses and viroids. *Annu. Rev. Phytopathol.* 31:375-402

Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., y Barker, I. (2006). Advances in molecular phytodiagnostics: New solutions for old problems. *European Journal of Plant Pathology*, 116(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9037-0>

Oliver, R. (Ed.). (2024). *Agrios' plant pathology*. Elsevier.

Rivers T. M. (1937). Viruses and Koch's Postulates. *Journal of bacteriology*, 33(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/jb.33.1.1-12.1937>

Roossinck, M. J., Martin, D. P., y Roumagnac, P. (2015). Plant virus metagenomics: Advances in virus discovery. *Phytopathology*, 105(6), 716–727. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW>

Sánchez, M.-A., Villegas-Estrada, B., y Valencia-Jiménez, A. (2021). Evaluación de métodos para la inoculación y diagnóstico del virus del mosaico del pepino (CMV). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19(1), 92-104. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(19\)92-104](https://doi.org/10.18684/bsaa(19)92-104)

Santos-Cervantes, M. E., Arévalo-Rivas, B., Ramírez-Rodríguez, L., y Holguín-Peña, R. J. (2007). Epidemiology of geminivirus diseases in Mexico and strategies for control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(1), 45-58.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. 2012 Jun 28;9(7):676-82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

Scholthof, K. B., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., y Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>

SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). (2017-2022). Producción agrícola de México: Análisis de los principales cultivos hortícolas. Recuperado de <https://www.gob.mx/siap>

SIAP-SAGARPA. (2015). Recuperado el 17 de marzo de 2025, de https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/

Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L. (2007). Introducción a la microbiología. Argentina: Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-0740-7

Tsompana, M., y Moyer, J. W. (2008). Tosspovirus. En B. W. J. Mahy y M. H. V. Van Regenmortel (Eds.), Encyclopedia of virology (3^a ed., pp. 157–163). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012374410-4.00517-3>

Van der Vlugt, R. A. A., y Berendsen, M. (2002). Development of a general Potexvirus detection method. European Journal of Plant Pathology, 108(4), 367–371.

Wang, D., Maule, A.J. 1992. Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of *Pea borne mosaic virus*. J. Gen. Virol 73:1614-1620

Zamboni, A., Pierantoni, L., y De Franceschi, P. (2008). Total RNA extraction from strawberry tree (*Arbutus unedo*) and several other woody-plants. iForest-Biogeosciences and Forestry, 1(4), 122.

Zhang, S., Griffiths, J. S., Marchand, G., Bernards, M. A., y Wang, A. (2022). Tomato brown rugose fruit virus: An emerging and rapidly spreading plant RNA virus that threatens tomato production worldwide. Molecular Plant Pathology, 23(9), 1262-1277. <https://doi.org/10.1111/mpp.13229>

Zheng, L., Rodoni, B. C., Gibbs, M. J., y Gibbs, A. J. (2010). A novel pair of universal primers for the detection of potyviruses. Plant Pathology, 59(2), 211–220.