

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



MITIGACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DEL VIRUS *Tobacco mosaic virus*
(TMV), EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE TOMATE (*Solanum*
lycopersicum L.), UTILIZANDO NANOTECNOLOGÍA

Tesis

Que presenta OMAR CORDERO GARCÍA
como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS

Saltillo, Coahuila

Noviembre 2019

MITIGACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DEL VIRUS *Tobacco mosaic virus*
(TMV), EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE TOMATE (*Solanum
lycopersicum* L.), UTILIZANDO NANOTECNOLOGÍA

Tesis

Elaborada por OMAR CORDERO GARCÍA como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Tecnología de Granos y Semillas con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Saltillo, Coahuila

Noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

A DIOS por brindarme la fuerza, salud, la inspiración de seguir adelante y por saber guiarme en todos los momentos difíciles que se presentan en la vida. Gracias por la dicha de existir y culminar una etapa más en mi vida. Tú has hecho tanto por mí y continúas bendiciéndome cada día. Permíteme seguir cumpliendo mis sueños y lograr más metas en mi vida. A ti te debo todo, sin excepción alguna. Gracias.

A MI UNIVERSIDAD por permitirme ser parte de ella y haberme abierto las puertas de su seno científico para poder estudiar mi maestría. Las oportunidades que me ha brindado son incomparables.

A MI FAMILIA por la confianza y el gran apoyo moral durante mi formación profesional. A mis abuelos Vicente García Dimas (+), Petra Galicia Sánchez (+), Rafael Cordero López y Rufina Calderon García por sus sabios consejos de seguir adelante.

A MIS MAESTROS por haberme brindado la oportunidad de recurrir a su capacidad y conocimiento científico. Y agradezco por haberme formado y esforzarse a que lograra llegar al punto en el que me encuentro. Sencillo no ha sido el proceso, pero gracias a las ganas de transmitirme sus conocimientos y a la dedicación que los ha caracterizado, he logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo de mi tesis con éxito. Sus enseñanzas siempre las voy a tener presente y junto a sus consejos nunca los olvidaré y los voy a tener presente como el regalo más grande que puedo recibir de alguien, muchas gracias maestros.

A MIS AMIGOS es algo invaluable, quiero agradecerles a Sujey Merari Vázquez López, Yaneth Pacheco Juárez, Ivan Rubicel Bautista Gómez, Ruben Lecona García, Felicito Díaz Vázquez, Isaí López Calderon y Berni Cruz Roblero por ser parte de mi vida y que me acompañaron en cada una de las experiencias que he tenido con ustedes durante el posgrado. Gracias por el apoyo que me brindaron.

DEDICATORIAS

A MIS PADRES

Abraham Cordero Calderón

Obdulia García Galicia

Por ser dos personas excepcionales y unicas en mi vida. Gracias madre por haberme dado la vida, a ti Padre, por ser un gran ejemplo a seguir, por tu fuerza y valentía ante las injusticias, siempre seran mis héroes. A ustedes dedico este trabajo, a ustedes por traerme al mundo, alimentarme, cuidarme y tratar de hacerme una persona de bien, por haberme dado la mejor herencia “la educación” , estoy consciente que jamás podré pagar todos sus esfuerzos y sacrificios que han hecho por mí, nunca los defraudaré.

A MIS HERMANOS

Abraham Cordero García

Sandra Cordero García

A ustedes dedico este trabajo, a ti hermano porque jamás me has abandonado siempre hemos estado juntos, confío en ti como en nadie, gracias por todo, siempre estaremos juntos. A ti hermana por todo tu amor y cariño. Nos criamos juntos, pero la vida se encargará de llevarnos por caminos muy distintos, sin embargo, nuestros corazones permanecerán unidos para siempre. Dios no pudo haberme dado mejores hermanos que ustedes.

