

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



EVALUACIÓN DE PÉRDIDAS CAUSADAS POR ToBRFV EN TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.) BAJO INVERNADERO

Tesis

Que presenta UBILFRIDO VASQUEZ GUTIERREZ

como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

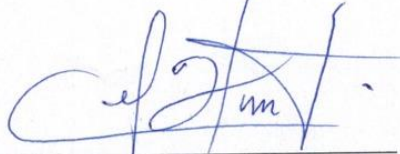
Saltillo, Coahuila

Julio 2024

EVALUACIÓN DE PÉRDIDAS CAUSADAS POR ToBRFV EN TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.) BAJO INVERNADERO

Tesis

Elaborada por UBILFRIDO VASQUEZ GUTIERREZ como requisito parcial para
obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



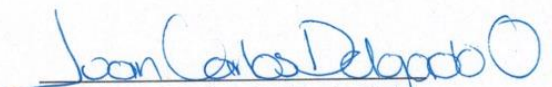
Dr. Gustavo Alberto Frías Treviño
Director de Tesis



Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe
Asesor



Dr. Alberto Flores Olivas
Asesor



Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz
Asesor



Dr. Antonio Flores Naveda
Subdirector de Postgrado
UAAAN

Saltillo, Coahuila

Julio 2024

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por brindarme hospitalidad, apoyo y oportunidad para forjar mis estudios de Licenciatura. Al Departamento de Parasitología Agrícola, por poner a mi disposición las herramientas necesarias para emprender mi carrera profesional y por la disponibilidad en tiempo de pandemia, para realizar mis estudios de investigación.

A mi asesor principal, el Dr. Gustavo Alberto Frías Treviño, por su comprensión, apoyo incondicional para la ejecución de este proyecto de investigación.

A mi comité de asesoría: El Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz, el Dr. Alberto Flores Olivas y el Dr. Luis Alberto Aguirre Uribe.

Al Ing. Héctor Quiñones-Dena, y al Lic. Gustavo Frías Díaz (Ito) por su amistad incondicional y apoyo en actividades dentro de la ejecución del proyecto. A mis excompañeros de trabajo de la U.I. SERVESA A.C. por su cálida amistad y compañerismo.

Al Dr. Agustín, por sus enseñanzas, apoyo, cátedras y consejos durante mi estancia en el Postgrado.

A mi amigo Sergio Hernández Téllez por su apoyo en mis momentos complicados.

Al Dr. Henry López-López y Cristina Sánchez por su apoyo en actividades académicas dentro de los trabajos realizados en el proyecto.

A mis padres Floriberto Vasquez y Gisela Gutierrez por apoyarme en los momentos difíciles durante mi trayectoria.

A papá Dios, por no dejarme recaer en los malos momentos, y por esta grande oportunidad de ser mejor cada día.

DEDICATORIAS

A mi esposa: Fatima Hernández-Hernández♥, por su amor y apoyo incondicional durante mi estancia en el Postgrado.

A mi hija: Zoe Naiara, por ser el promotor principal para mi vida♥

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN	1
Justificación	3
Objetivos	3
Hipótesis	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Importancia económica del tomate en México	4
Importancia del ToBRFV	5
Caracterización y Taxonomía del ToBRFV	5
Distribución.....	6
Transmisión ToBRFV	8
Epidemiología de ToBRFV	8
Gradiente de dispersión y de enfermedad	10
Sintomatología.....	10
Técnicas de diagnóstico.....	11
Estudios de pérdidas ocasionados por Tobamovirus.....	12
Pérdidas por ToBRFV	13
Estrategias para el manejo del ToBRFV	14
Uso de Inhibidores de la transmisión mecánica.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Localización de la experimentación	18
Aislamiento e identificación del ToBRFV.....	18
Detección del tomato brown rugose fruit virus	19
Determinación de la concentración de dióxido de cloro	20
Evaluación del Dióxido de cloro como inhibidor de la transmisión mecánica	21

Evaluación del gradiente de infección (replicación).....	23
Evaluación de variables agronómicas	23
Efecto del ClO ₂ en la replicación de ToBRFV bajo invernadero.....	24
Evaluación de variables agronómicas	24
Evaluación de la concentración viral medida en DAS-ELISA	25
Ajuste de un modelo para la estimación de pérdidas en rendimiento en plantas de tomate cultivadas en invernadero y cielo abierto (50 dpi)	26
Expresión de lesiones locales en hojas de <i>Nicotiana longiflora</i>	26
Estimación de lesiones a partir de concentración viral	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
Descripción e identificación de aislados del ToBRFV	28
1. Concentración del Dióxido de cloro para controlar ToBRFV.....	31
2. Efecto de la aplicación del ClO ₂ en la transmisión y concentración de ToBRFV, en plantas de tomate cultivadas a cielo abierto	34
3. Efecto de la aplicación del Dióxido de cloro en la concentración del ToBRFV en plantas de tomate inoculadas en invernadero	37
3.1. Efecto del ToBRFV en los parámetros agronómicos de plantas de tomate cultivado en invernadero	41
3.2. Efecto del ToBRFV en parámetros agronómicos de plantas de tomate cultivado a cielo abierto	43
3.3. Estimación de pérdidas en rendimiento de plantas de tomate cultivadas a cielo abierto (50 dpi).....	45
3.5. Lesiones locales producidas por ToBRFV	47
3.6. Estimación de lesiones locales necróticas ante la infección de ToBRFV	48
CONCLUSIONES	51
REFERENCIAS	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos utilizar para determinar la concentración de ClO ₂ a utilizar en ensayos posteriores.....	21
Tabla 2. Distribución de tratamientos evaluados para evaluar el dióxido de cloro como inhibidor de la transmisión mecánica en campo abierto.....	22
Tabla 3. Evaluación externa de la infección y confirmación del ToBRFV en las muestras.	30
Tabla 4. Tratamientos evaluados para determinar la concentración ClO ₂ efectiva para reducir lesiones locales necróticas por ToBRFV en hojas de <i>Nicotiana longiflora</i>	32
Tabla 5. Descripción general de la carga estimada de ToBRFV mediante D.O. 405nm y qELISA.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas en hojas y frutos por la infección de ToBRFV en plantas de tomate.....	28
Figura 2. Métodos de diagnóstico de la infección por ToBRFV en plantas de tomate.....	29
Figura 3. Efectividad del dióxido de cloro contra ToBRFV.....	33
Figura 4. Gradiente de infección por la aplicación del ClO ₂ en la transmisión y concentración de ToBRFV, en plantas de tomate cultivadas a cielo abierto. ...	35
Figura 5. Diferentes síntomas expresados en frutos cosechados de tomates inoculados con diluciones de ToBRFV con y sin aspersión del dióxido de cloro bajo condiciones campo abierto.....	37
Figura 6. Efecto de la aplicación del dióxido de cloro en la concentración del ToBRFV en plantas de tomate cultivadas en invernadero.	39
Figura 7. Diferentes síntomas expresados en frutos cosechados de tomate inoculados con diluciones de ToBRFV, con y sin aspersión del dióxido de cloro bajo condiciones de invernadero.	41
Figura 8. Efecto de ToBRFV en parámetros agronómicos de tomate con aspersiones de dióxido de cloro, en plantas inoculadas con diferentes diluciones virales bajo invernadero (1×10^{-3} a 1×10^{-5}).....	42
Figura 9. Efecto del ToBRFV con aspersiones de dióxido de cloro en tomate cultivado a cielo abierto.	44
Figura 10. Ajuste del modelo Berger para la estimación de pérdidas en rendimiento a partir de la concentración viral con la aspersión de dióxido de cloro (50 dpi) en campo abierto.	46
Figura 11. Modelo Monomolecular para la estimación de pérdidas en rendimiento a partir de la concentración viral en plantas de tomate cultivadas en invernadero cloro (50 dpi) bajo invernadero.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 12. Cuantificación de ToBRFV a partir de lesiones locales necróticas en plantas de <i>N. longiflora</i> , con la aplicación del ClO ₂	47

Figura 13. Modelo exponencial para la estimación de cuantificación de lesiones locales ante el efecto de ToBRFV.....	48
---	----

RESUMEN

VALUACIÓN DE PÉRDIDAS CAUSADAS POR ToBRFV EN TOMATE
(*Solanum lycopersicum* L.) BAJO INVERNADERO

POR

UBILFRIDO VASQUEZ GUTIERREZ

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DR. GUSTAVO ALBERTO FRÍAS TREVIÑO- ASESOR

Saltillo, Coahuila

Julio, 2024

RESUMEN

Se establecieron tres experimentos por separado. En el primero, se determinó la concentración de ClO_2 adecuada a utilizar. Para esto se inocularon mecánicamente plantas de *Nicotiana longiflora* con un extracto infectivo en solución amortiguadora de fosfatos (SAF) a 1:10 p/v (pH 8). 10 minutos posteriores a la inoculación se asperjaron con 100 a 6080 ppm de ClO_2 . Se contabilizó el número de lesiones locales necróticas (LLN) y se evaluó la fitotoxicidad 10 días posterior a la inoculación (dpi). La concentración de 760 ppm no causó fitotoxicidad y redujo en un 95.9% las LLN a comparación del control no tratado. En el segundo ensayo se inocularon plantas de tomate Yüksel 172-300 F1 con diluciones en el rango 1×10^{-3} a 1×10^{-5} y se asperjaron con 760 ppm de ClO_2 un dpi. La densidad óptica en prueba de ELISA (DO) utilizando savia de las plantas de tomate, se redujo entre 74.31-61.08% cuando se asperjaron con ClO_2 a 760 ppm. El rendimiento de las plantas inoculadas se redujo conforme se incrementó la DO en hojas muestreadas 50 dpi. En otro experimento en campo abierto. Se sembraron ocho surcos de 15 m de largo con plantas de tomate. La planta ubicada en uno de los extremos de cada surco se inoculó con savia preparada a 1:10 p/v, 0.01 M, pH 8 y sirvió como fuente de inóculo (FI). 12 dpi y cada vez que las plantas se manejaron (tres veces por semana), se asperjó ClO_2 (Oxiplant) a 760 ppm en cuatro de los 8 surcos plantados. Se realizaron 21 aplicaciones, hasta la primera cosecha de tomate. 50 dpi se tomaron muestras de hojas en las plantas ubicadas a 1.5, 3, a 15 m de la FI para medir la concentración del ToBRFV en savia mediante DO. También se evaluó el rendimiento en cada distancia. Se observó un gradiente de reducción de la concentración viral en la savia de las plantas conforme se incrementó la distancia de la FI. La DO 50 dpi fue menor en las plantas asperjadas con ClO_2 y aumentó el rendimiento. Nuestros resultados demuestran que, bajo condiciones de invernadero y campo abierto, el dióxido de cloro reduce 80.21-69.87% la DO (concentración del virus en savia) en plantas asperjadas con 760 ppm ClO_2 e incrementa 40-50% su rendimiento.

Palabras clave: concentración viral, enfermedad emergente, pérdidas.

ABSTRACT

EVALUATION OF LOSSES CAUSED BY ToBRFV IN TOMATO (*Solanum lycopersicum* L.) UNDER GREENHOUSING

BY

UBILFRIDO VASQUEZ GUTIERREZ

MASTER OF SCIENCE IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

PhD. GUSTAVO ALBERTO FRÍAS TREVIÑO- ADVISOR

Saltillo, Coahuila

July, 2024

ABSTRACT

Three separate experiments were established. In the first, the appropriate ClO_2 concentration to be used was determined. For this purpose, *Nicotiana longiflora* plants were mechanically inoculated with an infective extract in phosphate buffered solution (PBS) at 1:10 w/v (0.01 M, pH 8). Ten minutes after inoculation, they were sprayed with 100 to 6080 ppm ClO_2 . The number of necrotic local lesions (NLL) was counted and phytotoxicity was assessed 10 days post inoculation (dpi). The concentration of 760 ppm did not cause phytotoxicity and reduced NLL by 95.9% compared to the untreated control. In the second trial, Yüksel 172-300 F1 tomato plants were inoculated with dilutions in the range 1×10^{-3} to 1×10^{-5} and sprayed with 760 ppm ClO_2 one dpi. The optical density in ELISA test (OD) using sap from tomato plants was reduced by 74.31-61.08% when sprayed with ClO_2 a 760 ppm. The yield of inoculated plants decreased as OD increased in leaves sampled at 50 dpi. In another open field experiment. Eight 15 m long furrows were planted with tomato plants. The plant located at one end of each furrow was inoculated with prepared sap at 1:10 w/v, 0.01 M, pH 8 and served as inoculum source (IS). 12 dpi and each time the plants were handled (three times per week), ClO_2 (Oxi-plant) was sprayed at 760 ppm in four of the 8 planted furrows. Twenty-one applications were made until the first tomato harvest. Leaf samples were taken at 50 dpi from plants located at 1.5, 3, to 15 m from the IF to measure ToBRFV concentration in sap by OD. Yield was also evaluated at each distance. A gradient of decreasing viral concentration in plant sap was observed as the distance from the IS increased. OD 50 dpi was lower in plants sprayed with ClO_2 and yield increased. Our results show that, under greenhouse and open field conditions, chlorine dioxide reduced OD (virus concentration in sap) by 80.21-69.87% in plants sprayed with 760 ppm ClO_2 and increased yield by 40-50%.

Key words: viral infection, emerging disease, losses.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.), desempeña un papel esencial en la dieta humana debido a su aporte nutricional, esto la posiciona como una hortaliza de importancia tanto a nivel nacional como internacional (Ruiz-Aguilar *et al.*, 2023). En México, las zonas de mayor producción están ubicadas en las regiones del Bajío y el noroeste del país; en 2019, alrededor del 90 % de las exportaciones se dirigieron a los Estados Unidos (Sandoval-Cabrera y Borja-Rodríguez, 2023). Solo en 2020, en la región norte de Coahuila, se cultivaron 718 hectáreas (Ha) con una producción de 112,180.25 toneladas y un rendimiento promedio de 156.24 kg ha⁻¹, destacando la producción de tomate en el sistema de agricultura protegida (SIAP, 2020). El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera reporta que durante el año 2022 se ha registrado un incremento del 15.7 % en el rendimiento de la producción de tomate en el territorio de Coahuila (SIAP, 2023). Una de las restricciones que afectan la producción de este cultivo son los patógenos sistémicos, especialmente los virus que se transmiten a través de la semilla y de manera mecánica (González-Concha *et al.*, 2023). Los tobamovirus son, en su mayoría, los más importantes para la agricultura, debido a su diversidad genética, mecanismos de transmisión, adaptación, interacción y rango de hospederos (Aiewsakun y Katzourakis, 2016). La mayoría de los virus del género Tobamovirus afectan a la familia Solanácea, lo cual genera pérdidas significativas en los cultivos (Caruso *et al.*, 2022). El tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) fue detectado por primera vez en Jordania en 2015, y actualmente se considera una amenaza para la producción mundial de tomate (Zhang *et al.*, 2022). El esfuerzo por desarrollar materiales con atributos fenotípicos superiores, tales como el rendimiento y la calidad del fruto, puede generar una mayor vulnerabilidad a enfermedades virales emergentes, como el ToBRFV (Akhter *et al.*, 2019). El estudio de genotipos con tolerancia y resistencia se presenta como una opción para el control genético del ToBRFV, así como el estudio de inhibidores de la transmisión que reduzcan el impacto por el ToBRFV (Vasquez-Gutierrez *et al.*, 2024). Las investigaciones recientes sugieren que los

genes de resistencia natural en variedades de tomate son alternativas eficaces para prevenir enfermedades virales (Shi *et al.*, 2011). Mientras que, la patogenicidad de los aislados de ToBRFV varía en función de las condiciones ambientales del cultivo (Davino *et al.*, 2020). En condiciones apropiadas, se producen síntomas notables de amarillamiento intervenal severos, deformaciones, mosaicos y necrosis; en los frutos, causa manchas moteadas, maduración incompleta y, en etapas avanzadas, una rugosidad de color café (Zhang *et al.*, 2022). Estudios recientes sugieren que las pérdidas en diferentes genotipos (genes no conocidos) oscilan del 40% al 70% (González-Concha *et al.*, 2023; Ortiz-Martínez *et al.*, 2022). Por lo tanto, el desconocimiento sobre la limitada información del daño ocasionado por el ToBRFV en tomate, se planteó el objetivo de ajustar un modelo evaluación de pérdidas y gradientes, para evaluar la efectividad de estrategias en el manejo de la enfermedad causada por el ToBRFV.

Justificación

Es importante evaluar métodos de manejo de la enfermedad que permitan inhibir la transmisión y replicación del ToBRFV, para reducir las pérdidas ocasionadas en el cultivo de tomate.

Objetivos

1. Determinar la concentración efectiva de ClO_2 que reduzca la concentración viral de ToBRFV.
2. Evaluar el efecto del ClO_2 en la transmisión de ToBRFV, en plantas de tomate cultivadas en campo abierto.
3. Evaluar el efecto de la replicación de ToBRFV en plantas de tomate cultivadas en invernadero y campo abierto.
4. Estimar el efecto del ToBRFV en parámetros agronómicos de tomate cultivado en campo abierto e invernadero.
5. Desarrollar un modelo de estimación de pérdidas por ToBRFV.

Hipótesis

- El ClO_2 inhibirá la transmisión del ToBRFV causada por las prácticas de manejo del cultivo de tomate.
- El ClO_2 reducirá la replicación del ToBRFV en plantas inoculadas.
- Existirá una relación entre las pérdidas en rendimiento y la carga viral de ToBRFV en plantas de tomate, que se ajustarán a un modelo de Berger.

REVISIÓN DE LITERATURA

Importancia económica del tomate en México

El tomate es una de las hortalizas con mayor importancia en el mundo, dado a su importancia nutricional y metabolitos secundarios (Ilahy *et al.*, 2018). Debido a su alto rendimiento, desempeña una importancia en la vida de las personas y en el desarrollo económico de los países productores (Firdous *et al.*, 2019). México ocupa el décimo lugar a nivel mundial como productor de tomate, destacando Coahuila en el 16° lugar a nivel nacional (SIAP, 2023). Aunque el rendimiento anual de la superficie cultivada de tomate ha crecido conforme a los años, las pérdidas en producción han provocado un impacto debido a la presencia de factores bióticos y abióticos, dentro de ellos cabe mencionar, las enfermedades ocasionadas por virus de importancia económica (Akhter *et al.*, 2017).

En México, las zonas con mayor producción están ubicadas en las regiones del Bajío y el noroeste del país; tan sólo en 2019, alrededor del 90 % de las exportaciones se dirigieron a los E.U. (Sandoval-Cabrera y Borja-Rodríguez, 2023). La región Norte del estado de Coahuila se ha caracterizado desde hace tiempo como principal productor de melón (Espinoza-Arellano *et al.*, 2023). Sin embargo, el aumento de costos y la ausencia de financiamiento por parte del Estado, ocasionó una reducción en los créditos a los productores y, consecuentemente, una disminución en las hectáreas cultivadas (Espinoza-Arellano *et al.*, 2019). Esta situación condujo a la transición hacia un sistema de producción de tomate en agricultura protegida (Orona *et al.*, 2022). En 2020, en la región norte de Coahuila, se cultivaron 710 hectáreas con una producción de 112,180 toneladas y un rendimiento promedio de 156 kg ha⁻¹, destacando la producción en el sistema de agricultura protegida (SIAP, 2020). El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera reporta que durante el año 2022 se ha registrado un incremento del 15.7 % en el rendimiento de la producción de tomate en el territorio de Coahuila (SIAP, 2023).