A la **Dra. Leila Minea Vásquez Siller** mi más sincero agradecimiento por las oportunidades que me ha brindado y por la realización de esta investigación, por concederme un poco de su valioso tiempo y compartido sus conocimientos conmigo y su gran apoyo y consejos durante mi programa de estudios, he

aprendido mucho de usted, mi educación no habría sido la misma sin una persona como usted. Mis respetos y admiración.

A la **Dra. Norma Angélica Ruíz Torres** por su valiosa aportación y consejos durante mi formación profesional, por compartirme sus conocimientos y sugerencias durante la realización de esta investigación. Sus enseñanzas siempre las voy a tener presente y junto con sus consejos nunca los olvidaré. Estoy agradecido con usted.

Al **M.C. Alfredo Sánchez López** mi más sincero agradecimiento por su valiosa aportación durante mi formación profesional, por creer en mí y haber aceptado ser nuevamente mi asesor y contribuir a la realización de una meta más en mi vida. Siempre me inspiró a seguir adelante, es un amigo para mí.

Al **Dr. Alfonso López Benítez** por la oportunidad brindada para realizar esta investigación y sugerencias para llevar a cabo el trabajo en invernadero, al igual por su valioso tiempo invertido para la revisión y culminación de este trabajo.

Al **Dr. Arturo Mancero Rico** por haberme compartido sus conocimientos y su colaboración y disponibilidad en la revisión de este trabajo.

Al **Dr. Armando Muñoz Urbina** por su colaboración y valioso tiempo invertido para la culminación de este trabajo.

Al **Dr. Mario Ernesto Vasquez Badillo** por ser parte de mi formación profesional, y a quien aprecio y estimo.

Soy quien soy gracias a los Maestros que he tenido.

*"¿La ciencia ha prometido la felicidad? No lo creo. **Ha prometido la verdad** y la cuestión es saber **si con la verdad se conseguirá algún día la felicidad.**"*

Emilé Zola

ÍNDICE DE CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xiii
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xxii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL.....	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis.....	4
REVISION DE LITERATURA	5
Importancia del cultivo de tomate.....	5
Importancia nacional del cultivo de tomate	5
Producción nacional	6
Consumo nacional.....	7
Descripción y taxonomía del tomate	8
Morfología de la planta de tomate	8
Manejo del cultivo de tomate en invernadero.....	11
Factores que limitan la productividad del cultivo de tomate	15
Temperatura.....	15
Desórdenes fisiológicos	16
Principales problemas fitosanitarios del cultivo de tomate	23
Principales Plagas del cultivo de tomate	23
Principales enfermedades del cultivo de tomate	25
Hongos Fitopatógenos	25
Bacterias Fitopatóneas	29
Virus Fitopatógenos	32
Virus del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV).....	37
Ubicación taxonómica (según ICTV, 2019).	38
Etiología del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV).....	38
Morfología	38
Propiedades de la partícula:	39

Organización del genoma y replicación	40
Ciclo de la enfermedad	42
Movimiento dentro de la planta	43
Epidemiología	46
Métodos de transmisión	46
Síntomas y daños	47
Manejo de la enfermedad	50
La semilla de tomate como fuente de inóculo de fitopatógenos.....	51
Mecanismos de transmisión de virus por semilla.....	53
Distribución del virus en la semilla	54
La longevidad de virus en semillas	55
Uso de Biopesticidas Para Controlar Virus Fitopatógenos.....	56
Efectividad biológica de extractos vegetales	56
Efectividad biológica del uso de la nanotecnología para la prevención y control de microorganismos patógenos.	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	62
Características Generales de la investigación	62
Determinar el estado fitosanitario de la semilla de dos genotipos de tomate a utilizarse en la investigación.....	63
Detección de hongos	63
Detección de bacterias	64
Detección de virus	64
Análisis estadístico	65
Determinar la respuesta de plantas inoculadas con TMV, en dos etapas fenológicas a la aplicación del producto nanoparticulado 360°Agrocker.	66
Bioensayos de Inoculación	66
Detección del <i>Tobacco mosaic virus</i> en plantas y en semilla de tomate. ..	69
Manejo del cultivo.....	73
Variables evaluadas	76
Análisis estadístico	77
Determinar el potencial de transmisión del TMV de planta a semilla y de semilla a planta.	81
Extracción de semilla.....	81

Evaluar la detección de TMV en semilla	83
Evaluar la transmisión de TMV de semilla a plántula de tomate	84
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
Determinar el Estado Fitosanitario de la Semilla	86
Detección de hongos fitopatógenos	86
Detección de bacterias fitopatógenas	88
Detección de virus fitopatógenos	91
Prueba de fitosanidad.....	92
Determinar la respuesta de plantas inoculadas en dos etapas fenológicas con TMV a la aplicación de nanopartículas de TiO ₂ y extractos vegetales	93
Sintomatología de TMV sobre las plantas inoculadas.....	93
Altura de planta	94
Número de Hojas.....	103
Peso fresco y seco de planta	109
Sintomatología de TMV en frutos de plantas inoculadas con el patógeno.	115
Peso, diámetro, longitud, número de lóculos y número de semilla de frutos.	118
Monitoreo de niveles de inóculo con prueba ELISA.....	132
Análisis Multivariados	140
Determinar el potencial de transmisión del TMV de planta a semilla y de semilla a planta.	149
Transmisión de TMV de planta a semilla	149
Transmisión de TMV semilla a plántula.....	153
CONCLUSIONES	160
LITERATURA CITADA	163
Apéndice.....	190

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de la solución nutritiva para el cultivo de tomate en suelo, en tres etapas de desarrollo y el volumen de riego requerido.....	15
Cuadro 2. Fitopatógenos transmitidos por semillas de tomate.....	52
Cuadro 3. Clasificación de nanopartículas por su naturaleza química.....	60
Cuadro 4. Técnicas de inoculación y porcentaje de infección.....	69
Cuadro 7. Comparación de medias en los diferentes factores para porcentaje de incidencia de hongos fitopatógenos.....	86
Cuadro 8. Incidencia de infección de hongos fitopatógenos en semilla de dos variedades de tomate.	87
Cuadro 9. Valores de absorbancia obtenidos de la prueba de ELISA	91
Cuadro 11a. Comparación de medias para 12 fechas de mediciones de altura de planta en dos genotipos de tomate, tratamientos ordenados por la variable 130ddt.	95
Cuadro 11b. Comparación de medias para 12 fechas de mediciones de altura de planta en dos genotipos de tomate, tratamientos ordenados por la variable 130ddt.	96
Cuadro 12. Ecuación de regresión, medias de altura de planta final (130 ddt) y coeficiente de determinación de 14 tratamientos en dos genotipos de tomate.	101
Cuadro 13. Reducción de la altura de con respecto a los tratamientos absolutos de ambos genotipos.	102
Cuadro 15. Comparación de medias para número de hojas en dos genotipos de tomate durante 8 fechas de muestreo.	104
Cuadro 16. Reducción del número de hojas con respecto a los tratamientos absolutos de ambos genotipos.	107
Cuadro 17. Ecuación de regresión, medias de número de hojas final (130 ddt) y coeficiente de determinación de 14 tratamientos en dos genotipos de tomate.	108
Cuadro 19. Comparación de medias para peso fresco y seco de planta en dos genotipos de tomate.	110
Cuadro 20. Reducción del peso fresco de planta con respecto a los tratamientos absolutos de ambos genotipos.	113