De acuerdo con un análisis financiero realizado por Orona *et al.* (2022), se observa que seis de cada diez unidades agrícolas exportan entre el 74 y el 85 % de su producción a los Estados Unidos. Asimismo, se estima que el costo promedio de producción por kilogramo de tomate es de 4.02 pesos, y se sugiere que, a medida que aumenta la superficie cultivada, los costos disminuyen. Estos factores resaltan la importancia del cultivo de tomate en agricultura protegida en las regiones productoras de Coahuila.

Importancia del ToBRFV

El tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) se le considera un virus estable, puede encontrarse en el exocarpo del tomate, causando infecciones sistémicas, produciendo síntomas severos en distintos órganos de las plantas de tomate (Klap *et al.*, 2020a). En folíolos de tomate, se manifiestan ocasionando síntomas severos de amarillamiento intervenal, deformación, mosaico, necrosis, en los frutos produce moteados, en etapas terminales rugosidad color café (Davino, 2020). El *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) perteneciente al género Tobamovirus es uno de los patógenos de mayor importancia económica, debido a su agresividad producida en el cultivo de tomate (Aghamohammadi *et al.*, 2013), a tal punto de ser denominado una amenaza emergente considerado una de las principales enfermedades causantes de la disminución del rendimiento en tomate (Salem *et al.*, 2023). Debido al riesgo que mantiene en distintas regiones productoras del mundo (EPPO, 2021), es necesario desarrollar estudios que muestren un impacto significativo en las estrategias de manejo fitosanitario, conocimientos en la epidemiología, para evitar la propagación dentro de las regiones productoras de tomate a nivel internacional (Mut, 2021).

Caracterización y Taxonomía del ToBRFV

La familia *Virgaviridae* está conformado por 5 géneros de virus fitopatógenos, entre de ellos el género *Tobamovirus* con mayor importancia a nivel mundial (Adams *et al.*, 2017); Dombrovsky *et al.*, 2017a), que constituye a 37 especies (School, 2020). Incluyendo las especies con mayor importancia económica:

Tobacco mosaic virus (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV), *Pepper mild mottle virus* (PMMoV), *Tomato mottle mosaic virus* (ToMMV) y *Tomato brown rugose fruit virus* (ToBRFV) (EPPO, 2023).

Taxonomía del ToBRFV de acuerdo con School *et al.* (2020):

Realm: Riboviria

Kingdom: Orthornavirae

Phylum: Kitrinoviricota

Class: Alsuviricetes

Order: Martellivirales

Family: Virgaviridae

Genus: Tobamovirus

Species: Tomato brown rugose fruit virus

Nombre común: tomato brown rugose fruit virus, virus del fruto rugoso marrón del tomate.

Grupo IV: ARNm_c⁺ (Baltimore)

El ToBRFV tiene partículas en forma de varilla rígida de 300 nm de largo y 18 nm de diámetro. El genoma es de ARN monocatenario de sentido positivo (ARN_{ss}⁺) de ~6.400 nt. Con cuatro marcos de lecturas abiertos (ORF1, 2, 3 y 4) distintos, que codifican dos complejos de proteínas relacionadas con la replicación de 126 kDa (ORF1a) y 183 kDa (ORF1b), la proteína de movimiento (PM) de ~30 kDa (ORF2) y la proteína de cubierta (PC) de ~17,5 kDa (ORF3), expresado a través de los ARN subgenómicos coterminales (Eichmeier *et al.*, 2023)

Distribución

El primer registro de ToBRFV se localizó en Israel en el 2014, en tomates cultivados bajo malla sombra, pero se reportó tres años posterior (Luria *et al.*, 2017). Sin embargo, se registró públicamente hasta el 2015 como el primer avistamiento en invernaderos de tomate con síntomas inusuales a otros virus (Salem *et al.*, 2016). El diagnóstico molecular de las plantas de tomate demostró

la presencia de un nuevo *Tobamovirus* al que se le denominó *Tomato brown rugose fruit virus*. La incidencia y la severidad en frutos cosechados con la afectación del ToBRFV, representó una limitante para la comercialización en el mercado, la falta de métodos de diagnóstico y planes de trabajos epidemiológicos retrasó su control cuarentenario (Zhang *et al.*, 2023). Posterior a su descubrimiento, el virus se propagó rápidamente, a través de semillas como fuente de inóculo primario, debido que Israel y Jordania son uno de los países con mayor exportación de semillas a nivel mundial, representaron un punto de inicio para la diseminación del virus en el mundo (Van de Vossenberg *et al.*, 2020).

Con la importación de semillas a México, en 2017 se evidenciaron síntomas de una enfermedad que se diseminaba de forma mecánica en invernaderos de tomate, en julio de 2018 en Ensenada Baja California se reporta la primera ocurrencia del ToBRFV (Camacho-Beltrán., 2019), las muestras se secuenciaron y evidenciaron 100% de identidad a la región de 1052 pb del gen RdRP de los aislados ToBRFV de Israel y Jordania con accesiones depositadas en el GenBank (KX619418 y KT383474.1), meses posteriores en septiembre del 2018 en invernaderos de tomate y chile en la región de Yurécuaro, Michoacán se detecta a ToBRFV (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2019), dichas muestras fueron analizadas por RT-PCR, donde tuvieron 100% de identidad con las muestras de Israel. Lo que significa que la diseminación del virus se propagó rápidamente en las áreas de producción de tomate en México, actualmente se encuentra distribuido en: Yucatán, Tamaulipas, Zacatecas, Jalisco, Sonora, Chihuahua, Durango, Aguascalientes, Querétaro detectado en *S. lycopersicum*, *C. annum* y *S. melongena* (Sinavef-Senasica, 2020); Sinaloa, San Luis Potosí, Hidalgo y Chiapas en *S. lycopersicum*, (González-Concha *et al.*, 2021); Puebla (Zamora *et al.*, 2021); Guanajuato (Nolasco-García *et al.*, 2023), Coahuila (Vasquez-Gutierrez *et al.*, 2023), Colima (Zamora *et al.*, 2023), Guanajuato (Vargas-Mejía *et al.*, 2023) detectado en *S. lycopersicum*.

Transmisión ToBRFV

Las partículas del ToBRFV pueden entrar en las células de la planta a través de pequeñas heridas. Dentro del huésped, el virus se replica usando factores de la célula huésped. ToBRFV es muy estable y pueden sobrevivir en superficies como ropa, restos de plantas, soluciones nutritivas, suelo o material de transporte sin perder la infectividad. No existen investigaciones enfocadas a los vectores principales del ToBRFV pero Levitzky *et al.* (2019) en un estudio reciente, donde colectó colmenas de abejorros provenientes de invernaderos de tomates infectados, pudo analizar que estas conservaban un inóculo primario infeccioso, debido que las colmenas contaminadas con ToBRFV portaban partículas virales infecciosas. Así mismo, realizaron el ensamblaje del genoma de ToBRFV donde se logró identificar al virus adherido al cuerpo del abejorro, mientras que la disección de abejorros mostró que ToBRFV estaba presente principalmente en el abdomen, lo que sugiere que la enfermedad viral se propaga a través de la polinización por zumbido. Estos resultados demuestran que las colmenas de abejorros recolectadas en invernaderos contaminados con ToBRFV llevan un inóculo primario que refleja el estado de los virus en el área de cultivo. Este nuevo modo de propagación de ToBRFV por polinizadores abre una vía para la detección de virus en un área de cultivo a través del análisis de los polinizadores, y también enfatiza la necesidad de reevaluar los protocolos de manejo de enfermedades apropiados. La transmisión del virus es por vía mecánica, a partir del manejo mecánico entre plantas, equipos de trabajo y la participación del polinizador comercial *Bombus terrestris* en la etapa de floración del cultivo, así mismo, se han encontrado que las semillas y los restos de material vegetal cumplen la función de fuente de inóculo (Levitzky *et al.*, 2019).

Epidemiología de ToBRFV

Los Tobamovirus se encuentran entre los virus más destructivos en la epidemiología de plantas, ya que producen epidemias severas en solanáceas. Por ello conocer los mecanismos de transmisión, la interacción hospedero del virus, la diversidad genética y el progreso de la enfermedad conforme a las

pérdidas que ocasiona en etapas críticas del cultivo, son de suma importancia para analizar diferentes aspectos epidemiológicos de estos entes virulentos (Aghamohammadi *et al.*, 2013). En años recientes, el modelamiento epidemiológico ha cobrado gran importancia como una herramienta indispensable para los estudios de las epidemias producidas por enfermedades virales en plantas. Estos modelamientos se ejecutan con el objetivo de comprender el desarrollo y la evolución de una o varias epidemias, con relación a las variedades a evaluar. En muchos casos, los modelos empleados han permitido manejar la enfermedad, pero posiblemente han logrado obtener un mayor impacto en la comprensión de epidemias de importancia económica (Jeger *et al.*, 2018).

Los modelos de tipo logístico son mayormente utilizados para medir el comportamiento de epidemias en plantas causadas por tobamovirus, en donde las partículas virales (unidades infecciosas) se propagan a través del contacto directo de planta a planta (Vasquez-Gutierrez *et al.*, 2023). Los modelos de tipo Log-logístico son los más específicos para representar enfermedades policíclicas o de interés compuesto, las cuales se caracterizan por presentar múltiples ciclos de infección durante el ciclo productivo del cultivo (Nutter, 1997). El patosistema policíclico de ToBRFV tiene una constante de producción de inóculo mediada por los procesos de replicación del virus al interior de las células del hospedante (Smith y Dambrovsky, 2019), así como la rápida dispersión y posterior infección de nuevos individuos (Jeger *et al.*, 2018). Las etapas de desarrollo epidemiológico del virus, comienza con una fase inicial; durante este período la tasa de infección de la enfermedad es baja, debido a la adaptación del patógeno a las condiciones ambientales. Dentro de la fase de crecimiento rápido (exponencial) se presenta un aumento de la velocidad de transmisión de la enfermedad directamente proporcional al nivel de intensidad (incidencia); es decir en este período de tiempo la tasa relativa de la enfermedad aumentó continuamente produciéndose la máxima transmisión ocasionada por infecciones secundarias dentro de la población de plantas evaluadas. Esta fase se caracterizó por presentar una mayor tasa de infección (β_1) lo que se tradujo en

un mayor riesgo de ocurrencia de la epidemia del ToBRFV a lo largo del tiempo ((Jeger *et al.*, 2018). Al culminar esta fase, la epidemia entra a una etapa de desaceleración o fase estacionaria, que es cuando el virus se estabiliza, es decir, “ha llegado al número máximo de individuos (plantas) infectados (Madden and Hughes, 2000). Aunque este riesgo de transmisión es de baja frecuencia tiene un alto impacto sobre todo en los sistemas de producción de alta intensidad, principalmente en regiones con mayor superficie cultivadas con solanáceas (González-Concha *et al.*, 2021) teniendo en cuenta que gran parte de la semilla importada para la producción de tomate en México proviene de Israel, lugar donde se reportó por primera vez la aparición del ToBRFV en invernaderos comerciales de tomate (Luria *et al.*, 2017).

Gradiente de dispersión y de enfermedad

Un gradiente de dispersión corresponde a la variación en la deposición de inóculo en relación a la distancia desde una fuente de inóculo (de nuestro interés), en cuanto al gradiente de la enfermedad es la disminución de enfermedades o infecciones o lo largo de la distancia, el cambio (generalmente declina) en intensidad de enfermedad sobre la distancia desde una fuente de inóculo (Suárez, 2004), no necesariamente tiene que ser distancia, puede ser número de plantas infectadas con diluciones en serie para encontrar el punto máximo de dilución de la sabia infectiva del virus (Cavallini, 1998), existen maneras para medir el gradiente de una enfermedad, la mayor utilizada es a partir de síntomas producidos por el patógeno; comenzar la medición a partir de las plantas más cercanas a la fuente de inóculo, conociendo el periodo de incubación de la enfermedad. (González-Garza, 2018) con esto es posible conocer la exactitud, de la distancia/ número de plantas que avanzó la fuente de inóculo a plantas sanas por medio de la diseminación mecánica durante el manejo de la planta.

Sintomatología

ToBRFV es un Tobamovirus capaz de producir diferentes síntomas en sus hospederos, difiriendo al hospedero que afecta, temporada, temperatura,

condiciones de desarrollo (invernadero o cielo abierto) y edad de la planta donde ocurre la infección (Caruso *et al.*, 2022). La mayoría de los síntomas producidos de manera directa e indirecta afecta significativamente la calidad y el valor comercial de la fruta, lo que conlleva a la pérdida de la cosecha (Menzel *et al.*, 2019). Así mismo la expresión de síntomas puede variar conforme al cultivo y al ambiente. Las plantas infectadas por el ToBRFV pueden expresar síntomas foliares de tipo mosaico en las láminas, oscurecimientos en las nervaduras, malformaciones del tejido y ampollas en los foliolos, deformación, rugosidad, hendiduras de color marrón en los frutos, afectando el rendimiento, la calidad y el valor comercial del cultivo (Luria *et al.*, 2017).

Técnicas de diagnóstico

El diagnóstico inicia a partir de la identificación de síntomas en plantas de tomate, la observación de oscuros mosaicos, deformación y estrechamiento en hojas, en los brotes jóvenes apicales y rugosidad color marrón en frutos, confirma la presencia de ToBRFV (Alfaro-Fernández *et al.*, 2021). En la actualidad existen alternativas para la identificación y detección del ToBRFV, estos se pueden clasificar en diferentes tipos: diagnóstico por plantas diferenciales, microscópico, serológico, tiras reactivas y moleculares.

La identificación y detección del ToBRFV se puede realizar a través de microscopía electrónica (TEM, por sus siglas en inglés), donde se visualiza la morfología de varilla rígida de los viriones, sin embargo, estas herramientas no pueden diferenciar entre especies del género Tobamovirus (Cambrón-Crisantos *et al.*, 2018). Otras de las técnicas que son utilizadas para su detección previa, son las tiras inmunológicas Agdia® son pruebas serológicas disponibles, anteriormente se creía que estas reaccionaban de forma cruzada con otras especies de este género, pero en un estudio reciente validan la sensibilidad analítica (con un rango de 64 a 320 pg/mL) proporcionando una alta especificidad en el diagnóstico de diversos aislados de ToBRFV de hasta el 100 % (Eads *et al.*, 2023). Sin embargo, una prueba positiva debe confirmarse por otros medios con mayor especificidad utilizando técnicas moleculares (RT-PCR, por sus siglas

en anglès) (Wilstermann y Ziebell, 2019). La importancia de utilizar técnicas de diagnóstico fitosanitario que permitan conocer de manera precisa el agente patógeno precursor de los síntomas asociados a las muestras a identificar es primordial (Rodríguez *et al* 2019). En la actualidad se han reportado oligonucleótidos específicos para la detección de ToBRFV mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR) (Li *et al.*, 2018). La detección oportuna del ToBRFV tiene importancia en las semillas provenientes de países extranjeros, lo cual reduce la diseminación temprana del virus en las regiones productoras del mundo (Davino *et al.*, 2020).

Estudios de pérdidas ocasionados por Tobamovirus

Existen limitados estudios desarrollados en campo y/o invernadero para la evaluación de pérdidas en la producción de tomate, a causa de la infección por el ToBRFV, en algunos artículos reportan incidencias del 50- 100% en plantas enfermas (Alkowni *et al.*, 2019) así como 10-15% en frutos sintomáticos, sin embargo, ninguno ha evaluado con precisión las pérdidas ocasionadas por el patógeno tras la infección en diferentes edades del cultivo (Luria *et al.*, 2017). Son pocos los estudios que han evaluado y determinado las pérdidas en el rendimiento en tomate a causa de infecciones por tobamovirus, algunas de estas estimaciones son realizadas en base a valores de incidencia y severidad; El TMV puede ocasionar pérdidas de hasta 100% en el rendimiento en tomate (Abdelkhalek, 2019). El ToMV se ha reportado que puede ocasionar perdidas hasta en un 26.5% en la producción (Choi *et al.*, 2019). El PMMoV puede ocasionar incidencias en campos abiertos e invernaderos de tomate que van del 70–100%, reduciendo la productividad (Ogai *et al.*, 2013). Principales productores de tomate en el Norte de México, se han visto afectados en la producción, por la aparición de enfermedades que causan pérdidas hasta en un 100 % en el rendimiento; por ello, el desarrollo de modelos de evaluación de perdidas, contribuiría el interés fitopatológico para evaluar la (incidencia y/o severidad), a partir de microparcelas experimentales, estos datos servirían en campo para pronosticar o analizar la dinámica de las enfermedades de origen

viral y las estimaciones de pérdidas en rendimientos ocasionadas por epidemias severas (Ortiz-Martínez *et al.*, 2022). Los métodos para el desarrollo de estas evaluaciones y/o estimaciones incluyen modelos de múltiples puntos, modelos integrales, modelos sinópticos y modelos de superficie de respuesta, así como patrones de dispersión y correlación espacial (Madden y Campbell, 1990; Jeger *et al.*, 2018). De este modo el modelamiento de las epidemias ha contribuido en la comprensión teórica y estimación de pérdidas en cultivos de tomate con respecto al tiempo de infección en diferentes fechas del cultivo bajo condiciones de invernadero, lo que ha llevado a entender el comportamiento del patógeno; de esta forma establecer estrategias de medidas fitosanitarias para el manejo de la enfermedad con relación al ciclo del cultivo (Ojiambo *et al.*, 2017). La severidad que ocasionan las enfermedades virales en especial las causadas por especies del género Tobamovirus en cultivos de tomate en México, hacen de su estudio una prioridad mundial.

Pérdidas por ToBRFV

El cultivo de tomate al ser afectado por enfermedades virales desarrolla síntomas que afectan el tiempo de vida, su valor comercial, desarrollo, rendimiento y calidad; el tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) ha generado una reducción en el rendimiento de hasta el 99% de acuerdo con la superficie del cultivo manejado (Oladokun *et al.*, 2019). Además, estudios recientes reportan, que las pérdidas de rendimiento en tomate debido al ToBRFV pueden alcanzar el 40 % (González *et al.*, 2021), mientras que Ortiz-Martínez *et al.* (2022) sugieren que estas pérdidas alcanzan hasta el 70 %. Por otro lado, Avni *et al.* (2019) revelaron, a través de la hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés), que los genotipos de tomate evaluados y portadores del gen de resistencia Tm-2², experimentaron una disminución del rendimiento del 55 %. En cambio, en tomates del cultivar TOP-2299 (genes no conocidos), se obtuvo una disminución del 40 % (González-Concha *et al.*, 2023). Estos hallazgos son consistentes y demuestran que la patogenicidad y el impacto sobre el rendimiento, produce un

impacto significativo sobre el valor agregado del costo-beneficio para el productor.

Estrategias para el manejo del ToBRFV

Debido a la ausencia de información aplicada para el control y manejo específico del ToBRFV se han realizado estrategias culturales que reducen parcialmente la diseminación del virus en el área de trabajo. Para esto se debe implementar estrategias como: el uso de semillas libres del virus, evitar la reutilización de sustratos, en un dado caso de reutilización, se recomienda aplicar tratamientos térmicos de inactivación y desinfección para ToBRFV (Michael *et al.*, 2022), eliminar y remover plantas sintomáticas después del trasplante, mantener libre de malezas el área de trabajo, que puedan servir como reservorios del ToBRFV, considerar la rotación de cultivos específicamente con leguminosas, mantener ubicados en áreas específicas al personal de trabajo (Ehlers *et al.*, 2022b), limpieza correcta de la ropa y zapatos de los trabajadores, junto con la desinfección de herramientas antes y después de la entrada al área de producción (Ehlers *et al.* (2022a). Son algunas estrategias de mitigación que podrían contribuir en un buen manejo del ToBRFV. Actualmente no existen productos químicos tan efectivos para controlar el ToBRFV durante la infección en plantas hospedantes, la mayoría de los estudios se centran en la desinfección del virus, pero no controlando directo en la planta (Zhang *et al.*, 2022). Por lo cual, se han estudiado el desarrollo de productos virucidas capaces de reducir la incidencia y severidad del virus bajo condiciones de campo. Eldan *et al.* (2022) proponen el uso de peróxido de Hidrógeno (HP) en un hidrogel de alcohol polivinílico (PVA)/ polivinilpirrolidona (PVP) para liberación controlada en aplicaciones de campo, la tasa de liberación del HP hidrogel a través del contacto directo e indirecto con el suelo (fase gaseosa) produce una baja fitotoxicidad y una alta eficacia contra ToBRFV, probadas en plantas de tomate y tabaco.

El uso de inductores de resistencia aplicados directamente al cultivo, para contrarrestar el daño causado por el ToBRFV es limitado, debido a la reciente aparición del virus. Aun así, se han evaluado recientemente algunos trabajos bajo

este principio (Ortiz-Martínez *et al.*, 2023) evaluaron el efecto de 14 elicitores y bioestimulantes sobre parámetros agronómicos de morfología, rendimiento y calidad de los frutos en plantas de tomate infectadas con ToBRFV. Determinaron que Virablock®, Optifert®, Silicant® y Haifa Protek™ mejoraron los parámetros agronómicos evaluados, mientras que Haifa Protek™ indujo mayor sistema radicular.

ToBRFV considerado el primer tobamovirus capaz de romper la resistencia a los genes Tm-2, Tm-1 y Tm-22 que confieren resistencia a TMV, ToMV y ToMMV en solanáceas (Hak y Spiegelman, 2021). Por ello, la selección de materiales silvestres para la aplicación de mejoramiento genético con resistencia a ToBRFV, ha brindado resultados favorables en la investigación; como lo indican Kabas *et al.* (2022), quienes evaluaron materiales de tomate que incluyen 10 especies silvestres y 11 híbridos interespecíficos F1 derivados de *S. habrochaites* y *S. pennellii*, estos se probaron con aislados de ToBRFV mediante el método de prueba biológica. Al final, obtuvieron que *S. pimpinellifolium* (LA1651), *S. pennellii* (LA0716) y *S. chilense* (LA4117A, LA2747) resultaron ser tolerantes a ToBRFV con un índice de severidad (DSI) menor 19.6% respectivamente. Sin embargo estos estudios no sólo se han realizado para tomate, también existen algunos reportes para pimiento, donde ToBRFV es capaz de infectar sistémicamente plantas de pimiento que portan genes L¹ o L² resistentes a ToMV (Eldan *et al.*, 2022),, aunque en pimiento con genes L² y L⁴, ToBRFV produce lesiones locales como resistencia del hospedero al virus (Fidan, 2021), un caso similar a *Nicotiana benthamiana* que produce alta resistencia (HR) a ToBRFV ya que posee un gen Tm-2², lo que expresa visiblemente lesiones necróticas locales (LLN) (Zhang *et al.*, 2013).

Con esto se concluye, que son pocos los materiales genéticos que permiten la resistencia a ToBRFV, tanto silvestres y comerciales, y que a su vez apoyan en la reducción de pérdidas para cultivos de tomate y pimiento. Es importante mencionar que existen genotipos en el mercado considerados resistentes, sin embargo, no siempre contrarrestan la infección por el ToBRFV, es decir, los genotipos establecidos a temperaturas normales (20 a 28°C) pueden tolerar al

patógeno, pero a temperaturas extremas de (30 a 48°C) pueden manifestarse como susceptibles. Por ello, es necesario tomar en cuenta la validación de la resistencia al ToBRFV, antes de su establecimiento en zonas de producción (González-Concha *et al.*, 2023; Nolasco-García *et al.*, 2022).

Uso de Inhibidores de la transmisión mecánica

La entrada inicial del virus en el tejido de la planta se produce a través de daños mecánicos, así como heridas hechas por insectos, ácaros o nematodos, posteriormente, los virus se acumulan en la epidermis del huésped y las células del mesófilo a través de plasmodesmos (PD), se mueven sistémicamente utilizando una proteína de movimiento (MP), tanto el movimiento de célula a célula como el sistémico son procesos que requieren la interacción entre los componentes virales y del huésped (Niehl y Heinlein, 2011). Algunos autores hacen mención sobre inhibidores de la transmisión del virus, Lionetti *et al.* (2014) demostró que la expresión de Inhibidores de la pectina metilesterasa PME1, en el tabaco inhibe la actividad de la proteína de movimiento (PM) y aumenta la esterificación de metilo de la pared celular. La utilización de Arabidopsis y extractos de kiwi (Lionetti *et al.*, 2014) en hojas de tabaco infectadas con TMV, obtuvieron que la mayor actividad inhibitoria fue del extracto kiwi, que mostró mayor inhibición en la PM de virus, lo que redujo el porcentaje de síntomas de TMV en plantas de tomate. Mientras que el uso de desinfectantes para evitar la transmisión de virus ha cobrado relevancia, el hipoclorito de sodio e hipoclorito de calcio como desinfectantes de herramientas y actividades de tratamiento a la semilla (Toth y Kiss, 2016). Recientemente el uso de compuestos químicos antivirales ha cobrado relevancia en tratamientos de aguas residuales, desinfección de verduras frescas, tubérculos y desinfección de áreas de trabajo, incluso en el uso para evitar la transmisión respiratoria, entérica y sanguínea como es el caso del SARS-CoV-2 (Totaro *et al.*, 2021). La eficacia del uso de dióxido de cloro (ClO₂) y ácido peracético (PAA) contra virus en humanos, como es el caso de la hepatitis A (HAV), norovirus murino (MNV-1) demuestra que el

ClO_2 elimina los virus transmitidos por alimentos en aguas de lavado ricas en suelo (Wang *et al.*, 2024).

Sin embargo, no existen estudios realizados del uso del dióxido de cloro como antiviral de virus de plantas. En una revisión sistemática realizada por Jefri *et al.* (2022) sobre el uso del dióxido de cloro como desinfectante, mencionan que, de los 33 estudios analizados, 14 se centraron en la eficacia como desinfectante, 8 en la seguridad y toxicidad en humanos y animales y 15 discutieron el impacto como la desinfección del tratamiento del agua, con esto se menciona que el ClO_2 es un desinfectante seguro y eficaz, incluso en concentraciones bajas de 20g L^{-1} . El dióxido de cloro se puede utilizar eficazmente para desinfectar el agua, destruir hongos, bacterias y virus de verduras y frutas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la experimentación

El desarrollo de la presente investigación se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, localizada en Saltillo Coahuila, México., la parte experimental se ejecutó en el área de los invernaderos del Departamento de Parasitología, con coordenadas: 25°21'23.55" latitud N, 101°25'16" longitud O y 1763msnm.

Aislamiento e identificación del ToBRFV

Se realizaron muestreos al azar en tejidos de hojas jóvenes y frutos con síntomas de mosaicos y oscurecimientos en las nervaduras de las hojas, deformación y rugosidad color marrón en los frutos, dirigidos a ToBRFV (Luria *et al.*, 2017; González-Concha *et al.*, 2021) en invernaderos comerciales ubicados en General Cepeda. La muestra TB1 se obtuvo de la variedad Blindon F1 de Nunhems, la muestra TQ2 en la variedad Azores de Enza Zaiden, y la muestra FQ3 en la variedad Quiroga de Enza Zaiden. Las muestras pertenecen al municipio de General Cepeda, ubicado en Coahuila, México (N25°19'04.0" W101°24'10.6"). Dentro de una superficie de cuatro hectáreas, se recolectaron 200 folíolos por Ha⁻¹ (un folíolo por planta). Para identificar los síntomas del ToBRFV, se emplearon las claves pictóricas propuestas por Luria *et al.* (2017) y Cambrón-Crisantos *et al.* (2019). Posteriormente se realizó una previa detección del virus utilizando InmunoStrip Agdia® para corroborar la presencia del ToBRFV en las tres muestras colectadas, una vez corroborados los síntomas positivos al virus, se trasladaron las muestras de folíolos a una nevera bajo temperatura de 5°C±2°C antes del ensayo.

Para el aislamiento se utilizaron plantas de tomate var. Río Grande®, trasplantadas a los 35 días posteriores a la siembra (dps) en macetas de 1 kg utilizando peatmos y materia orgánica con proporción de 1:1. La inoculación se realizó 10 días posteriores al trasplante (dpt) en plantas de tomate var. Río grande de forma mecánica con ToBRFV de acuerdo con (Ortiz-Martínez *et al.*,

2021) con algunas modificaciones; se obtuvo el jugo crudo a partir del tejido enfermo sintomático, luego se maceró en un mortero frío esterilizado, en presencia de una solución amortiguadora fosfatos a pH 8.0, 0,1 M y “celite” como abrasivo. De las plantas solo las hojas primarias fueron inoculadas utilizando un hisopo impregnado con el inóculo ToBRFV, realizando frotamientos en la hoja; y luego, se lavaron con el amortiguador. Como control negativo se frotaron plantas sanas con amortiguador fosfato en compañía de celite (Sigma). La fertilización se realizó dos veces por semana utilizando una solución Steiner al 50% (Steiner, 1961). La observación se realizó 9 posteriores a la inoculación (dpi), para conocer el periodo de incubación (pdi), así como la expresión de síntomas en las plantas inoculadas. Las plantas de tomate se llevaron hasta etapa de fructificación para el estudio de la patogenicidad del ToBRFV.

Detección del tomato brown rugose fruit virus

Para la identificación molecular, se procedió según el protocolo de Ortiz-Martínez *et al.* (2022), empleando 100 mg de tejido infectado para extraer RNA de las muestras TB1, TQ2 y FQ3, junto con un control sano (-). Además, se incluyó un control infectado con ToBRFV (+), otorgado por una unidad de inspección fitosanitaria certificada por el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) de Coahuila. Se utilizó el kit RNA Isolation System (Promega) para la extracción de RNA y la cuantificación de la calidad por espectrofotometría mediante un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para verificar la integridad de las muestras de RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1 % (Invitrogen).

Se utilizó el cDNA del gen endógeno en el proceso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Reversa (RT-PCR), los oligonucleótidos fueron ToBRFV-F (5'-AACCAGAGTCTTCCTATACTCGGAA-3') y ToBRFV-R (5'-CTCACCATCTCTTAATAATCTCCT-3'), diseñados para amplificar un fragmento de 475 pb (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2019). Las condiciones de la reacción consistieron en 12.5 µL Master mix (Platinum), 1.25 µL de ambos oligonucleótidos (ToBRFV-F y ToBRFV-R), 5 µL SuperFi GC (Thermo Fisher), 2 µL de cDNA y 3

μL de agua grado molecular (Invitrogen), en un volumen total de 25 μL . Se aplicó el programa siguiente en el termociclador: un ciclo inicial a 98 °C por 90 s, seguido de 35 ciclos a 98 °C por 10 s, 35 ciclos a 55 °C por 20 s, 35 ciclos a 72 °C por 40 s y finalmente un ciclo a 72 °C por 5 minutos. Los productos de amplificación resultantes se observaron en un gel de agarosa al 2 %.

Determinación de la concentración de dióxido de cloro

Para este ensayo, se sembraron plantas de *Nicotiana longiflora* (Cav.), utilizando como sustrato fertilizante orgánico sólido, turba de esfagno gruesa, perlita y vermiculita en una proporción de 1:1:1:1. El trasplante se realizó 40 días posteriores a la siembra en bolsas de polietileno de 15x16 cm. Las plantas de tomate se fertirrigaron tres veces por semana con solución steiner al 25% (Steiner, 1961).

Las condiciones del ensayo se realizaron bajo invernadero a (28 ± 2 °C con 14 h de luz solar). Se estableció un diseño completamente al azar. Se preparó inóculo ToBRFV de acuerdo con lo mencionado en el ensayo anterior (Vasquez-Gutierrez *et al.*, 2023). Y se procedió a inocular 100 μL a una concentración de 1: 10 (p/v) sobre medias hojas de *N. longiflora* la cual fue considerada una repetición (incluyendo control negativo y positivo).

El Dióxido de cloro (ClO_2) con 80% de ingrediente activo, se suministró por Oxiplant, Mexico. La preparación se realizó en agua destilada, de acuerdo con las diferentes concentraciones empleadas: 100, 250, 500, 760, 1520, 3040 y 6080 ppm. Como control negativo (CN): agua destilada, inóculo preparado (CP), es decir sabia infectada en 1:10 (p/v). 30 min posterior a la inoculación, se asperjó ClO_2 a las concentraciones evaluadas a excepción del CN y CP. Se asperjó un volumen de 5 mL, cubriendo exactamente la media hoja. Este procedimiento se repitió con todos los tratamientos a excepción del CN y el CP. Se analizaron en total 9 tratamientos con 20 repeticiones los cuales se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos utilizar para determinar la concentración de ClO₂ a utilizar en ensayos posteriores.

Tratamientos	Concentraciones (ppm)	Dosis (g L ⁻¹)	Volumen asperjado (mL)
ClO ₂ + inóculo ToBRFV (1: 10 p/v)	T1	100ppm	5
	T2	250ppm	5
	T3	500ppm	5
	T4	760ppm	5
	T5	1520ppm	5
	T6	3040ppm	5
	T7	6080 ppm	5
Agua destilada (CN)	T8	-	5
Inóculo preparado (CP) (1:10 p/v)	T9	-	5
CNA ClO ₂ (6080ppm)	T10	7.6	5

ClO₂: dióxido de cloro; CN: control negativo; CNA: control negativo absoluto.

Evaluación de variables y análisis de datos.

La evaluación se realizó 10 dpi, utilizando una hoja milimétrica se midió el área afectada y el área total y se calculó el porcentaje de fitotoxicidad con la ecuación:

$$\text{Fitotoxicidad (\%)} = \frac{\text{Área afectada}}{\text{Área total}} \times 100$$

Así mismo se registraron el número de lesiones locales expresados en medias hojas de *Nicotiana longiflora*, por cada tratamiento evaluado. Al final los datos se procesaron en un Análisis de varianza, y posteriormente, se compararon con la prueba de medias Tukey, con un nivel de significancia de $p > 0.01$, utilizando el programa estadístico SAS versión 9.1

Evaluación del Dióxido de cloro como inhibidor de la transmisión mecánica

Para este experimento se sembraron semillas del genotipo híbrido 172-300 F1 Yüksel Tohum®. 30 dps las plantas se caparon para inducir brotes apicales

nuevos y se trasplantaron. Se estableció un diseño experimental de parceladas apareadas en el área del bajío de la UAAAN, a cielo abierto. Como parcela 1 fueron plantas con aplicación del dióxido de cloro y parcela 2 plantas sin aplicación del ClO_2 . Fueron cuatro surcos (bloques) por parcela, de 17 m cada uno. 55 plantas por surco. Donde los tratamientos fueron: T0 fuente de inóculo (F.I.), distancia de F.I. (T1, T2, T3...T10). 5 repeticiones por bloque, una planta por repetición, con una distancia entre planta de 0.3 m.

Tabla 2. Distribución de tratamientos evaluados para evaluar el dióxido de cloro como inhibidor de la transmisión mecánica en campo abierto.

	Parcela 1 (Con ClO_2)	Parcela 2 (Sin ClO_2)
Distancias evaluadas	Tratamientos	Tratamientos
F. I	T0	T0
1.5 m	T1	T1
3 m	T2	T2
4.5 m	T3	T3
6 m	T4	T4
7.5 m	T5	T5
9 m	T6	T6
10.5 m	T7	T7
12 m	T8	T8
13.5 m	T9	T9
15 m	T10	T10

F.I: fuente de inóculo, plantas inoculadas de tomate 15 días posteriores al trasplante.

El ensayo comenzó con la inoculación de la fuente de inóculo 15 dpt, al inicio de cada surco por cada parcela (1 y 2). Se preparó un inóculo ToBRFV 1:10 (p/v) en SAF (pH 8.0), proveniente de plantas del aislado FQ3. Utilizando un hisopo impregnado se inocularon 200 μl en las dos primeras hojas apicales de cada planta de acuerdo con lo citado por Vasquez-Gutierrez *et al.* (2024). 10 dpi., se comenzó con la aplicación de tratamientos, se preparó ClO_2 a 760ppm y se asperjaron a las 6.00 pm., en plantas pertenecientes a la parcela 1, de los tratamientos T0...T10 con una dosis de aspersion de 0.96 g L^{-1} . Utilizando un aspersor Pacto 320030 (Swissmex, Saltillo, Mexico), se procuró cubrir toda el área de la planta. 10 min posterior a la aplicación se procedió al manejo de la planta, dentro de las actividades realizadas consistieron en: deshoje de brotes,

despunte de plantas, desbrote de yemas axilares, raleo de flores y podas de formación. Esta actividad se realizó tres veces por semana hasta el primer corte de frutos (50 dpi), en total se realizaron 21 aspersiones.

Evaluación del gradiente de infección (replicación)

La evaluación de la replicación del ToBRFV se realizó por concentración viral densidad óptica (DO) en DAS-ELISA (Agdia, Elkhart, Estados Unidos) a 405 nm 50 días posteriores a la inoculación (dpi). Las muestras procesadas correspondieron a la fuente de inóculo (T0) y las distancias de la fuente de inóculo (1.5, 3, 4.5...10 m). En total se procesaron 4 repeticiones (surcos) por distancia (FI, 1.5, 3, 4.5...10 m). Donde una repetición fue una submuestra de cinco plantas. Para esto se seleccionó el primer foliolo apical de cada planta. Este procedimiento se repitió tanto en plantas asperjadas con ClO₂, así como en plantas no asperjadas. Se utilizó un control negativo sano (CN) proveniente de plantas de la misma edad no infectadas con ToBRFV, y como control positivo las plantas consideradas como FI ubicadas al inicio de cada surco. Las lecturas se realizaron en un lector de placas Multiskang 60 (Thermo Fisher™, Madrid, España). En total se tomaron tres lecturas cada 15 min. La concentración viral se midió de acuerdo con lo siguiente: el promedio de absorbancias de los tratamientos evaluados, tomando en consideración que el control negativo debería tener una absorbancia cercana a cero.

Evaluación de variables agronómicas

La medición de variables se registró conforme al avance del cultivo; 30 dpi se registró las variables de número de flores (NFL). Para la evaluación del número de frutos (NFR) y rendimiento se empezó con la cosecha 50 dpi, esta actividad se realizó 3 veces por semana durante 6 semanas. Se cosecharon los frutos por planta, se contaron y pesaron utilizando una balanza electrónica XY-C. Al finalizar se obtuvo el NFR y rendimiento por planta, posteriormente se promedió el rendimiento entre tratamientos (FI, 1.5, 3, 4.5...10 m). Las variables se procesaron utilizando un análisis de bloques completos al azar con arreglo

factorial. Posteriormente, se realizaron comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p > 0.01$.