Cuadro 22. Comparación de medias para variables de fruto de dos genotipos de tomate.	119
Cuadro 23. Reducción del peso de fruto en los tratamientos inoculados con TMV y sin aplicación de 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.....	121
Cuadro 24. Mitigación del TVM sobre el peso de fruto en los tratamientos inoculados con TMV y tratados con 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.	122
Cuadro 25. Reducción del rendimiento kg planta ⁻¹ en los tratamientos inoculados con TMV y sin aplicación de 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.	127
Cuadro 26. Mitigación del TVM sobre rendimiento kg planta ⁻¹ en los tratamientos inoculados con TMV y tratados con 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.	128
Cuadro 27. Reducción del número de semillas por fruto en los tratamientos inoculados con TMV y sin aplicación de 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.	130
Cuadro 28. Mitigación del TVM sobre el número de semillas por fruto en los tratamientos inoculados con TMV y tratados con 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.	131
Cuadro 30. Comparación de medias para lecturas de ELISA en planta en dos genotipos de tomate.	133
Cuadro 31. Monitoreo de niveles del inóculo de TMV, expresados en porcentajes y registrados con la prueba de ELISA durante el desarrollo del cultivo.	136
Cuadro 32. Ecuación de regresión, medias de la última lectura de ELISA y coeficiente de determinación de 12 tratamientos en dos genotipos de tomate.	137
Cuadro 35 a. Comparación de medias para los grupos del análisis de conglomerados para las variables vegetativas.....	142
Cuadro 35 b. Comparación de medias para los grupos del análisis de conglomerados para las variables de fruto.....	143
Cuadro 36. Coeficientes y valores del análisis de componentes principales.....	146
Cuadro 39. Comparación de medias para lecturas de densidad óptica de la prueba ELISA en semillas de dos genotipos de tomate.	150
Cuadro 40. Cantidad viral de TMV en semilla, expresado en porcentaje en dos genotipos de tomate.	151

Cuadro 41. Porcentaje de transmisión de TMV semilla-plántula en el genotipo VILLA NARRO®	155
Cuadro 42. Porcentaje de transmisión de TMV semilla-plántula en el genotipo SofiMely®	156
Cuadro 6. Análisis de varianza de incidencia de infección de hongos fitopatógenos en semilla de dos genotipos de tomate.....	190
Cuadro 10. Análisis de varianza para altura de planta en dos genotipos de tomate durante 12 fechas de muestreo.	190
Cuadro 14. Análisis de varianza para número de hojas en dos genotipos de tomate durante 8 fechas de muestreo.	191
Cuadro 18. Análisis de varianza para peso fresco y seco de planta en dos genotipos de tomate.	191
Cuadro 21. Análisis de varianza para las variables de fruto en genotipos de tomate.....	192
Cuadro 29. Análisis de varianza para lecturas de densidad óptica de la prueba ELISA de planta, en dos genotipos de tomate.	192
Cuadro 34a. Cuadros medios del análisis de varianza para grupos formados en el análisis de conglomerados para variables vegetativas en dos genotipos de tomate.	193
Cuadro 34b. Cuadros medios del análisis de varianza para grupos formados en el análisis de conglomerados para variables de fruto en dos genotipos de tomate.	193
Cuadro 34a. Cuadros medios del análisis de varianza para grupos formados en el análisis de conglomerados para variables vegetativas en dos genotipos de tomate.	193
Cuadro 34b. Cuadros medios del análisis de varianza para grupos formados en el análisis de conglomerados para variables de fruto en dos genotipos de tomate.	194
Cuadro 36. Valores de distancia euclidiana para 14 tratamientos de dos genotipos de tomate, método de enlace completo.	194
Cuadro 37. Correlaciones fenotípicas entre las variable evaluadas.....	195