Efecto del ClO_2 en la replicación de ToBRFV bajo invernadero

Para este experimento se utilizaron plantas de 40 días posteriores a la siembra (dps) del genotipo híbrido 172-300 F1 que se establecieron bajo condiciones de invernadero. Se trasplantaron en bolsas de polietileno de 5 kg. La inoculación se realizó 10 días posteriores al trasplante utilizando la misma metodología de los ensayos anteriores descrita por Vasquez-Gutierrez *et al.* (2024). Se estableció un diseño con arreglo factorial aleatorizado: como factor uno: plantas con aspersión del ClO_2 ; y factor dos: sin aspersión. Los tratamientos evaluados fueron: T1 (1×10^{-3}), T2 ($1 \times 10^{-3.5}$), T3 (1×10^{-4}), T4 ($1 \times 10^{-4.5}$) y T5 (1×10^{-5}) por cada factor. Se utilizó un control negativo sano (CN) que fueron plantas sólo inoculadas como solución tampón de fosfatos (STF) y un control positivo (CP), plantas inoculadas con extracto de sabia infectiva a una proporción de 1:10 (p/v) en STF. Fueron cinco bloques (maceta con tres plantas) por tratamiento, donde una planta de tomate fue repetición.

El experimento comenzó con la preparación de las cinco diluciones en serie (1×10^{-3} a 1×10^{-5}) a partir de un inóculo preparado a una proporción de 1:10 (p/v). Posteriormente se dispersaron sobre las hojas 100 μL de inóculo ToBRFV sobre los dos primeros folíolos de cada planta. Este procedimiento se repitió en cada tratamiento (dilución), así mismo para los factores evaluados con y sin aspersión de ClO_2 . Se preparó ClO_2 (Oxi-plant, Mexico) a una concentración de 760 ppm y dosis de 0.95 g L^{-1} en agua destilada. Un día posterior a la inoculación (dpi) se asperjó por aspersión en las hojas de tomate del factor 1 (de los cinco tratamientos evaluados), cubriendo el área total de las plantas a un volumen de 20 mL. Este procedimiento se repitió con todos los tratamientos (diluciones), excepto en el CN y CP. Para el caso del segundo factor no se realizó la aspersión de ClO_2 .

Evaluación de variables agronómicas

La medición de variables se registró conforme al avance del cultivo; 35 dpi se registró las variables de número de flores (NFL), 70 dpi se registró número de frutos (NFR) y rendimiento total (RT) para ambos factores (1 y 2).

Las variables se procesaron utilizando un análisis de bloques completos al azar. Posteriormente, se realizaron comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p=0.01$.

Evaluación de la concentración viral medida en DAS-ELISA

La evaluación de concentración viral medida por absorbancia se realizó por DAS-ELISA (Agdia, Elkhart, Estados Unidos) a 405 nm 50 días posteriores a la inoculación (dpi). Las muestras procesadas correspondieron a una planta (tres folíolos) por repetición, los tratamientos fueron T1 (1×10^{-3}), T2 ($1 \times 10^{-3.5}$), T3 (1×10^{-4}), T4 ($1 \times 10^{-4.5}$) y T5 (1×10^{-5}) para cada factor 1 y 2. Se utilizó un control negativo sano (CN) y un control positivo con virus preparado a 1: 10 (p/v). Las muestras se colectaron del primer brote vegetativo. El ensayo comenzó a partir de la sensibilización de la placa lo cual se agregó el anticuerpo de captura (ACC 00960) (Agdia, Elkhart, Estados Unidos) a una concentración de 1:200 μL en Carbonate Coating Buffer (CCB) 1X y se incubó (12 h a 6 ± 2 °C) en refrigeración. Posteriormente, se maceró tejido sintomático a una concentración de 1:10 (p/v) en bolsas de extracción (12x15 mm) (BioCiencia, Nuevo León, México) con General Extract Buffer (GEB) 1X (pH 7.5), se lavó la placa por tres veces con PBST Buffer (1X) y se agregó 100 μL de las muestras extraídas, el Control+ y Control-. Se incubó la placa por 2 h a temperatura ambiente (22 ± 2 °C). Por último, se agregó el conjugado enzimático (ECA ACC 00960) (Agdia, Elkhart, Estados Unidos) a una concentración de 1:200 μL en ECI Buffer 1X (pH 7.5), se lavó ocho veces la placa y se incubó por 2 h a temperatura ambiente. Por último, se preparó el sustrato PNP en Buffer 1x (pH 9.8) a una concentración de 1 mg mL^{-1} y se vació 100 μL en cada pocillo de la placa. Se incubó por 30 min y se procedió a la lectura, se midió la densidad óptica (O.D.) a 405 nm utilizando un lector de placas Multiskang 60 (Thermo Fisher™, Madrid, España). En total se tomaron tres lecturas cada 15 min. La concentración viral se midió de acuerdo con lo siguiente:

el promedio de absorbancias de los tratamientos evaluados, tomando en consideración que el control negativo debería tener una absorbancia cercana a cero.

Las variables fueron evaluadas en un diseño con arreglo factorial, utilizando un ANOVA. Posteriormente, se realizaron comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de $p=0.05$.

Ajuste de un modelo para la estimación de pérdidas en rendimiento en plantas de tomate cultivadas en invernadero y cielo abierto (50 dpi)

Se analizaron ocho modelos epidemiológicos: Modelo de Berger, Modelo exponencial invertido, Modelo exponencial, Modelo monomolecular, Modelo de Gompertz, Modelo Log-logístico, Modelo de Richards y Modelo de Weibull (Minogue, 1983; Berger y Luke, 1979; Berger, 1985; Madden y Campbell, 1990). Se seleccionó el mejor modelo de acuerdo con la pendiente de la recta (r), coeficiente de determinación (R^2), y la variación de los datos modelados. El modelo ajustado permitirá estimar las pérdidas producidas por ToBRFV en plantas de tomate bajo condiciones de campo abierto utilizando la concentración viral en las plantas medidas por DO ELISA a 405 nm a los 55 días de edad del cultivo.

Expresión de lesiones locales en hojas de *Nicotiana longiflora*

Para la cuantificación de lesiones locales expresadas en *Nicotiana longiflora* ante el efecto de ToBRFV. Se realizó un experimento bajo condiciones de invernadero. El ensayo comenzó cuando las semillas de *N. longiflora* fueron sembradas en charolas que contenían 50 cavidades, utilizando una mezcla de Peatmoss y vermiculita (1:1). Posteriormente, a los 30 dpe, se trasplantaron a macetas de 1.5 L. Con el propósito de fomentar la elongación de las hojas, se fertilizó con una solución Steiner diluida al 25%.

La colecta de muestras correspondiente a plantas de tomate del experimento de diluciones en invernadero comenzó a los 50 dpi, se tomaron 3 folíolos por repetición (5 repeticiones) los cuales se separaron en bolsas de papel Kraft,

posteriormente se pesaron 0.4 g por repetición de la dilución viral (Tratamiento) evaluada. Se homogeneizaron las muestras de cada repetición para completar 2 g de tejido. Se realizó la extracción de cada tratamiento, de un gramo de tejido, el cual fue triturado en una solución de fosfatos (SAF) (1: 10 p/v, 0.01 M, pH 8). Se evaluó un experimento con arreglo factorial donde factor 1, fueron las diluciones tratadas con dióxido de cloro (ClO_2) en plantas de tomate, y factor 2, sin la aplicación de ClO_2 . Los tratamientos fueron los mismos que en el experimento anterior: T1 (1×10^{-3}), T2 ($1 \times 10^{-3.5}$), T3 (1×10^{-4}), T4 ($1 \times 10^{-4.5}$) y T5 (1×10^{-5}). Se tomaron 100 μL de la savia preparada para cada tratamiento y se inocularon medias hojas de *N. longiflora* correspondientes a cada tratamiento. Se realizaron 20 repeticiones por tratamiento, siendo la unidad experimental una media hoja. Posteriormente, se dispersó de forma uniforme mediante el uso de un asa bacteriológica hasta cubrir el área seleccionada.

El registro de las lesiones locales necróticas (LLN) se llevó a cabo a los 10 dpi. Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza, y las medias fueron comparadas utilizando la prueba de múltiples rangos de Tukey ($p > 0.05$).

Estimación de lesiones a partir de concentración viral

Para encontrar el modelo con mejor ajuste se probaron seis modelos epidemiológicos: Modelo exponencial, Modelo monomolecular, modelo logístico, Modelo de Gompertz, Modelo Log-logístico, Modelo de Richards y Modelo de Weibull. Se seleccionó solamente un modelo para la estimación de lesiones locales a partir de la concentración viral en la planta. De acuerdo con la pendiente de la recta (r), coeficiente de determinación (R^2), y la variación de los datos modelados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Descripción e identificación de aislados del ToBRFV

Los folíolos y frutos inspeccionados en plantas de tomate de invernaderos comerciales de General Cepeda, México. Presentaron síntomas específicos de acuerdo con lo mencionado por Luria *et al.* (2017): en hojas se expresaron síntomas de mosaicos severos, amarillamientos intervenales, ampulaciones, deformaciones, mientras que en frutos: maduración irregular, leves moteados, y rugosidad color marrón (Figura 1 A y B). La variación de los síntomas expresados en frutos mostró una diferencia entre los tres aislados colectados en invernadero.



Figura 1. Síntomas en hojas y frutos por la infección de ToBRFV en plantas de tomate. A) mosaicos severos y deformación de hojas, frutos con rugosidad color marrón; B) frutos con maduración incompleta.

A continuación, en la figura 2, se muestran los resultados de la prueba por InmunoStrip y los productos de RT-PCR obtenidos de los ensayos realizados, comparados con el marcador de peso molecular (de 1 kb, Plus Invitrogen™) lo cual nos confirma la presencia de ToBRFV.

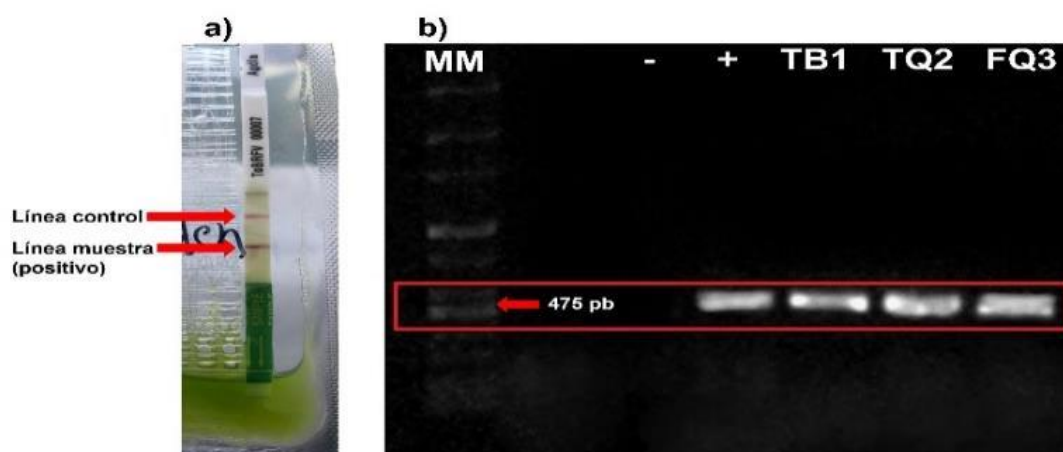


Figura 2. Métodos de diagnóstico de la infección por ToBRFV en plantas de tomate. a) prueba por InmunoStrip (Agdia) y b) RT-PCR, donde MM=Marcador Molecular 1 kb (Plus Invitrogen), (-) =control negativo sano, (+) =control positivo a ToBRFV, además, TB1, TQ2 y FQ3 representan los resultados de los aislados.

Adicionalmente, se realizó un análisis en las muestras obtenidas (TB1, TQ2 y FQ3) a través de un laboratorio certificado para descartar la presencia de otros virus y confirmar la infección por el ToBRFV, tal como se indica en la Tabla 1.

Tabla 3. Evaluación externa de la infección y confirmación del ToBRFV en las muestras.

Virus	Muestras analizadas			Métodos de detección	
	TB1	TQ2	FQ3	ELISA	RT-PCR
<i>Tomato brown rugose fruit virus</i> (ToBRFV)	Positivo	Positivo	Positivo	NR	R
<i>Pepino mosaic virus</i> (PepMV)	Negativo	Negativo	Negativo	NR	R
<i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV)	Negativo	Negativo	Negativo	R	NR
<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV)	Negativo	Negativo	Negativo	R	NR
<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Negativo	Negativo	Negativo	R	NR

El análisis se efectuó en Labfrusco, S.A. de C.V., un laboratorio certificado conforme al sistema de gestión de calidad acreditado en la normativa NMX-EC-17025-IMNC: 2017 (ISO/IEC 17025:2017). La notación R indica que el análisis se ha llevado a cabo, mientras que NR indica que no se realizó.

Se sospecha que las semillas de tomate y pimiento son los principales responsables de la propagación a nivel mundial de la enfermedad causada por ToBRFV (Salem *et al.*, 2022). Es posible que esto se deba a que las semillas provenientes de casas comerciales extranjeras no solo son susceptibles al patógeno (Jewehan *et al.*, 2022b), sino que también sirven como reservorio de partículas virales y actúan como una fuente de inóculo para la propagación del virus en zonas productoras de México (González-Concha *et al.*, 2021). Actualmente se han identificado genotipos resistentes, pero aún no se encuentran de manera comercial en nuestro país, tal es el caso del genotipo Tolerante VC532 y Resistente VC554 (Zinger *et al.*, 2021). La relevancia de ToBRFV radica en su habilidad de eliminar la resistencia genética que han adquirido las plantas de tomate al ataque de los tobamovirus, mediante la supresión de genes del tipo R Tm-1, Tm-2 y Tm-2² (Zhang *et al.*, 2022). Por lo tanto, la elección de una variedad de tomate que tolere la infección al ToBRFV, podría ser empleada para la producción de tomate en las regiones de Coahuila.

Las estrategias para la identificación de ToBRFV que requieran un tiempo reducido y de mayor especificidad, contribuyen a prevenir los niveles elevados de infección en los cultivos de tomate (Rodríguez-Mendoza *et al.*, 2019). Asimismo, la sensibilidad analítica de las pruebas serológicas como ImmunoStrip (con un rango de 64 a 320 pg/mL) proporciona una alta especificidad en el diagnóstico de diversos aislados de ToBRFV de hasta el 100 % (Eads *et al.*, 2023). A partir de esto, se destaca la importancia de la utilización de InmunoStrip tanto para el monitoreo en campo como para un diagnóstico rápido, seguido de su confirmación mediante la técnica RT-PCR, como se detalla en la Figura 1. La utilización de la prueba inmunoStrip no solo previene, sino que también acelera la detección en las fases tempranas del cultivo, lo que ofrece beneficios significativos a los productores. Esta situación se debe a que prefieren afrontar el costo de una prueba rápida para detección del virus, cuyo costo unitario es de \$191, en comparación con el diagnóstico por RT-PCR, que oscila entre \$1000 y \$3000 por muestra. Además, es esencial identificar las partes infectadas con ToBRFV, ya que estas constituyen una fuente de inóculo que puede propagar la enfermedad en toda la zona de producción. La implementación de esta medida contribuirá a fortalecer las prácticas de higiene en las áreas de cultivo, reduciendo de esta manera los riesgos de diseminación a otras regiones productoras de tomate (Klap *et al.*, 2020).

1. Concentración del Dióxido de cloro para controlar ToBRFV

Como primer ensayo se evaluar siete concentraciones del dióxido de cloro (ClO_2) para manejar ToBRFV en plantas de *Nicotiana longiflora*, que se mantuvieron a condiciones de invernadero considerando un rango de temperaturas de 26 a 40°C. Estos resultados demuestran que 500 ppm no produjo fitotoxicidad en hojas de *N. longiflora*, pero expresó un mayor número de lesiones locales necróticas por mililitro (LLN mL^{-1}), lo cual significa que no controló totalmente a ToBRFV. Mientras que 3040 ppm y 6080 ppm redujeron totalmente la aparición de LLN, sin embargo, expresaron (26.55 %), seguido de (44.31 %) de fitotoxicidad

en plantas de *N. longiflora* (Figura 3G y H). En comparación de 760 ppm que no produjo fitotoxicidad y expresó una menor cantidad de LLN mL⁻¹ (15.30) lo cual demuestra su efectividad (Figura 3C). El ClO₂ a una concentración de 760 ppm resultó ser efectivo para controlar ToBRFV hasta en 95.98% (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamientos evaluados para determinar la concentración ClO₂ efectiva para reducir lesiones locales necróticas por ToBRFV en hojas de *Nicotiana longiflora*.

Tratamientos	Tratamientos	Fitotoxicidad	LLN/ 100 µl ⁻¹
100 ppm ClO ₂ +ToBRFV	0	0.00±0.00a	29.28±0.42d
250 ppm ClO ₂ + ToBRFV	1	0.00±0.00a	19.61±3.10c
500 ppm ClO ₂ + ToBRFV	2	0.00±0.00a	9.76±0.34b
760 ppm ClO ₂ + ToBRFV	3	0.00±0.00a	1.53±0.07a
1520 ppm ClO ₂ + ToBRFV	4	17.44±0.82b	0.74±0.09a
3040 ppm ClO ₂ + ToBRFV	5	26.55±1.41c	0.36±0.07a
6080 ppm ClO ₂ + ToBRFV	6	44.31±0.85d	0.00±0.00a
H ₂ O destilada (1x10 ⁰)	7	0.00±0.00a	0.00±0.00a
ToBRFV (1x10 ¹)	8	0.00±0.00a	38.13±4.81e
6080 ppm ClO ₂	9	43.68±1.33d	0.00±0.00a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$) LLN: lesiones locales necróticas. LLN: lesiones locales necróticas.

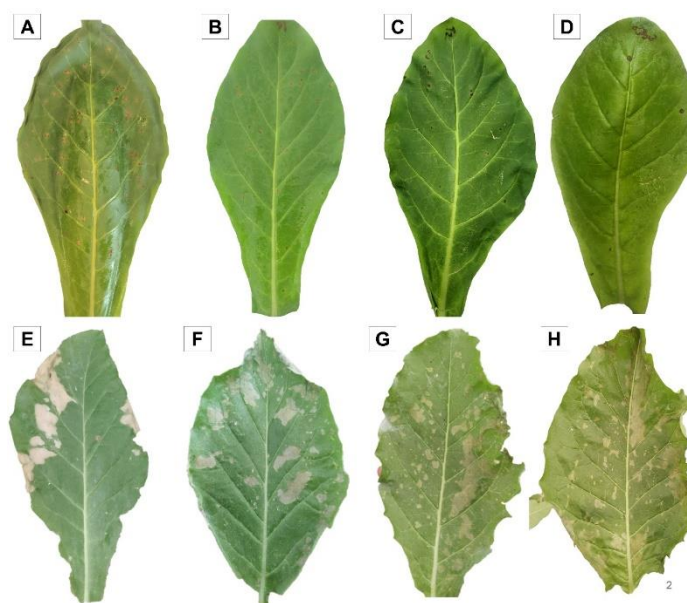


Figura 3. Efectividad del dióxido de cloro contra ToBRFV. A) Control positivo (1×10^1); B) 100 ppm ClO_2 +ToBRFV; C) 500 ppm ClO_2 + ToBRFV; D) 760 ppm ClO_2 + ToBRFV; E) 1520 ppm ClO_2 + ToBRFV; F) 3040 ppm ClO_2 + ToBRFV; G) 6080 ppm ClO_2 + ToBRFV; H) 6080 ppm ClO_2 .

La preocupación de investigar compuestos antivirales que inhiban parcial o total la replicación del ToBRFV es fundamental en el manejo del virus. Sin embargo, son pocos los estudiado enfocados en el control del virus a partir de compuestos antivirales, en mayoría reportan el uso de desinfectantes y compuestos químicos que se evalúan *in vitro* y su posterior aplicación a la planta, pero nunca bajo condiciones de invernadero. Ling *et al.* (2022) en un estudio evaluaron 11 desinfectantes y un activador vegetal antiviral, donde todos los desinfectantes se mezclaron con el ToBRFV y se inocularon posteriormente sobre la planta, donde Virocid al 0.5% y 2% produjo fitotoxicidad en plántulas de tomate. Chanda *et al.* (2021) evaluaron 16 desinfectantes químicos para determinar la efectividad contra la transmisión mecánica de ToBRFV, Virkon al 2% resultó ser mayor efectivo, así como Lactoferramina como producto biológico vegetal. En un reciente estudio Mani *et al.* (2024) probaron formulaciones antivirales basados en emulsiones pickering recubierta con aceite de canela y cilicio para su posterior

tratamiento al suelo y recubrimiento de raíces. Sus resultados demostraron que el fosfato trisódico clorado TSP-Cl mostró % porcentajes bajos de infección por ToBRFV mediada por el suelo. Nourinejhad-Zarghani *et al.* (2023) utilizaron Menno Florades al 4% para establecer modelos de evaluación para cuantificación de ToBRFV y determinar la eficacia desinfectante contra el virus.

También Lobbi *et al.* (2022) evaluaron compuestos de autooxidación del extracto metanólico de hojas de *Combretum micranthum* como antiviral para ToBRFV, pudieron observar que el extracto degradó las partículas virales mediante el desmontaje de la cubierta proteica del virus. Por otro (Lobbi *et al.* 2023) caracterizaron por UHPLC-Q-trap compuestos organosulfurados de extractos de ajo, sus resultados demostraron que los extractos poseen una acción antiviral contra ToBRFV al ser inoculados en plantas de pruebas.

2. Efecto de la aplicación del ClO_2 en la transmisión y concentración de ToBRFV, en plantas de tomate cultivadas a cielo abierto

Se observó un gradiente de reducción de la concentración viral en la savia de las plantas conforme se incrementó la distancia de la FI. La reducción en la Densidad Óptica (DO) en relación con la distancia de la FI fue tres veces más pronunciada en las plantas asperjados con ClO_2 . Campbell y Madden mencionan que cuando una epidemia, tiene una cantidad de enfermedad inicial (Y_0) cercana a 1.0, la inclinación disminuye a “0”, comúnmente llamado como la: tasa de infección aparente (Varderplank, 1963) o la tasa logarítmica del incremento de la enfermedad ejemplificado por la letra (r), en algunos modelos de enfermedades policíclicas sucede que cuando la inclinación de (r) disminuye, este se va acercando a “0”, mientras que (Y_0) aumenta y se acerca a “1”.

Esto concuerda con nuestros resultados: en las plantas asperjadas con ClO_2 , mostraron un mayor progreso de la enfermedad a reducir con una pendiente (r) de -0.05, y una cantidad de enfermedad inicial (Y_0) de 2.16. Esto se debió a las aspersiones del ClO_2 en plantas de tomate, lo que redujo la transmisión de ToBRFV durante el manejo del cultivo, y a su vez una reducción en la cantidad de inóculo (concentración viral) transmitido de planta a planta conforme a la

distancia de los surcos. En cambio, las plantas de tomate que no se asperjaron con ClO_2 mostraron una menor pendiente (r), es decir una menor reducción del progreso de la enfermedad de -0.02, con una cantidad de enfermedad (Y_0) transmitida de planta a planta de 3.41, lo que produjo que la inclinación de la línea disminuyó casi a "0". Esto sucedió, debido a que las plantas no asperjadas con ClO_2 el inhibidor de la transmisión mecánica, como consecuencia la cantidad de inóculo transmitido de planta a planta fue mayor y se mantuvo, ocasionando una pendiente casi recta. Por último, estos resultados demuestran que las plantas tratadas con ClO_2 a 760 ppm, reducen significativamente la transmisión de ToBRFV medida por DO, a los 50 dpi. Por otro lado, la aspersión de ClO_2 redujo la replicación del ToBRFV basado en concentración viral, hasta en un 48% de 1.5 m de la fuente de inóculo hasta los 15 m.

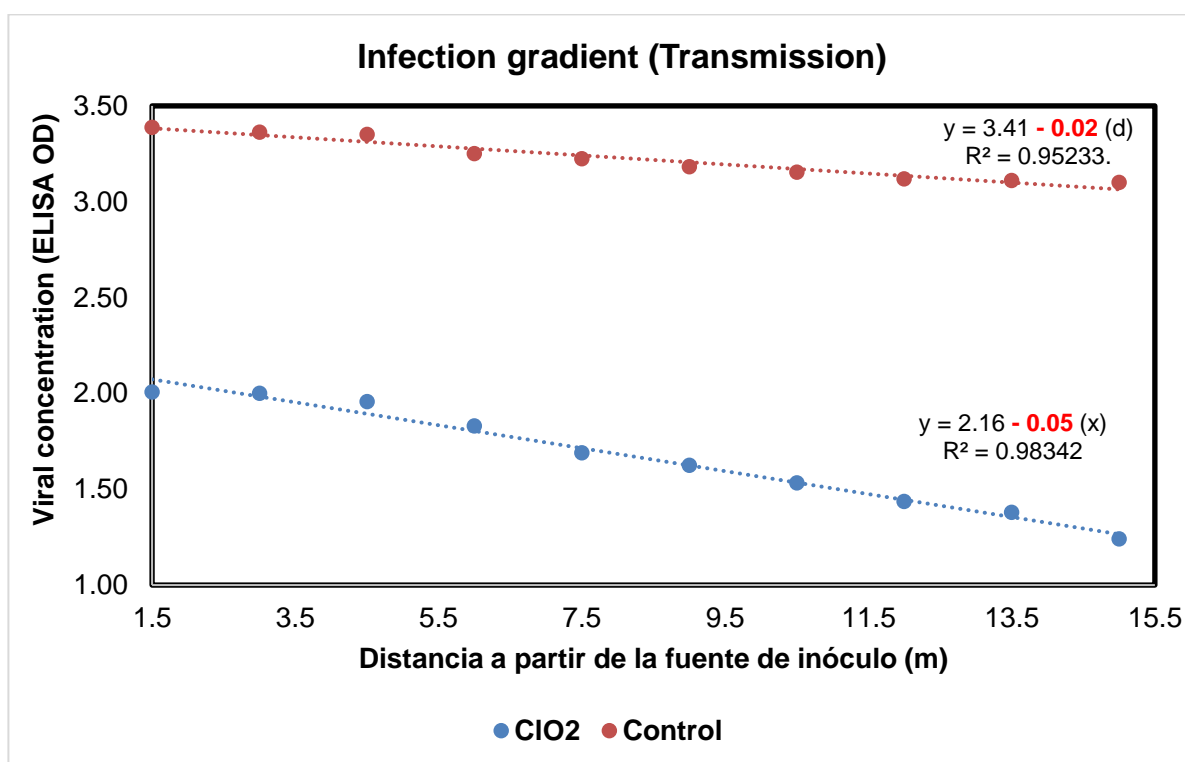


Figura 4. Gradiente de infección por la aplicación del ClO_2 en la transmisión y concentración de ToBRFV, en plantas de tomate cultivadas a cielo abierto. + ClO_2 : modelo de plantas asperjadas con dióxido de cloro; - ClO_2 : modelo de plantas no tratadas con dióxido de cloro.

El dióxido de cloro (ClO_2) es un potente desinfectante con actividad antimicrobiana capaz de inhibir la replicación de virus de plantas, animales y humanos (Kim *et al.* 2016). Su elevado poder antioxidante, sugiere un papel central con actividad antibiótica, capaz de oxidar los aminoácidos aromáticos, lo que provoca la desnaturalización de las proteínas y las pérdidas de la función (Ogata, 2007). Se menciona que altera la estructura de lípidos, en particular modifica la envoltura viral dañando las proteínas y ocasionando efectos adversos sobre los ácidos nucleicos, también se dice que la dioxidación no solo genera especies reactivas de oxígeno, sino que también, modifica las proteínas implicadas en el proceso de señalización Nrf2 con su alto poder oxidante (Jin *et al.*, 2013). Por ejemplo, en Influenza virus, desnaturaliza el aminoácido que es importante para que el virus se una al receptor, N-formilcinurenina, un aminoácido crítico para que el virus se una a los receptores de su hospedero haciéndolo ineficaz, modificando los ácidos nucleicos del ARN o ADN. (Jin *et al.*, 2013). En un ensayo realizado por Kim *et al.* (2016) determinaron que el ClO_2 a 800 ppm, inhibió la nucleación del AcNPV, mientras que la tasa de nucleopoliedrosis del AcNPV disminuyó a una concentración de 80 ppm. Mientras que la inhibición en *Tobacco mosaic virus* (TMV) fue mayor a 400 ppm a las 48 horas posteriores a la inoculación (hpi) con una reducción en la densidad viral de 84.9%, en cambio el tratamiento de ClO_2 a 200 ppm produjo una reducción en la densidad viral del 54.1 % medido por absorbancia en ELISA. Así mismo el efecto de control se confirmó en *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-NC, donde las lesiones locales por TMV se redujeron significativamente con el aumento de la concentración del ClO_2 . Pero la eficacia del tratamiento con dióxido de cloro no fue significativa cuando TMV se inoculó en hojas de tabaco antes del tiempo de reacción del virus con el dióxido de cloro.

Los frutos cosechados de plantas tratadas con dióxido de cloro, cultivadas en campo abierto mostraron una disminución severa respecto a los síntomas producidos (Figura 5, C0 a C10) en comparación con los frutos cosechados de

plantas no tratadas (Figura 5, 0 a 10). También se apreció una reducción en el tamaño de frutos proveniente de plantas asperjadas con ClO_2 .

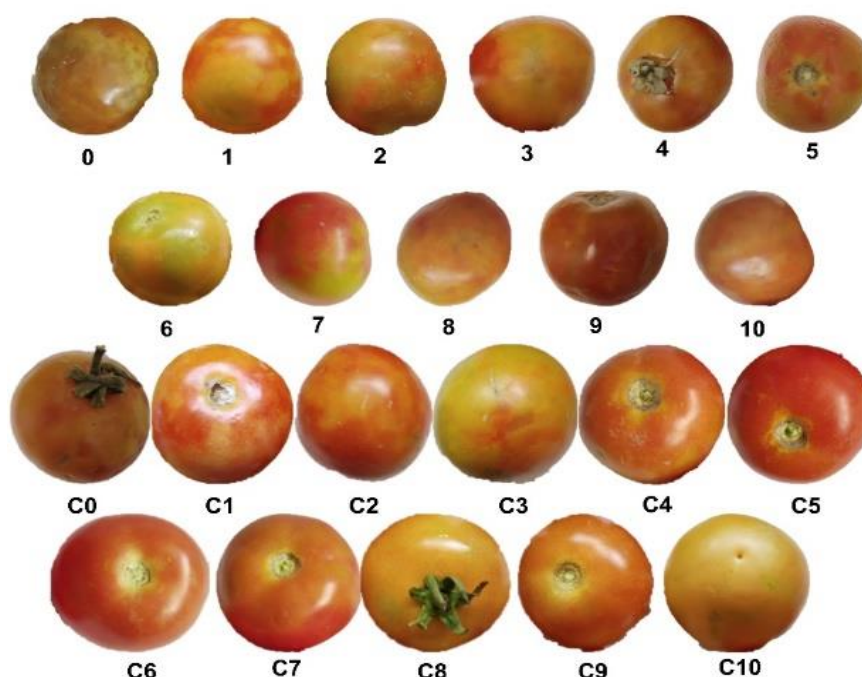


Figura 5. Diferentes síntomas expresados en frutos cosechados de tomates inoculados con diluciones de ToBRFV con y sin aspersión del dióxido de cloro bajo condiciones campo abierto. Plantas no tratadas con ClO_2 , se representan de la siguiente manera, 0: fuente de inóculo (F.I.); 1: 1.5 m de F.I.; 2: 3 m de F.I... 10: 15 m de F.I. Plantas asperjadas con ClO_2 : C0: Fuente de inóculo (F.I.); 1: 1.5 m de F.I.; 2: 3 de F.I...10. 15 m de F.I.

3. Efecto de la aplicación del Dióxido de cloro en la concentración del ToBRFV en plantas de tomate inoculadas en invernadero

Estos resultados demuestran una relación de la cantidad de inóculo (gramos de tejido infectado por mL) entre una concentración viral medida por Densidad óptica (DO) a 405 nm (Tabla 5). En plantas inoculadas con 1×10^{-3} sin tratamiento (ClO_2) se observó (2.54, DO), a comparación de las plantas tratadas con ClO_2 expresaron (0.63), mientras que el CN (0.06, DO). En las plantas inoculadas con 1×10^{-5} y tratadas con ClO_2 expresaron (0.25, DO), mientras que las plantas no tratadas (1.82 DO). La DO del control positivo infectado con sabia preparada a

1×10^1 superó en un 50% a comparación de plantas infectadas con una dilución de 1×10^{-3} . En tratamientos evaluados sin ClO_2 no expresaron diferencia estadística, pero si, entre valores de DO (Figura 6).

Tabla 5. Descripción general de la carga estimada de ToBRFV mediante D.O. 405nm y qELISA.

Aspersión	Tratamientos	Concentración viral
		D.O 405nm ELISA ¹
CN	1×10^0	$0.06 \pm 0.008b$
	1×10^{-3}	$0.63 \pm 0.012g$
Con ClO_2	$1 \times 10^{-3.5}$	$0.53 \pm 0.014f$
	1×10^{-4}	$0.46 \pm 0.007e$
	$1 \times 10^{-4.5}$	$0.32 \pm 0.008d$
	1×10^{-5}	$0.25 \pm 0.004c$
	1×10^{-3}	$2.54 \pm 0.07jk$
Sin ClO_2	$1 \times 10^{-3.5}$	$2.53 \pm 0.009jk$
	1×10^{-4}	$2.48 \pm 0.020j$
	$1 \times 10^{-4.5}$	$2.41 \pm 0.026i$
	1×10^{-5}	$1.82 \pm 0.049h$
CP	1×10^1	$2.57 \pm 0.020k$

¹D.O: Densidad óptica por 405nm; CN: control negativo; CP: control positivo. ClO_2 : Dióxido de cloro. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$)

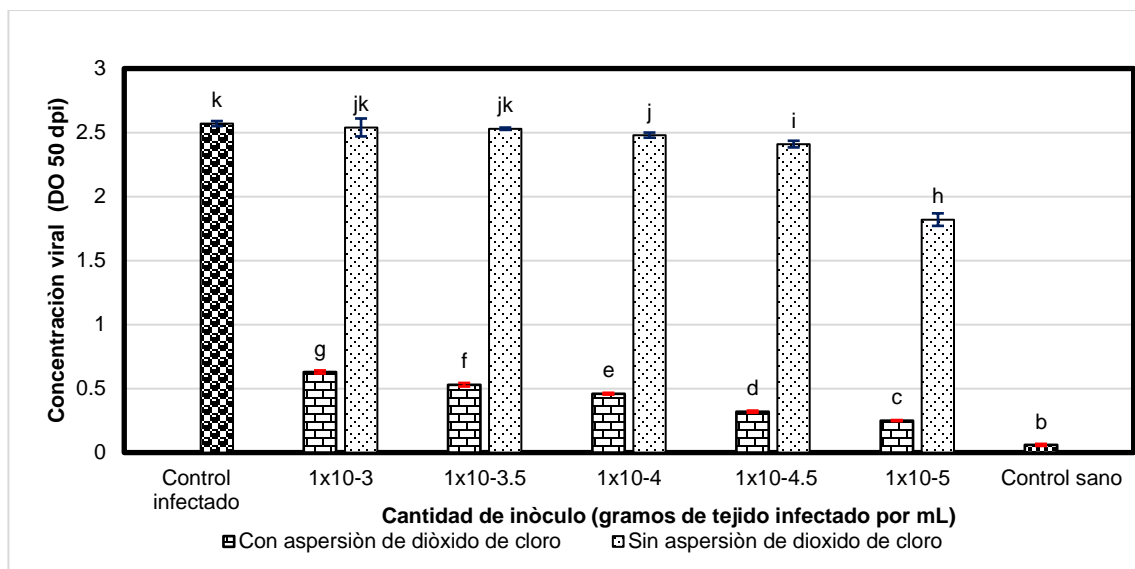


Figura 6. Efecto de la aplicación del dióxido de cloro en la concentración del ToBRFV en plantas de tomate cultivadas en invernadero. Control infectado: plantas inoculadas con 1×10^1 ; plantas inoculadas con diferentes diluciones de ToBRFV (1×10^{-3} a 1×10^{-5}); Control sano: plantas inoculadas con solución amortiguadora de fosfatos (SAF). Medios con la misma letra no son significativamente diferentes ($P > 0.01$).

La cuantificación de carga viral utilizando técnicas sofisticadas apoyan en la evaluación de métodos de tratamiento para el control de virus patógenos en cultivos. En algunos estudios utilizaron inóculo para propagar ToBRFV en plantas experimentales, pero en mayoría de ellos se desconocía la concentración viral (Li *et al.*, 2015; Ling, 2021). Mientras que en otros estudios se ha utilizado la densidad óptica en ELISA como herramienta para la cuantificación del virus (Ling *et al.*, 2022). En muchos trabajos publicados se desconoce la cantidad exacta de la carga viral, lo que podría repercutir en el tipo de anticuerpo utilizado, y esto, a su vez, puede producir variaciones en las concentraciones virales en diferentes especies y sus hospedantes (Mink, 1981). En un estudio realizado por Nourinejhad-Zarghani *et al.* (2022) demuestran que la concentración viral en los inóculos obtenidos de *N. benthamiana* y *N. clevelandii*, varían de acuerdo con el hospedante, lo que sugieren que antes de la cuantificación de la eficacia del

producto químico evaluado, es necesario determinar la carga viral inicial antes de los tratamientos, y después la determinación de la carga restante.

La cuantificación de carga viral utilizando técnicas sofisticadas apoyan en la evaluación de métodos de tratamiento para el control de virus patogénicos en cultivos. En algunos estudios utilizaron inóculo para propagar ToBRFV en plantas experimentales, pero en mayoría de ellos se desconocía la concentración viral (Li *et al.*, 2015; Ling, 2021). Mientras que en otros estudios se ha utilizado la densidad óptica en ELISA como herramienta para la cuantificación del virus (Ling *et al.*, 2022). En muchos trabajos publicados se desconoce la cantidad exacta de la carga viral, lo que podría repercutir en el tipo de anticuerpo utilizado, y esto, a su vez, puede producir variaciones en las concentraciones virales en diferentes especies y sus hospedantes (Mink, 1981). En un estudio realizado por Nourinejhad-Zarghani *et al.* (2022) demuestran que la concentración viral en los inóculos obtenidos de *N. benthamiana* y *N. clevelandii*, varían de acuerdo con el hospedante, lo que sugieren que antes de la cuantificación de la eficacia del producto químico evaluado, es necesario determinar la carga viral inicial antes de los tratamientos, y después la determinación de la carga restante.