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pudrición apical en frutos de tomate (Nuez, 2001).	17
Figura 2. A) Rajeteado de frutos en forma radial. B) Rajeteo de frutos en forma concéntrica (Castellanos, 2011).	18
Figura 3. Russeting en frutos de tomate (Peet, 1992).	19
Figura 4. Maduración manchada del tomate. Maduración manchada (Castellanos, 2011).	20
Figura 5. Tomate con “cara de gato” (Castellanos, 2011).	21
Figura 6. Daños en el fruto ocasionados por exposición directa a los rayos solares (Nuez, 2001).	21
Figura 7. Fruto hueco o “bofo” por mala polinización (Castellanos, 2011).	23
Figura 8. Pudrición de raíz y base del tallo. Síntoma característico de <i>Damping-off</i> en tomate (Bautista y Alvarado, 2006).	26
Figura 9. Aborto de racimo floral y pudrición del fruto de tomate por <i>B. cinerea</i> (Bautista y Alvarado, 2006).	27
Figura 10. Síntomas por tizón tardío en hojas de tomate (Bautista y Alvarado, 2006).	28
Figura 11. Síntoma de Tizón temprano en hoja de tomate (Jones <i>et al.</i> , 2014).	28
Figura 12. Lesiones provocadas por cancro en hojas y frutos (Jones <i>et al.</i> , 2014).	31
Figura 13. Lesiones provocadas por la mancha bacteriana. A) Síntoma de le peca bacteriana en fruto. B) Síntoma de la peca bacteriana en hojas (Bautista y Alvarado, 2006).	31
Figura 14. TMV. (zquierda) Modelo de partícula del virus del mosaico del tabaco (TMV). También se muestra el ARN, ya que se cree que participa en el proceso de ensamblaje. (Derecha) Micrografía electrónica de contraste negativo de partículas de TMV teñidas con acetato de uranilo. La barra representa 100 nm. Micrografía electrónica de partículas con forma de varilla de <i>Tobacco mosaic virus</i> (300 nm x 15 nm) (ICTV, 2018).	39
Figura 15. ARNs genómico y subgenómico de <i>Tobacco mosaic virus</i> (Scholthof, 2000).	40
Figura 16. Organización del genoma del virus del mosaico del tabaco (TMV). El ARN genómico está cubierto y es una plantilla para la expresión de las proteínas de 126 y 183 kDa. Los ORF de	

<p>proteína de movimiento distal 3 '(MP) y proteína de cápside (CP) se expresan a partir de sgRNAs co-terminales 3' separados. El motivo de la estructura de ARNt en el extremo 3' del ARN está representado por un cuadrado oscuro (ICTV, 2018).....</p>	41
<p>Figura 17. El ciclo de replicación de <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) (Scholthof, 2000).....</p>	43
<p>Figura 18. Movimiento de <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) dentro de las células (Scholthof, 2000).</p>	44
<p>Figura 19. A) Capas de partículas del virus del mosaico del tabaco TMV en una célula epidérmica de la hoja del tabaco. B) Partículas del TMV en la savia de una hoja de tabaco infectada (Agrios, 2008).....</p>	45
<p>Figura 20. Esquema en el que se muestra la dirección y velocidad de translocación del VMT en una planta (Agrios, 2008).....</p>	45
<p>Figura 21. Síntomas de TMV en folíolos de tomate (Aguado <i>et al.</i>, 2014).</p>	48
<p>Figura 22. Síntomas de TMV en frutos de tomate (Aguado <i>et al.</i>, 2014).</p>	48
<p>Figura 23. Síntomas de TMV en hojas de <i>Chenopodium</i> spp.</p>	63
<p>Figura 24. Siembra de semillas de tomate en cajas de Petri</p>	64
<p>Figura 25. Pruebas de patogenicidad de cepas bacterianas fitopatógenas. Utilizando una jeringa e inyectando por el envés del folíolo de la hoja de tomate.</p>	65
<p>Figura 26. Molienda de semilla de tomate en buffer fosfatado para inoculación.....</p>	67
<p>Figura 27. Prueba con tiras inmunológicas donde se observa la presencia de dos líneas rojas, una de control y la otra indica positivo a TMV.</p>	67
<p>Figura 29. Mesas cubierta con malla antiáfidos.</p>	71
<p>Figura 30. Extracción de semillas por cada fruto de tomate.....</p>	82
<p>Figura 31. Fermentación de semilla.....</p>	82
<p>Figura 32. Secado de semillas de cada fruto en toallitas de papel esterilizado.....</p>	83
<p>Figura 33. Desinfestación de TMV en semilla de tomate</p>	83
<p>Figura 34. Trasplante de semillas germinadas de tomate a vasos.</p>	84
<p>Figura 35. Evaluación de transmisión de TMV de semilla a plántula. A la izquierda se observa la emergencia de los cotiledones de semilla de tomate, al centro la distribución de los tratamientos</p>	