La aplicación del ClO₂ en plantas inoculadas con diferentes diluciones de ToBRFV redujo significativamente los síntomas en fruto, así como aumentó el tamaño. Se puede observar que en plantas inoculadas con la dilución 1×10^{-3} expresó síntomas severos de moteados y maduración irregular, en frutos inoculados con $1 \times 10^{-3.5}$ a $1 \times 10^{-4.5}$ presentaron moteados leves y maduración irregular, mientras que en frutos cosechados de plantas inoculadas con 1×10^{-5} expresaron mínimos de síntomas de decoloración. El control positivo, infectado con una concentración viral de 1×10^1 expresó síntomas severos en frutos de moteados, maduración irregular y en mayores caso rugosidades color marrón., afectando en gran parte la calidad de los frutos.

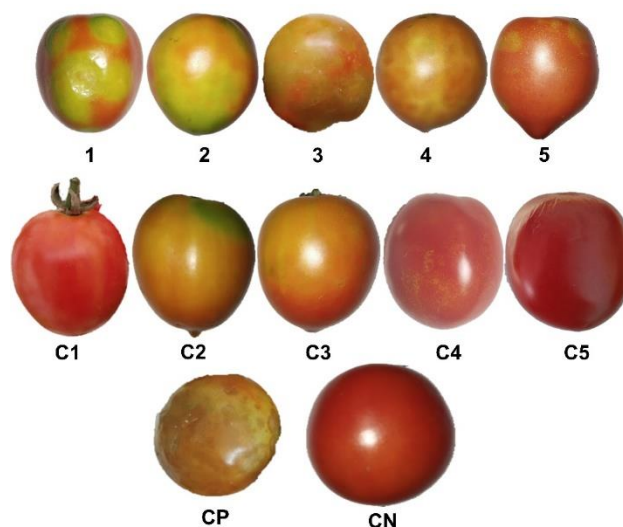


Figura 7. Diferentes síntomas expresados en frutos cosechados de tomate inoculados con diluciones de ToBRFV, con y sin aspersión del dióxido de cloro bajo condiciones de invernadero. Plantas no tratadas con ClO_2 , se representan de la siguiente manera, 0: fuente de inóculo (F.I.); 1: 1.5 m de F.I; 2: 3 m de F.I... 10: 15 m de F.I. Plantas asperjadas con ClO_2 : C0: Fuente de inóculo (F.I.); 1: 1.5 m de F.I; 2: 3 de F.I...10. 15 m de F.I.

3.1. Efecto del ToBRFV en los parámetros agronómicos de plantas de tomate cultivado en invernadero

Nuestros resultados demuestran que el ClO_2 mejoró las variables agronómicas correspondientes al número de flores (NFL), número de frutos (NFR) y Rendimiento. El ClO_2 redujo levemente el NFL (6.39%) cuando se inoculó una concentración viral de 1×10^{-5} , en cambio cuando no se trató con ClO_2 se redujo en (10.08%). Mientras que, con la dilución de 1×10^{-3} , la aplicación del ClO_2 solo mejoró en un 0.52% el NFL, no expresando diferencia estadística. El tratamiento del ClO_2 aumentó el NFR en 37.69% con la dilución de 1×10^{-5} a comparación de las plantas que recibieron tratamiento, de acuerdo con el CN (plantas sanas). En cambio, con la concentración viral de 1×10^{-3} , la aplicación del ClO_2 sólo mejoró en 10.1% a comparación de las plantas no tratadas con la misma concentración viral. Mientras que el ClO_2 aumentó el NFR en 46.01% a comparación del CP (1×10^1). En el rendimiento, la aplicación del ClO_2 produjo pérdidas de 2.49%

utilizando una concentración de viral de 1×10^{-5} , mientras que no aplicar, expresó 45.88% de pérdidas en rendimiento. A una concentración viral de 1×10^{-3} las perdidas expresaron un 54.14%, mientras que el tratamiento del ClO_2 mejoró las perdidas en 7.08%. El dióxido de cloro no sólo mejoró el rendimiento sino también el número y el tamaño, lo cual repercutió en el rendimiento, a comparación de plantas no tratadas con ClO_2 .

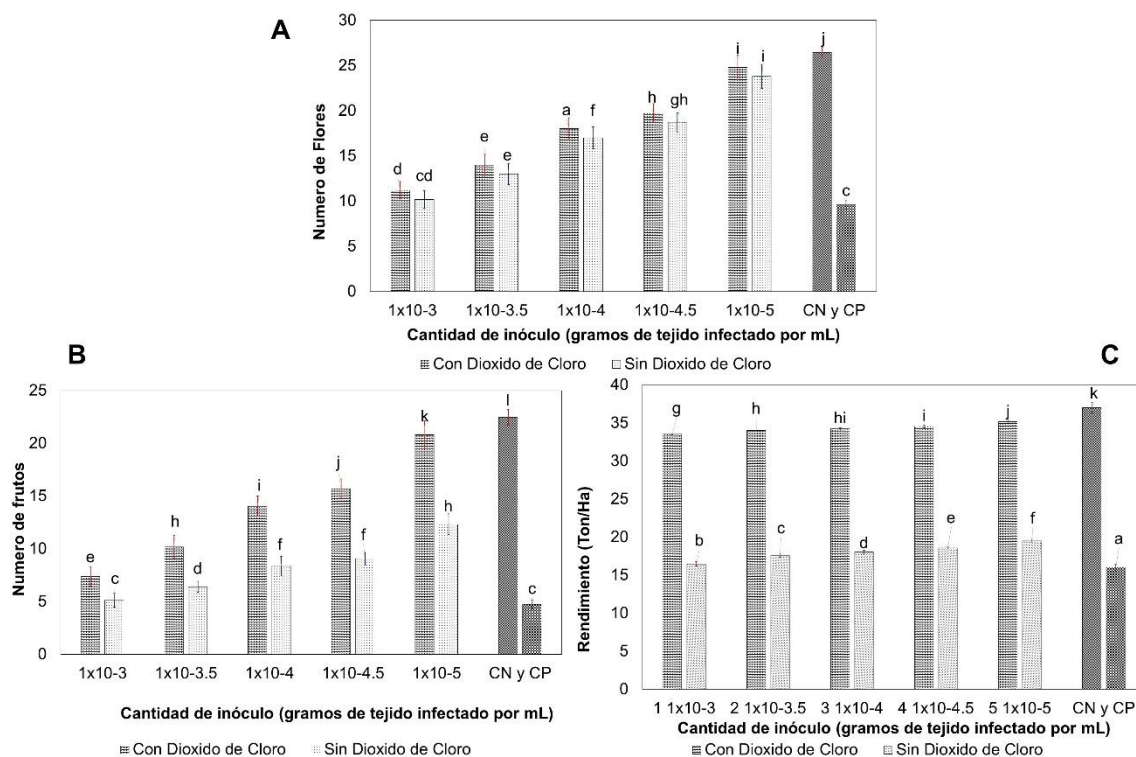


Figura 8. Efecto de ToBRFV en parámetros agronómicos de tomate con aspersiones de dióxido de cloro, en plantas inoculadas con diferentes diluciones virales bajo invernadero (1×10^{-3} a 1×10^{-5}). CN: control negativo; CP: control positivo. A) efecto de ToBRFV en el número de flores; B) efecto de ToBRFV en el número de frutos; C) Impacto de ToBRFV en el rendimiento (Ton Ha^{-1}). Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$).

La evaluación de diferentes concentraciones de ToBRFV y la repercusión sobre parámetros agronómicos de la planta, contribuye a la toma decisiones para el manejo del virus. En un trabajo realizado por Vasquez-Gutierrez *et al.* (2024)

evaluaron diferentes diluciones del ToBRFV y el impacto en parámetros agronómicos de plantas de tomate, ellos atribuyen que quizá ToBRFV se comporta como asintomático a una dilución de 1×10^{-6} pero muestra actividad viral medida por densidad óptica (Concentración viral). En este estudio me enfoqué en conocer el impacto del ToBRFV en el rendimiento a través de inoculaciones de ToBRFV con diferentes diluciones y la aplicación del ClO_2 para reducir la carga viral.

3.2. Efecto del ToBRFV en parámetros agronómicos de plantas de tomate cultivado a cielo abierto

Las plantas de tomate cultivadas en campo, tratadas con ClO_2 a 760 ppm, produjeron un efecto positivo en algunos parámetros evaluados. Se observó una relación en el número de flores (NFL) respecto a la distancia de la fuente de inóculo (F.I.) (Figura 9 A), a excepción de una distancia a los 9 m de la F.I. En cambio, las plantas que no se asperjaron dióxido de cloro no mostraron un efecto respecto al avance del patógeno en correlación con la transmisión del ToBRFV durante el manejo de la planta, pero si a comparación de las plantas asperjadas con ClO_2 . El número de frutos (NFR) cosechados mostraron una tendencia respecto a la transmisión del patógeno en las plantas de tomate. En plantas ubicadas al inicio de los surcos consideradas como fuente de inóculo (F.I), tratadas con ClO_2 mostraron 12.95, en cambio la F.I de plantas no tratadas expresaron 12.2. El ClO_2 produjo un efecto sustantivo a las distancias de F.I (1.5, 3 y 4.5), donde NFR aumentó de (27.15, 29.8 y 31.6), en comparación con plantas sin tratamiento que mostraron NFR de (12.85, 15.75, 17.3). Es decir, la cantidad de frutos aumentó con las aspersiones de ClO_2 , en correlación con el avance de ToBRFV a partir de la F.I, respecto a la distancia.

El rendimiento extrapolado a una densidad de plantación de 37,037 plantas por hectárea mostró un incremento significativo en las plantas asperjados con ClO_2 . Es decir, en plantas situadas al inicio del surco (F.I) mostraron un rendimiento promedio de 45.7 Ton Ha^{-1} , seguido de las distancias lejanas a F.I. (1.5, 3.0, 4.5 y 15m) mostraron un rendimiento de 144.3, 147.3, 160.1 y $241.8 \text{ Ton Ha}^{-1}$. En

comparación con plantas de tomate no tratadas mostraron rendimientos en la fuente de inóculo (42.8 Ton Ha⁻¹) y a las distancias de F.I (1.5, 3, 4.5 y 15 m) expresaron 52.8, 70.6, 72.6 y 160.6. Por otro lado, el control negativo, plantas no inoculadas con ToBRFV mostraron un rendimiento de 290 Ton Ha⁻¹. Estos resultados demuestran que el ClO₂ a 760 ppm no solamente reduce la transmisión y la concentración del ToBRFV, sino también aumenta el rendimiento en plantas de tomate híbrido Yüksel Y172-300 F1 bajo condiciones de campo.

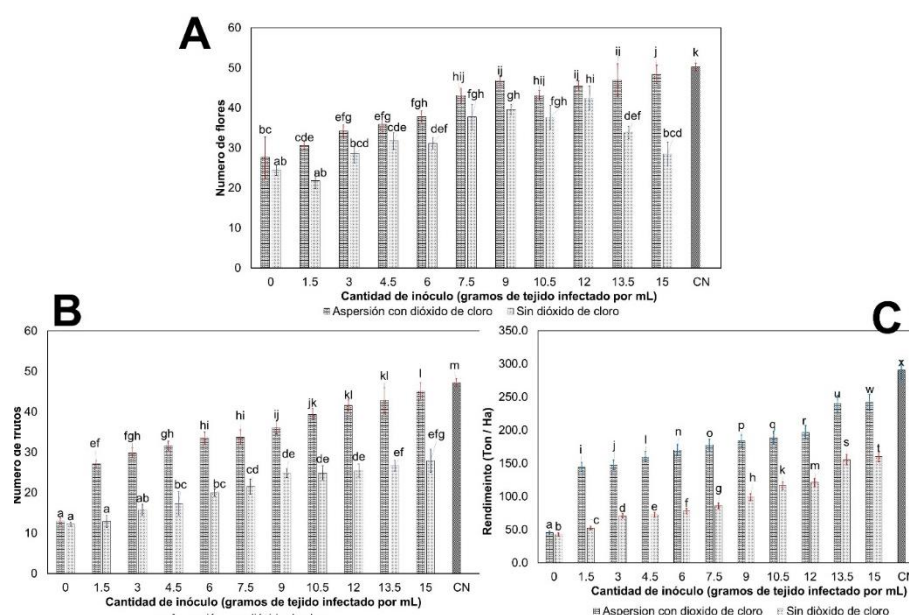


Figura 9. Efecto del ToBRFV con aspersiones de dióxido de cloro en tomate cultivado a cielo abierto. A) efecto de ToBRFV en el número de flores; B) efecto de ToBRFV en el número de frutos; C) Impacto de ToBRFV en el rendimiento (Ton/Ha). 0: plantas de tomate inoculadas con 1×10^1 y utilizadas como fuente de inóculo; 1.5 a 15: distancia a partir de la fuente de inóculo. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$).

Por mucho tiempo el dióxido de cloro se ha utilizado como desinfectante antiviral, en un estudio por Kim *et al.* (2016) reportan que el ClO₂ puede inhibir la transmisión de *Tobacco mosaic virus*, reduciendo significativamente los síntomas virales, así como el *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV) donde redujo totalmente su actividad viral. En otro estudio por Scarlett *et al.*

(2016) reportan la efectividad del ClO_2 para la desinfección de agua de riego en el cultivo de especies vegetales, de hasta un 99% contra bacterias fitopatógenas. Por otro lado, Wang *et al.* (2024) aplicaron ClO_2 en aguas residuales que se utilizaron para irrigar lechuga (*Lactuca sativa* L.) y con esto evaluar la inactivación de norovirus humanos (NoV GI y Nov GII) como resultados obtuvieron que los norovirus no se detectaron en las hojas, pero tampoco el ClO_2 controló a los virus. En otros estudios Tian *et al.* (2022) revelan que el ClO_2 no sólo se puede utilizar como compuestos antivirico, sino también posee un efecto positivo en la regulación del crecimiento de las plantas (RCP), donde la aplicación de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de ClO_2 logró la regeneración del crisantemo, induciendo raíces y brotes en tres semanas, así como parámetros agronómicos y bioquímicos como: yemas axilares, biomasa, numero de raíces y longitud de raíces. Kim *et al.* (2016) determinaron que el ClO_2 podría estar asociado a la citotoxicidad y este a su vez a la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Las ERO poseen funciones especiales como: modulación y señalización celular, inducción de respuestas mito génicas. Esto significa que a concentraciones menores, las ERO defienden contra patógenos infecciosos. Mientras que altas concentraciones de ERO, pueden alterar la función celular normal y promover un daño irreversible contra los lípidos, ácidos nucleicos y proteínas celulares. Con esto se puede asumir que el aumento de ERO sucede en consecuencia de la citotoxicidad lo que conlleva a la inactivación del ToBRFV en el hospedante (Carvajal *et al.*, 2019). Kim *et al.* (2016) discuten que el dióxido de cloro posee actividades anticancerígenas probablemente debido a la actividad inductora de la producción de ERO.

3.3. Estimación de pérdidas en rendimiento de plantas de tomate cultivas a cielo abierto (50 dpi)

El modelo que mostró mayor ajuste de acuerdo con el coeficiente de determinación (0.95) fue el modelo planteado Berger (1985). Donde la ecuación linealizada: $\ln\left(\frac{y}{1-y}\right)$ mostró una tasa de infección aparente, o pendiente de la línea (r) de 0.0841, con una cantidad de enfermedad inicial (Y_0) de: 0.0257207.

Vardeplank, (1963) plantean que cuando r , se acerca 0, es decir disminuye, Y_0 , aumenta y se acerca a 1. Nuestro modelo de Berger explica lo opuesto. A medida que r se acerca a "0", " Y_0 " se aleja de 1. Se puede decir que la pendiente de la línea (r), en este caso "la concentración viral de infección por ToBRFV disminuye", la cantidad de enfermedad inicial ($Y_0=0.0257207$) aumenta conforme a las pérdidas en rendimiento (PR) (eje de las X).

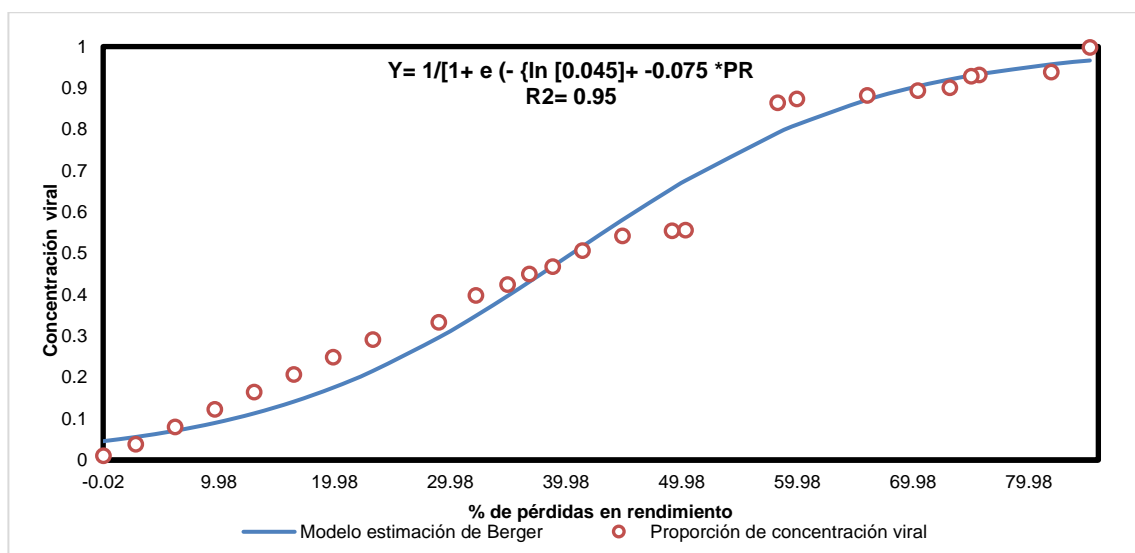


Figura 10. Ajuste del modelo Berger para la estimación de pérdidas en rendimiento a partir de la concentración viral con la aspersión de dióxido de cloro (50 dpi) en campo abierto. PR: pérdidas en rendimiento.

Considerando una distancia entre planta de 0.30 m y una distancia entre surco de 0.9 m, se extrapoló el experimento a hectáreas de tomate cultivado, con una densidad de 37, 037 plantas por hectárea. Nuestro modelo de estimación de la concentración viral, a partir del % de pérdidas producidas por el ToBRFV permite comprender la concentración viral respecto a ToBRFV a los 50 dpi. Es importante estimar las pérdidas en virus de importancia económica, tal es el caso de tomato brown rugose fruit virus en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Por ello la importancia de ajustar modelos de pérdidas en rendimiento, a partir de la concentración viral, para predecir el impacto del virus en el cultivo de tomate, y así facilitar la toma de decisiones y predecir las pérdidas económicas, para el manejo del cultivo (Wu *et al.*, 1995).