en la mesa cubierta con malla antiáfidos dentro del invernadero y a la derecha plántula de tomate después de 20 días de siembra.	85
Figura 37. Morfología de colonias de bacterias. A la izquierda medio semi-selectivo YDC- asociándose al género <i>Xanthomonas</i> spp. A la derecha medio semi-selectivo CNS- asociándose al género <i>Clavibacter</i> spp.	89
Figura 38. A las 48 horas se presentó una marchitez en el tejido sano del foliolo de la hoja donde se inoculó: A) Cepa amarilla, y (B) Cepa anaranjada. C) Tinción rosada, Gram negativo. Asociándose al género <i>Xanthomona</i> spp. D) Tinción violeta, Gram positivo. Asociándose al género <i>Clavibacter</i> spp.	90
Figura 39. Prueba de Ryu de la cepa amarilla, una Gram negativa por la presencia de un hilo mucoide.	90
Figura 40. Germinación de semilla de dos genotipos de tomate, en charola de poliestireno para evaluar la transmisión de fitopatógenos de semilla a plántula de tomate.	92
Figura 41. Sintomatología de TMV en tomate. A) Mosaicos en foliolo. B) Moteado y elongación de foliolos de hojas meristemáticas. C) Amarillamiento de hojas.	93
Figura 42. A la izquierda se observa malformación y eliminación de venas en las hojas causado por TMV. A la derecha se observa igual una malformación y desvanecimiento de venas presentando moteado y amarillamiento en las hojas.	94
Figura 43. Dinámica de crecimiento del genotipo SofiMely® a partir de los 20 hasta los 130 días después del trasplante.	98
Figura 44. Dinámica de crecimiento del genotipo VILLA NARRO® a partir de los 20 hasta los 130 días después del trasplante.	99
Figura 45. Dinámica del número de hojas del genotipo SofiMely®, a partir de los 50 hasta los 130 días después del trasplante.	105
Figura 46. Dinámica del número de hojas del genotipo VILLA NARRO®, a partir de los 50 hasta los 130 días después del trasplante.	106
Figura 47. Acumulación de biomasa en dos genotipos de tomate a los 130 días después del trasplante.	112
Figura 48. Sintomatología de TMV en frutos de tomate en madurez fisiológica.	115
Figura 49. Reduccion del número de lóculos en fruto de tomate causado por TMV.	116

Figura 50. Sintomatología de TMV en frutos de tomate en madurez comercial.....	116
Figura 51. Frutos de tomate libres de TMV. A) Fruto en su madurez fisiologica. B) Fruto en su madurez comercial. C) Lóculos de fruto.....	117
Figura 52. Peso por fruto en 14 tratamientos de dos genotipos de tomate.....	120
Figura 53. Dimensiones de fruto de los genotipos VILLA NARRO® y SofiMely®.....	123
Figura 54. Número de lóculos de frutos en dos genotipos de tomate.....	125
Figura 55. Rendimiento del 1er al 5to racimo por planta en dos genotipos de tomate (kg planta ⁻¹).....	126
Figura 57. Dinámica de lecturas de ELISA durante el desarrollo del experimento en dos genotipos de tomate.....	134
Figura 58. Dendograma del análisis de conglomerados para la clasificación de 14 tratamientos devirvado de 11 variables en dos genotipos de tomate.....	141
Figura 59. Distribución de los vectores de 11 variables en dos componentes principales, de dos genotipos de tomate.....	147
Figura 60. Distribución del agrupamiento de 14 tratamientos en base a 11 variables en dos componentes principales.....	148
Figura 61. Plántulas de tomate variedad SofiMely®. A la izquierda se observa una plántula sana libre de TMV y a la derecha una plántula infectada con TMV.....	154
Figura 62. Plántulas de tomate variedad VILLA NARRO®. A la izquierda se observa una plántula sana libre de TMV y a la derecha una plántula infectada con TMV.....	154