3.5. Lesiones locales producidas por ToBRFV

Nuestros resultados demuestran una diferencia significativa entre tratamientos, en hojas inoculadas de *Nicotiana longiflora*, provenientes de extractos de plantas infectadas con diferentes diluciones de ToBRFV con y sin la aspersión de ClO_2 . A lo que respecta, el factor 1: extracto de plantas tratadas con 760 ppm de ClO_2 , e inoculadas a hojas de *N. longiflora*, produjeron una menor cantidad de lesiones locales necróticas (LLN). Las hojas inoculadas con 1×10^{-3} , $1 \times 10^{-3.5}$, 1×10^{-4} y 1×10^{-5} presentaron 6.1, 5.1, 3.9 y 1.95 LLN (Figura 10). Por el contrario, el factor 2: extracto de plantas no tratadas con ClO_2 expresaron una mayor cantidad de lesiones locales necróticas. A 1×10^{-3} , $1 \times 10^{-3.5}$, 1×10^{-4} y 1×10^{-5} , las hojas de *N. longiflora* presentaron lesiones de 18.9, 15.2, 11.3 y 4.5. Mientras que las LLN producidas por el extracto inoculado provenientes de plantas de tomate consideradas fuente de inóculo (1×10^1), mostraron 36.29 LLN. Esto explica dos situaciones; la primera, a mayor cantidad de inóculo, habrá mayor concentración viral (DO) y un mayor número de LLN. Segunda, las 760 ppm de dióxido de cloro aplicadas un día posterior a la inoculación en plantas de tomate del ensayo en invernadero, fueron capaz de reducir significativamente la carga viral, lo que repercutió en la aparición de LLN en *Nicotiana longiflora*.

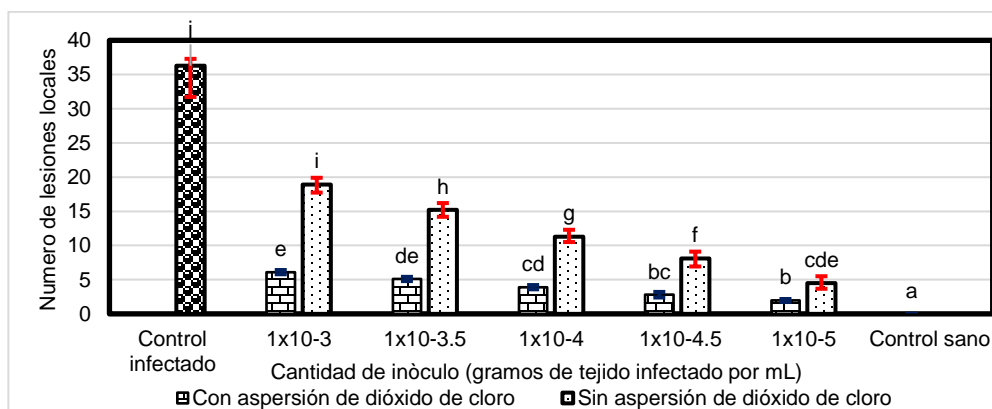


Figura 11. Cuantificación de ToBRFV a partir de lesiones locales necróticas en plantas de *N. longiflora*, con la aplicación del ClO_2 . LLN: lesiones locales necróticas. Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.01$). Control infectado (planta inoculada con 1×10^1 de sabia infectiva); plantas inoculadas con diferentes diluciones en serie (1×10^3 a 1×10^5).

3.6. Estimación de lesiones locales necróticas ante la infección de ToBRFV

Es importante ajustar modelos para la estimación y cuantificación de lesiones locales (LLN). El ajuste de un modelo exponencial cuya ecuación linearizada: $\ln(y) = \ln(0.043) + [0.9149 \cdot C]$, permite estimar las LLN a partir de la concentración viral en plantas de tomate, tras la colecta de muestras 50 dpi. Donde la aparición de lesiones locales necróticas tuvo una pendiente de la recta de ($rE = 0.91$), casi cercano a 1, y una cantidad inicial de ToBRFV ($Y_0 = 0.0437572$), lo que indica un mayor incremento de las lesiones locales necróticas conforme a la tasa absoluta de cambio (r) con respecto a la concentración viral (DO) expresado en planta de tomate. El modelo exponencial se utiliza en mayoría para describir etapas muy tempranas de una epidemia policíclica cuando Y_0 es menor a 0.05 y el hospedante evaluado no es limitado. Por lo regular no se adapta para el crecimiento de una epidemia, debido a que ninguna enfermedad se puede comportar exponencialmente. Debido a lo mencionado el ajuste del modelo exponencial facilitó la comprensión de la concentración viral en la planta y las lesiones locales necróticas expresadas en hojas de *Nicotiana longiflora*.

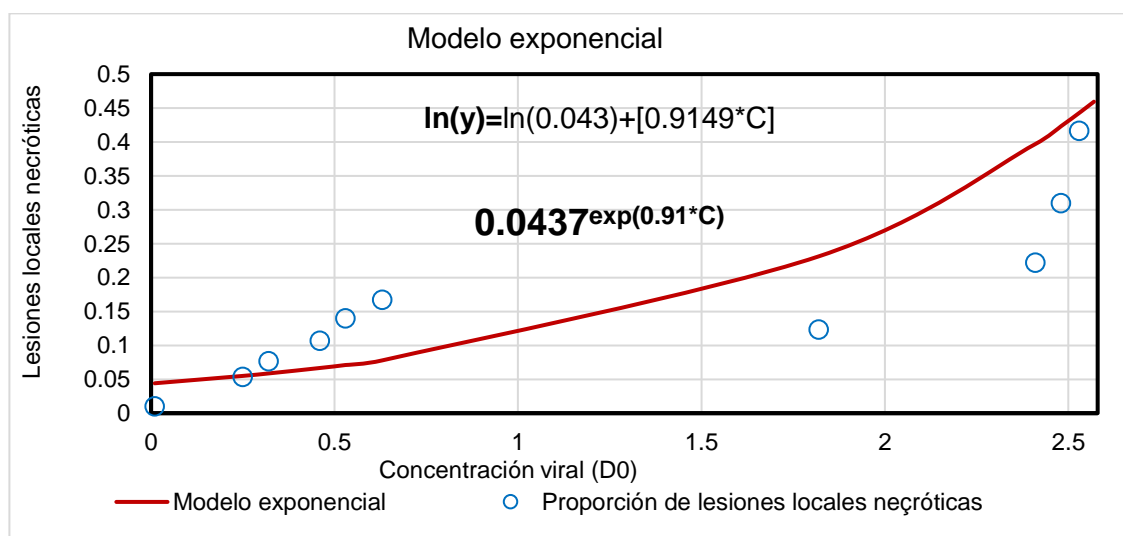


Figura 12. Modelo exponencial para la estimación de cuantificación de lesiones locales ante el efecto de ToBRFV. DO: densidad óptica; C: concentración viral.

La necesidad de cuantificar el progreso del daño acumulado por epidemias que afectan cultivos de importancia ha cobrado relevancia desde la aparición de enfermedades patogénicas. Los virus de plantas se han caracterizado por causar epidemias incontrolables debido a la falta de métodos de control. Madden y Campbell (1990) mencionaron que la forma fundamental de representar una epidemia por enfermedades en plantas es trazar el nivel de la enfermedad en varios momentos o distancias. A este modelamiento lo llamó “curva del progreso de la enfermedad, donde resumen la interacción hospedero-patógeno y el medio ambiente en el que se desarrolla la enfermedad. Nutter (1997) discutió modelos de crecimiento poblacional lineal: monomolecular, exponencial, logístico y de Gompertz para la dinámica temporal de virus de plantas. Madden and Hughes (2000) desarrollaron un enfoque general de predicción de pérdidas de rendimiento con relación a la infección de *Soybean mosaic virus*.

ToBRFV ha cobrado relevancia debido a la falta de compuestos antivirales capaces de reducir la infección del ToBRFV en invernadero y campo abierto.

Algunos trabajos se centran en estudiar partes críticas que contribuyen a la diseminación del ToBRFV en invernadero y campo abierto. Ehlers *et al.* (2022a) proponen el desinfectante Menno Florades cuyo ingrediente activo es el ácido de benzoico, capaz de inactivar al virus, en alfombras, zuelas de zapato, herramientas, superficies de fierro y aluminio, para cuantificar su efectividad se contabilizaron el número de lesiones locales necróticas y se compararon con los testigos. En un estudio reciente Nissin *et al.* (2023) evaluaron recubrimientos nominados con anti-biopelículas formulados a partir de recubrimientos finos de silano-fosfonio sobre películas poliméricas (polipropileno) y SiO₂ que mostraron eficacia antiviral, eliminando la aparición de lesiones locales necróticas en hojas de tabaco. En su gran mayoría, los trabajos realizados contabilizan el número de lesiones locales y de esta forma evalúan la efectividad antiviral entre tratamientos evaluados.

Dommes *et al.* (2019) mencionan que, aunque el ensayo biológico siempre ha sido de poca importancia en la cuantificación de virus, por la sensibilidad y la forma de evaluación, no es posible comparar con técnicas moleculares. El

establecimiento de bioensayos con un número determinado de partículas infecciosas que sea similar a la dosis infectiva o valores más bajos que puedan detectarse con la concentración más baja, contribuye a la aplicación válida de esta técnica. Por ello los ensayos de lesiones locales reducen cuidadosamente variables como: porcentaje de error en el hospedante, condiciones ambientales, edad de la planta, nutrición, ciclo de la luz y otros factores claves que contribuyen a aumentar la afectividad de los tratamientos evaluados. Mantener las plantas en oscuridad 24h antes de la inoculación aumenta la aparición de lesiones locales, así mismo los tampones de inoculación contribuyeron a la formación de lesiones (Roberts, 1964). Nourinejhad Zarghani *et al.* (2022) sugieren que, si se comparan las fuentes de inóculo antes del ensayo con un análisis de varianza para determinar la significancia entre los tipos de inóculos y descartar la variabilidad en el número de lesiones locales, contribuye a un mejor resultado. También sugieren que la aleatorización es importante entre hojas y plantas, aunque todas pertenezcan a la misma edad fenológica, en el caso de la posición de la hoja (media hoja) utilizada como repetición no puede afectar el número de lesiones inducidas por ToBRFV en *N. tabacum*, y *N. glutinosa*, pero sí, diferencias entre hospedantes. En la actualidad sólo se ha reportado un modelo de estimación de lesiones locales que cuantifican las lesiones locales: curva de crecimiento y modelo Kleczkowski.

CONCLUSIONES

1. El dióxido de cloro menor a 760 ppm no produjo fitotoxicidad.
2. El ClO_2 redujo 2.5 veces la transmisión de ToBRFV a partir de la fuente de inóculo
3. El ClO_2 redujo la replicación de ToBRFV en 48 % (campo abierto) y 81 % (invernadero).
4. El ClO_2 redujo las pérdidas en rendimiento en 48 % (campo abierto y 85 % (invernadero).
5. El modelo de Berger permite estimar las pérdidas ocasionadas a los 55 días del cultivo (infección).

REFERENCIAS

- Abdelkhalek, A. (2019). Expression of tomato pathogenesis related genes in response to Tobacco mosaic virus. *The Journal of Animal y Plant Sciences*, 29(6), 1596-1602. Recovered de <http://www.thejaps.org.pk/docs/v-29-06/11.pdf>.
- Adams, M.J., Adkins, S., Bragard, C., Gilmer, D., Li D., MacFarlane, SA., Wong SM., Melcher U., Ratti C., Ryu KH y Consortium IR. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Virgaviridae*. *Journal of General Virology* 98(8): 1999-2000. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000884>
- Aghamohammadi, V., Rakhshandehroo, F., y Palukaitis, P. (2013). Distribution and genetic diversity of Tomato mosaic virus isolates in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 95, 339-347. doi:10.4454/JPP.V95I2.030
- Aiweasaku, P., y Katzourakis A. (2016). Time-dependent rate phenomenon in viruses. *Journal of virology*, 90 (16), 7184-7195. <https://doi.org/10.1128/jvi.00593-16>
- Akhter, M. S., Akanda, A. M., Kobayashi, K., Jain, R. K., y Mandal, B. (2019). Plant virus diseases and their management in Bangladesh. *Crop Protection*, 118, 57-65. 10.1016/j.cropro.2018.11.023
- Alfaro-Fernández, A., Castillo, P., Sanahuja, E., Rodríguez-Salido, M.C., y Font, M.I. (2021). First report of Tomato brown rugose fruit virus in tomato in Spain. *Plant Disease* 105(2): 515. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1251-PDN>
- Alkowni, R., Alabdallah, O., y Fadda, Z. (2019). Molecular identification of Tomato Brown rugose fruit virus in tomato in Palestine. *Journal of Plant Pathology*, 101, 719-723. 10.1007/s42161-019-00240-7
- Ashkenazi, V., Rotem, Y., Ecker, R., Nashilevitz, S., Barom, N. (2018). Tolerance in plants of *Solanum lycopersicum* to the tobamovirus tomato brown rugose fruit virus (TBRFV). *Patentscope*. 38. <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2018219941>
- Avni, B., Gelbart, D., Sufrin-Ringwald, T., Zinger, A., Chen, L., Machbash, Z., Bekelman, I., Segoli, M., Dombrovsky, A., Kamenetsky, R., Levin, I., y Lapidot, M. (2021). Tomato genetic resistance to tobamoviruses is compromised. *SHS Acta Horticulturae* 1316: 89-98. 10.17660/ActaHortic.2021.1316.13
- Berger, R.D., y Jones, J. W. (1985). A general model for disease progress with functions for variable latency and lesion expansion on growing host plants. *Phytopathology*, 75(7), 792.
- Camacho-Beltrán, E., Pérez-Villarreal, A., Pérez-Leyva, N.E., Rodríguez-Negrete, E.A., Cenicerós-Ojeda, E.A., and Méndez-Lozano, J. 2019. Occurrence of Tomato

- brown rugose fruit virus infecting tomato crops in Mexico. *Plant Disease* 103(6): 10.1094/PDIS-11-18-1974-PDN
- Cambrón-Crisantos, J.M., Rodríguez-Mendoza J, Valencia-Luna J B, Alcasio-Rangel S, García-Ávila, CJ, López-Buenfil, JA, and Ochoa-Martínez, DL. 2019. First report of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(1): 185-192. 10.18781/R.MEX.FIT.1810-5
- Caruso, A.G., Bertacca, S., Parrella, G., Rizzo, R., Davino, S., y Panno, S., (2022). Tomato brown rugose fruit virus: A pathogen that is changing the tomato production worldwide. *Annals of Applied Biology* 181 (3): 258 – 274. <https://doi.org/10.1111/aab.12788>
- Carvajal, C.C., (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100.
- Cavallini, L. F. A. (1998). *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. Editorial Universidad de Costa Rica.
- Chanda, B., Shamimuzzaman, M., Gilliard, A. *et al.* Effectiveness of disinfectants against the spread of tobamoviruses: Tomato brown rugose fruit virus and Cucumber green mottle mosaic virus. *Virolog Journal* 18, 7 (2021). <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01479-8>
- Choi, G., Oh, J., Cho, I., Ju, H., Hu, W., Kim, B., ... Hammond, J. (2019). Full-length infectious clones of two new isolates of Tomato mosaic virus induce distinct symptoms associated with two differential amino acid residues in 128-kDa protein. *The Plant Pathology Journal*, 35(5), 538-542. 10.5423/PPJ.NT.12.2018.0286
- Davino, S., Caruso, A. G., Bertacca, S., Barone, S., y Panno, S. (2020). Tomato brown rugose fruit virus: Seed transmission rate and efficacy of different seed disinfection treatments. *Plants*, 9 (11), 1615. <https://doi.org/10.3390/plants9111615>
- Dombrovsky, A., Tran-Nguyen, L.T.T., y Jones, R. (2017a). Cucumber green mottle mosaic virus: rapidly increasing global distribution, etiology, epidemiology, and management. *Annual Reviews Phytopathology* 55: 231–256. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035349>
- Dommes, A.B., Gross, T., Herbert, D.B., Kivivirta, K.I., Becker, A. (2019). Virus-induced gene silencing: Empowering genetics in non-model organisms. *J. Exp. Bot.* 70, 757–770.
- Eads, A., Groth-Helms, D., Davenport, B., Cha, X., Li, R., Walsh, C., y Schuetz, K. (2023). The commercial validation of three tomato brown rugose fruit virus assays. *PhytoFrontiers*, 3 (1), 206-213. <https://doi.org/10.1094/PHYTOFR-03-22-0033-FI>

- Ehlers, J., Nourinejhad, Z.S., Kroschewski, B., Büttner, C., y Bandte, M. (2022a). Cleaning of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) from Contaminated Clothing of Greenhouse Employees. *Horticulturae* 8(751). <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080751>
- Ehlers J, Nourinejhad, Z.S., Kroschewski, B., Büttner, C., y Bandte, M., (2022b). Decontamination of Tomato Brown Rugose Fruit Virus-Contaminated Shoe Soles under Practical Conditions. *Horticulturae* 2(8): 1210. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121210>
- Eichmeier, A., Hejlova, M., Orsagova, H., Frejlichova, L., Hakalova, E., Tomankova, K., Linhartova, S., Kulich, P., Cermak, V., y Cechova, J. (2023). Characterization of Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV) Detected in Czech Republic. *Diversity* 15: 301. <https://doi.org/10.3390/d15020301>
- Eldan, O., Ofir, A., Luria, N., Klap, C., Lachman, O., Bakelman, E., Belausov, E., Smith, E., y Dombrovsky, A. (2022). Pepper Plants Harboring L Resistance Alleles Showed Tolerance toward Manifestations of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Disease. *Plants* 11: 2378. <https://doi.org/10.3390/plants11182378>
- EPPO. Global Database. (2021). Taxon. ToMMV. Distribution, 29/03/21. Acceso: 7 de junio de 2021. <https://gd.eppo.int/taxon/TOMMV0/distribution>
- EPPO. (2023) Tomato brown rugose fruit virus. Available at: EPPO Global database Distribution World: <https://gd.eppo.int/taxon/TOBRFV/distribution> [Accessed 14th April 2023].
- Espinoza-Arellano, J. J., Fabela-Hernández, A. M., Gaytán-Mascorro, A., Reyes-González, A. y Sánchez-Toledano, B. I. (2023). Cuantificación y uso de pérdidas de alimentos: caso del melón cantaloupe en una región del norte-centro de México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 14(2), 159-170. Epub 19 de junio de 2023. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i2.2962>
- Espinoza-Arellano, J.J., Orona-Castillo, I., Guerrero-Ramos, L. A., Molina-Morejón, V.M., y Ramírez-Quiroga, E.C. (2019). Análisis del financiamiento, comercialización y rentabilidad del cultivo del melón con enfoque de “siembras por etapas” en la Comarca Lagunera de Coahuila, México. *CienciaUAT*, 13(2), 71-82. <https://doi.org/10.29059/cienciauat.v13i2.1054>
- Firdous, N., Khan, M. R., Butt, M. S., y Shahid, M. (2020). Application of aloe vera gel based edible coating to maintain postharvest quality of tomatoes. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 57(1), 245-249. doi:10.21162/PAKJAS/20.7746
- González-Concha, L.F., Ramírez-Gil, J.G., Mora-Romero, G.A., García-Estrada, R.S., Carrillo-Fasio, J.A., y Tovar-Pedraza, J.M. 2023. Development of a scale for assessment of disease severity and impact of tomato brown rugose fruit virus on