RESUMEN

MITIGACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DEL VIRUS *Tobacco mosaic virus* (TMV), EN EL DESARROLLO DE LA PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum* L.), UTILIZANDO NANOTECNOLOGÍA

POR

OMAR CORDERO GARCÍA

MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE GRANOS Y SEMILLAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. LEILA MINEA VÁSQUEZ SILLER-ASESOR

Saltillo, Coahuila

Noviembre 2019

El TMV causa daños graves y pérdidas en la cosecha del 11 al 80%, particularmente bajo invernadero, donde se calculan pérdidas medias anuales de hasta un millón de dólares. El objetivo del estudio fue evaluar la potencialidad biopesticida de 360°Agrocker® contra la patogénesis causada por TMV en diversas etapas fenológicas en el cultivo de tomate. La investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, comenzando primeramente por evaluar la calidad fitosanitaria de semilla de dos genotipos de tomate a utilizarse en la investigación, VILLA NARRO® y SofiMely®. Estos se analizaron microbiológicamente para detectar fitopatógenos en semilla, en medios generales como papa-dextrosa-agar (PDA) y malta sal agar (MSA). Se identificaron géneros de bacterias fitopatógenas utilizando tinción de Gram, corroborando con la prueba de Ryu y medios semi-selectivos como CNS y Levadura-Dextrosa-Calcio (YDC). Se aplicó la prueba serológica de ELISA (AGDIA®), para detectar TMV en semillas. Se aplicó un análisis estadístico para hongos con un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Se encontraron diferencias significativas entre el número de hongos detectados ($P=0.05^*$), incluyendo géneros como: *Fusarium* spp, *Alternaria* spp. *Penicillium* spp. *Aspergillus* spp y *Cladosporium* spp., cuya incidencia fue de 15.83 7.5, 3.33, 4.16 y 1.66 % respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los genotipos ($P=0.91$) y medios de cultivo ($P=0.07$). En PDA se desarrollaron cepas bacterianas potencialmente fitopatógenas amarillas y en MSA anaranjadas, que se asociaron a los géneros *Xanthomonas* (0.66%) y *Clavibacter* (0.33%) respectivamente; la incidencia de bacterias fue baja (0.74%). Las lecturas de absorbancia del espectrofotómetro, en las muestras de semilla de la prueba ELISA, resultaron menores que las de los controles negativos, consecuentemente, resultó negativa para el grupo de virus Tobamovirus. Posteriormente se inocularon con TMV las variedades VILLA NARRO® y SofiMely® en etapas vegetativa y antesis; confirmando la infección con ELISA(ADGIA®), asperjando foliarmente 360°Agrocker® (3.33mL L^{-1}) con frecuencias de tres y siete días a partir de dicha confirmación. Se incluyeron