- tomato yield. *European Journal of Plant Pathology* 165 (3): 579-592.
<https://doi.org/10.1007/s10658-022-02629-0>
- González-Concha, L. F., Ramírez-Gil, J. G., García-Estrada, R. S., Rebollar-Alviter, Á., y Tovar-Pedraza, J. M. (2021). Spatiotemporal analyses of tomato brown rugose fruit virus in commercial tomato greenhouses. *Agronomy*, 11(7), 1268.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11071268>
- González-Garza, R. (2017). Evolución de técnicas de diagnóstico de virus fitopatógenos. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 591-610.
- Hak, H. y Spiegelman Z. 2021 The tomato brown rugose fruit virus movement protein overcomes Tm-22 resistance in tomato while attenuating viral transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 34: 1024–1032.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-01-21-0023-R>
- Ilahy, R., Siddiqui, M. W., Tlili, I., Montefusco, A., Piro, G., Hdider, C., ... Montefusco, A. (2018). When color really matters: Horticultural performance and functional quality of high-lycopene tomatoes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 37(1), 15-53.
 10.1080/07352689.2018.1465631
- Iobbi, V., Santoro, V., Maggi, N., Giacomini, M., Lanteri, A. P., Minuto, G., ... y Drava, G. (2023). Characterization of sulfur compounds and antiviral activity against Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) of Italian “Vessalico” garlic compared to other cultivars and landrace. *LWT*, 174, 114411.
- Iobbi, V., Lanteri, A.P., Minuto, A., Santoro, V., Ferrea, G., Fossa, P., Bisio, A. (2022). Autoxidation Products of the Methanolic Extract of the Leaves of *Combretum micranthum* Exert Antiviral Activity against Tomato Brown Rugose Fruit Virus (ToBRFV). *Molecules* 27,760. <https://doi.org/10.3390/molecules27030760>
- Jefri, U. H. N. M., Khan, A., Lim, Y. C., Lee, K. S., Liew, K. B., Kassab, Y. W., Choo, C. Y., Al-Worafi, Y. M., Ming, L. C., y Kalusalingam, A. (2022). A systematic review on chlorine dioxide as a disinfectant. *Journal of medicine and life*, 15(3), 313–318.
<https://doi.org/10.25122/jml-2021-0180>
- Jeger, M. J., Madden, L. V., y Bosch, F. V. D. (2018). Plant virus epidemiology: Applications and prospects for mathematical modeling and analysis to improve understanding and disease control. *Plant Disease*, 102, 837-854.
 doi:10.1094/PDIS- 04-17-0612-FE.
- Jewehan, A., Salem, N., Tóth, Z. (2022b). Screening of *Solanum* (sections *Lycopersicon* and *Juglandifolia*) germplasm for reactions to the tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129, 117–123.
<https://doi.org/10.1007/s41348-021-00535-x>

- Jewehan, A., Salem, N., Tóth, Z. Evaluation of responses to tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) and selection of resistant lines in *Solanum habrochaites* and *Solanum peruvianum* germplasm. *J Gen Plant Pathol.* 2022, 88, 187–196. <https://doi.org/10.1007/s10327-022-01055-8>
- Jin, M., Shan, J., Chen, Z., Guo, X., Shen, Z., Qiu, Z. (2013) Chlorine dioxide inactivation of enterovirus 71 in water and its impact on genomic targets. *Environ Sci Technol* 47, 4590–7.
- Kabas, Aylin., Fidan H., Kucukaydin., Huseyin, y Atan, H.N. (2022). Screening of wild tomato species and interspecific hybrids for resistance/tolerance to Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV). *Chilean journal of agricultural research*, 82(1), 189-196. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392022000100189>
- Kim, Y., Kumar, S., Cheon, W., Eo, H., Kwon, H., Jeon, Y., ... Kim, W. (2016, March 31). Anticancer and Antiviral Activity of Chlorine Dioxide by Its Induction of the Reactive Oxygen Species. *Journal of Applied Biological Chemistry*. Korean Society for Applied Biological Chemistry. <https://doi.org/10.3839/jabc.2016.007>
- Klap, C., Luria, N., Smith, E., Bakelman, E., Belausov, E., Laskar, O., y Dombrovsky, A. (2020). The Potential Risk of Plant-Virus Disease Initiation by Infected Tomatoes. *Plants*, 9(5), 623. <https://doi.org/10.3390/plants9050623>
- Klap, C., Luria, N., Smith, E., Hadad, L., Bakelman, E., Sela, N., . . . Dombrovsky, A. (2020a). Tomato Brown Rugose Fruit Virus Contributes to Enhanced Pepino Mosaic Virus Titers in Tomato Plants. *Viruses*, 12 (8), 879. 10.3390/v12080879.
- Kone, N., Asare-Bediako, E., Silue, S., Kone, D., Koita, O., Menzel, W., Winter, S. (2017). Influence of planting date on incidence and severity of viral disease on cucurbits under field condition. *Annals of Agricultural Sciences* 2017, 62(1), 99-104. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2017.05.005>
- Levitzky, N., Smith, E., Lachman, O., Luria, N., Mizrahi, Y., Bakelman, H., ... y Dombrovsky, A. (2019). El abejorro *Bombus terrestris* lleva un inóculo primario del virus de la fruta rugosa marrón del tomate que contribuye a la propagación de enfermedades en los tomates. *PloS ONE* 14 (1), e0210871.
- Li, Y., Tan, G., Lan, P., Zhang, A., Liu, Y., Li, R. y Li, F. 2018. Detection of Tobamoviruses by RT-PCR using a novel pair of degenerate primers. *Journal of Virological Methods*, 259: 122–128. 10.1016/j.jviromet.2018.06.012.
- Li, R., Baysal-Gurel, F., Abdo, Z. (2015). Evaluation of disinfectants to prevent mechanical transmission of viruses and a viroid in greenhouse tomato production. *Virol J* 12. <https://doi.org/10.1186/s12985-014-0237-5>

- Ling, K.S. (2021). Recent emergence of seed-borne viruses and viroids on tomato, seed health tests and their implications in global seed trade. *Acta Hort.* 1316, 127-134. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1316.18>
- Ling, K.S., Gilliard, A.C.; Zia, B. 2022. Disinfectants Useful to Manage the Emerging Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Greenhouse Tomato Production. *Horticulturae* 8, 1193. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121193>
- Lionetti, V., Raiola, A., Cervone, F. y Bellincampi, D. (2014). La expresión transgénica de los inhibidores de la pectina metilesterasa limita la propagación del tobamovirus en el tabaco y *A. rabidopsis*. *Patología vegetal molecular*, 15 (3), 265-274.
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., y Dombrovsky, A. (2017). A New Israeli Tobamovirus Isolate Infects Tomato Plants Harboring Tm-2² Resistance Genes. *PloS one*, 12 (1), e0170429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- Madden, L. V., Hughes, G., y Irwin, M. E. (2000). Coupling disease-progress-curve and time-of-infection functions for predicting yield loss of crops. *Phytopathology*, 90(8), 788-800.
- Madden, L.V., Campbell, C.L. (1990). Nonlinear Disease Progress Curves. In: Kranz, J. (eds) *Epidemics of Plant Diseases*. Ecological Studies, vol 13. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-75398-5_6
- Mani, K. A., Berenice, M., Cohen, R., Feldbaum-Amar, R., Dombrovsky, A., y Mechrez, G. (2024). Biocompatible antiviral Pickering emulsion-based formulation for plant root protection from tobamovirus-infected soil. *Polymers for Advanced Technologies*, 35(1), e6293.
- Menzel, W., y Winter, S. (2019). Identification of novel and known Tobamoviruses in tomato and other solanaceous crops using a new pair of generic primers and development of a specific RT-qPCR for ToBRFV. In VI International Symposium on Tomato Diseases: Managing Tomato Diseases in the Face of Globalization and Climate Change 1316: 143–148. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1316.20>
- Michael, V., Hagit, H., Tzahi, A., y Ziv, S. (2022). The Impact of Tobamovirus Infection on Root Development Involves Induction of Auxin Response Factor 10a in Tomato. *Plant and Cell Physiology* 63(12): 980–1993. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcab179>
- Mink, G. I., 19801367972, English, Journal article, 64, (7), *Plant Disease*, (691–694), Identification of rugose mosaic-diseased cherry trees by enzyme-linked immunosorbent assay. <https://doi.org/10.1094/PD-64-691>

- Mut, B. M. (2021). Detección de Tomato Mottle Mosaic virus en semilla comercial de tomate y pimiento. Universitat Politècnica de València. <http://hdl.handle.net/10251/173932>
- Nissim, M., Lline-Vul, T., Shoshani, S., Jacobi, G., Malka, E., Dombrovsky, A., ... y Margel, S. (2023). Synthesis and Characterization of Durable Antibiofilm and Antiviral Silane-Phosphonium Thin Coatings for Medical and Agricultural Applications. *ACS omega*, 8(42), 39354-39365.
- Nolasco-García LL, Marín-León, JL., Mireles-Arriaga AI, Ruiz-Nieto J. E and Hernández-Ruíz, J. 2022. Geographic areas susceptible to Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) in Guanajuato, Mexico. *Bioagro* 35(1): 13-20. <https://doi.org/10.51372/bioagro351.2>
- Nourinejhad Zarghani, S.; Monavari, M.; Ehlers, J.; Hamacher, J.; Büttner, C.; Bandte, M. Comparison of Models for Quantification of Tomato Brown Rugose Fruit Virus Based on a Bioassay Using a Local Lesion Host. *Plants* 2022, 11, 3443. <https://doi.org/10.3390/plants11243443>
- Nourinejhad-Zarghani, S.; Ehlers, J.; Monavari, M.; von Bargen, S.; Hamacher, J.; Büttner, C.; Bandte, M. Applicability of Different Methods for Quantifying Virucidal Efficacy Using MENNO Florades and Tomato Brown Rugose Fruit Virus as an Example. *Plants* 2023, 12, 894. <https://doi.org/10.3390/plants12040894>
- Nutter, J. F. W. (1997). Quantifying the temporal dynamics of plant virus epidemics: a review. *Crop Protection*, 16(7), 603-618. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(97\)00055-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(97)00055-0)
- Ogai, R., Kanda-hojo, A., y Tsuda, S. (2013). An attenuated isolate of Pepper mild mottle virus for cross protection of cultivated green pepper (*Capsicum annuum* L.) carrying the L-3 resistance gene. *Crop Protection*, 54, 29-34. [10.1016/j.cropro.2013.07.008](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.07.008)
- Ogata, N. (2007). Denaturation of protein by chlorine dioxide: oxidative modification of tryptophan and tyrosine residues. *Biochemistry* 46, 4898–911.
- Ojiambo, P. S., Yuen, J., Bosch, F. Van Den, y Madden, L. V. (2017). Epidemiology: Past, present, and future impacts on understanding disease dynamics and improving plant disease management – a summary of focus issue articles. *Phytopathology*, 107, 1092-1094. doi:10.1094/PHYTO-07-17-0248-FI
- Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M., y Teraoka, T. (2007). Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. *Plant Biotechnology*, 147, 135-147. [10.5511/plantbiotechnology.24.135](https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.135).

- Oladokun, J. O., Halabi, M. H., Barua, P., y Nath, P. D. (2019). Tomato brown rugose fruit disease: current distribution, knowledge, and future prospects. *Plant Pathology*, 68 (9), 1579–1586. [10.1111/ppa.13096](https://doi.org/10.1111/ppa.13096)
- Orona-Castillo, I., Del-Toro-Sánchez, C.L., Fortis-Hernández, M., Preciado-Rangel, P., Espinoza-Arellano, J. J., Rueda-Puente, E., Flores-Vázquez, M., y Cano-Ríos, P. (2022). Indicadores técnico-económicos de la producción del cultivo de tomate bajo agricultura protegida en la Comarca Lagunera, México. *Biotecnia*, 24(3), 70-76. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v24i3.1721>
- Ortiz-Martínez, L. E., Ochoa-Martínez, D. L., Rojas-Martínez, R. I., Aranda-Ocampo, S., y Cruz, M. Á. G. (2022). Respuesta de variedades de chile a la infección con Tomato brown rugose fruit virus. *Summa Phytopathologica*, 47, 209-215. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/250747>
- Ortiz-Martínez, L.E., Ochoa-Martínez, D.L. (2023). Elicitors and biostimulants in the production of tomato infected with Tomato brown rugose fruit virus. *Journal. Plant Disease Protection* 130: 351–360. <https://doi.org/10.1007/s41348-022-00693-6>
- Roberts, D. (1964). Local-lesion assay of plant viruses. In *Plant Virology*; Corbett, M.K., Sisler, H.D., Eds.; University of Florida Press: Gainesville, FL, USA, 1964; pp. 194–210
- Rodríguez-Mendoza, J., García-Ávila, C. D. J., López-Buenfil, J. A., Araujo-Ruiz, K., Quezada-Salinas, A., y Cambrón-Crisantos, J. M. (2019). Identification of Tomato brown rugose fruit virus by RT-PCR from a coding region of replicase (RdRP). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(2), 1-12. [10.18781/R.MEX.FIT.1902.6](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1902.6)
- Ruiz-Aguilar, M. Y., Montes-Molina, J. A., Castañón-González, J. H., Gutiérrez-Miceli, F. A., Hernández-Guzmán, M., López-López, H., Ruiz-Valdiviezo, V. M., y Villalobos-Maldonado, J. J. (2023). Uso de la harina del pez diablo (*Pterygoplichthys* spp.) en la fertilización orgánica del tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 39, 159-169. <https://doi.org/10.20937/RICA.54848>
- Salem, N., Mansour, A., Ciuffo, M., Falk, B.W y Turina, M. (2016). A new Tobamovirus infecting tomato crops in Jordan. *Archives of Virology* 161(2): 503–506. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2677-7>
- Salem, N. M., Sulaiman, A., Samarah, N., Turina, M., y Vallino, M. (2022). Localization and mechanical transmission of tomato brown rugose fruit virus in tomato seeds. *Plant Disease*, 106 (1), 275-281. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2413-RE>
- Sandoval-Cabrera, S. V., y Borja-Rodríguez, B. A. (2023). La naturaleza de los vínculos y el escalamiento en el subsector hortícola en México. *Economía: teoría y práctica*, (58), 145-171. <https://doi.org/10.24275/etypuam/ne/582023/sandoval>

- Scarlett, K., Collins, D., Tesoriero, L. *et al.* Efficacy of chlorine, chlorine dioxide and ultraviolet radiation as disinfectants against plant pathogens in irrigation water. *Eur J Plant Pathol* 145, 27–38 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0811-8>
- Schoch CL, Ciufo S, Domrachev M, Hotton CL, Kannan S, Khovanskaya R, Leipe D, Mcveigh R, O'Neill K, Robbertse B, Sharma S, Soussov V, Sullivan JP, Sun L, Turner S, Karsch-Mizrachi I. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database* (Oxford). 2020 Jan 1;2020: baaa062. 10.1093/database/baaa062. PMID: 32761142; PMCID: PMC7408187.
- Shi, A., Vierling, R., Grazzini, R., Chen, P., Caton, H., y Panthee, D. (2011). Molecular markers for Tm-2 alleles of Tomato mosaic virus resistance in tomato. *American Journal of Plant Sciences*, 2(02), 180. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2011.22020>
- SIAP. (2023). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Disponible en: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- SIAP. 2020. Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. Agricultura protegida. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430> fecha=30/06/2021
- SINAVEF-SENASICA. 2020. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica-Servicio Nacional de Sanidad e Inocuidad en Calidad Agroalimentaria. Panorama Nacional del Virus del fruto rugoso del tomate ToBRFV. 9p.
- Smith, E., y Dombrovsky, A. (2019). Aspects in Tobamovirus management in intensive agriculture. Rishon LeZion, Israel: IntechOpen
- Steiner, A. A. A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and Soil* 1961, 15 (2), 134-154. <https://doi.org/10.1007/BF01347224>
- Suárez Padrón, I. E., y Jaraba Navas, J. D. D. (2004). Viroides: El otro tipo de fitopatógenos.
- Tian, C., Xie, Z., Zhao, Y. *et al.* Microgram-grade concentration of chlorine dioxide induces one-step plant regeneration in chrysanthemum. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 58, 1138–1144 (2022). <https://doi.org/10.1007/s11627-022-10295-4>
- Totaro, M.; Badalucco, F.; Costa, A.L.; Tuvo, B.; Casini, B.; Privitera, G.; Menchini Fabris, G.B.; Baggiani, A. Effectiveness of Disinfection with Chlorine Dioxide on Respiratory Transmitted, Enteric, and Bloodborne Viruses: A Narrative Synthesis. *Pathogens* 2021, 10. 1017. <https://doi.org/10.3390/pathogens1>
- Vanderplank, J. E. Disease resistance in plants 2 nd edn (Academic Press, 1984).

- Van de Vossenbergh, B.T., Visser, M, Bruinsma. M., Koenraad, H.M.S., y Westenberg M. (2020). Real-time tracking of Tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) outbreaks in the Netherlands using Nextstrain. PLOS ONE 15(10): e0234671. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234671>.
- Vargas-Mejía, P., Rodríguez-Gómez, G., y Salas-Aranda, D.A. (2023). Identification and management of Tomato brown rugose fruit virus in greenhouses in Mexico. Arch Virology 168: 135. <https://doi.org/10.1007/s00705-023-05757-y>
- Vasquez-Gutierrez, U., Frias-Treviño, G.A., Delgado-Ortiz, J.C., Aguirre-Urbe, L.A., y Flores-Olivas, A., (2023). Severity of Tomato brown rugose fruit virus in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) from a region of Coahuila, México. International Journal of Horticulture, Agriculture and Food science (IJHAF). 7(2). 1-6. <https://dx.doi.org/10.22161/ijhaf.7.2>
- Vasquez-Gutierrez, U., López-López, H., Frías-Treviño, G.A., Delgado-Ortiz, J.C., Flores-Olivas, A., Aguirre-Urbe, L.A., y Hernández-Juarez, A. 2024. Biological Exploration and Physicochemical Characteristics of Tomato Brown Rugose Fruit Virus in Several Host Crops. Agronomy 14 (2): 388. <https://doi.org/10.3390/agronomy14020388>
- Vasquez-Gutierrez, U., Delgado-Ortiz, J.C., Frías-Treviño, G.A., Aguirre-Urbe, L.A., Flores-Olivas, A., (2023b). Pathogenicity of three Tomato brown rugose fruit virus isolates and response in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Proceedings of the 3rd International Electronic Conference on Agronomy, 15–30 October 2023, MDPI: Basel, Switzerland. <https://sciforum.net/paper/view/14988>
- Wang, Z., Yeo, D., Kwon, H., Zhang, Y., Yoon, D., Jung, S., ... y Choi, C. (2024). Disinfection efficiency of chlorine dioxide and peracetic acid against MNV-1 and HAV in simulated soil-rich wash water. Food Research International, 175, 113772.
- Zamora-Macorra, E.J., Ochoa-Martínez, D.L., Chavarín-Camacho, C.Y., Hammond, R.W., y Aviña-Padilla, K. (2023). ToBRFV Mexican Strain: Seed Transmission Rate, Efficacy of Seed Disinfection Treatment, and Rapid Sensitive Detection in Seed Lots. Preprints 2023071387. <https://doi.org/10.20944/preprints202307.1387.v1>
- Zhang, G., Zhang, Z., Wan, Q., Zhou, H., Jiao, M., Zheng, H. y Wu, J. (2023). Selection and Validation of Reference Genes for RT-qPCR Analysis of Gene Expression in *Nicotiana benthamiana* upon Single Infections by 11 Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses from Four Genera. Plants 12(4): 857. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01614>

- Zhang, H., Zhao, J., Liu, S., Zhang, D.P., And, Liu, Y. 2013. Tm-22 confers different resistance responses against tobacco mosaic virus dependent on its expression level. *Molecular Plant* 6:971– 974. [10.1093/mp/sss153](https://doi.org/10.1093/mp/sss153)
- 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>
- Zinger, A., Lapidot, M., Harel, A., Doron-Faigenboim, A., Gelbart, D., y Levin, I. (2021). Identification and mapping of tomato genome loci controlling tolerance and resistance to Tomato brown rugose fruit virus. *Plants*, 10(1), 179. <https://doi.org/10.3390/plants10010179>