testigos inoculados con TMV sin aspersión de 360°Agrocker y testigos sin inoculación ni aspersión foliar. Después de la primera aplicación foliar se tomaron cuatro lecturas de ELISA a intervalos de 15 días cada una por etapa inoculada, incluyendo testigos. Se analizó estadísticamente altura de planta (AP), número de hojas (NH), monitoreo del inóculo (DO), peso fresco (PFP), peso seco de planta (PSP), peso de fruto (PF), longitud (LF) y diámetro de fruto (DF), número de lóculos por fruto (NL), Número de semillas por fruto (NS), rendimiento por planta (kg PL^{-1}), utilizando un análisis de varianza con diseño completamente al azar y un análisis multivariado que incluyó un análisis de componentes principales (CP) y conglomerados (AC) (Minitab.16.0); en este último, se realizaron análisis de varianza y pruebas de Tukey ($P=0.05$) para los grupos formados (SAS 9.1). Los resultados evidencian diferencias altamente significativas ($P=0.01$) en las variables vegetativas y de fruto medidas, los tratamientos libres de TMV resultaron estadísticamente superiores en todas las variables medidas observándose en el genotipo VILLA NARRO® el mayor peso de fruto (220.66 g) y rendimiento por planta (5.22 kg PL^{-1}), el genotipo SofiMely® fue el que presentó la mayor altura de planta (213.5 cm). La inoculación del TMV en etapa vegetativa afectó drásticamente la altura de planta en los dos genotipos, 34.6 % en el genotipo VILLA NARRO® y 43.8% en el genotipo SofiMely® y, así como el número de hojas 29.95 y 26.08 %, el peso fresco de planta en 51.31 y 51.86 %, el peso seco de planta en 52.82 y 55.05 %, el peso de fruto en 70.40 y 71.63 %, el rendimiento por planta en 76.25 % y 74.83 % y el número de semillas por fruto en 67.46 y 65.81 % respectivamente. La aplicación de 360°Agrocker cada tres días a una dosis de 3.33 mL L^{-1} en los dos genotipos de tomate VILLA NARRO® y SofiMely®, inoculados en etapa vegetativa, registró resultados potenciales, considerando que evitó hasta un 82.8 y 78.6 % la disminución de la altura de plantas, 85.68 y 84.5 % el número de hojas, 85.55 y 86.39 el peso fresco de planta, 93.62 y 92.65 % el peso seco de planta, 45.79 y 48.45 % el peso de fruto, 70.5 y 75.06 % el rendimiento por planta y el 49.03 y 52.89 % el número de semillas respectivamente. En los

análisis multivariados, los resultados evidencian diferencias altamente significativas entre grupos ($P=0.001^{**}$) para las variables evaluadas. En el primer componente se observó un contraste entre la absorbancia de la prueba ELISA (DO) y el resto de las variables, teniendo mayor impacto sobre las variables NL y LF, correlacionándose negativamente y altamente significativa con valores de $r=-0.959^{**}$ y $r=-0.956^{**}$, respectivamente. En el segundo componente se observó una separación entre las variables PFP, PSP y rendimiento e indicando una correlación positiva y altamente significativa de rendimiento con PFP y PSP con valores de $r=0.928^{**}$ y $r=0.878^{**}$, respectivamente. En los tratamientos inoculados en etapa vegetativa y con aplicación de 360°Agrocker cada tres días a una dosis de 3.33 mL L^{-1} , se observó una reducción máxima del inóculo en 26.73 y 19.38% en los genotipos VILLA NARRO® y SofiMely®, respectivamente. En este estudio, 360°Agrocker constituido por extractos vegetales nanoparticulados, tuvo la capacidad de disminuir la cantidad de partículas virales activas pero no las redujo a niveles no detectables. De igual manera, se evaluó la presencia de TMV en semilla de cada tratamiento, desinfestando la semilla con hipoclorito de sodio al 10%, utilizando 30 semillas por tratamiento y obteniendo lecturas de absorbancia de la placa de ELISA en un espectrofotómetro, se aplicó un análisis estadístico con un diseño completamente al azar (SAS 9.1). Por último, se evaluó la transmisión de TMV de semilla-plántula, se sembraron en charolas de polietileno 20 semillas por tratamiento, previamente desinfestadas con hipoclorito de sodio al 10%, y se trasplantaron en vasos; observándose sintomatología de TMV y corroborando con la prueba ELISA, se obtuvieron porcentajes de transmisión. Los resultados fueron los siguientes: la presencia de TMV en la semilla, evidencian diferencias altamente significativas ($P=0.01$), todos los tratamientos exceptuando las plantas testigos libres de TMV, resultaron positivos al virus en la prueba de ELISA en semilla, en la prueba de transmisión de TMV de semilla-plántula, el genotipo VILLA NARRO® presentó una transmisión del 45% de TMV, sólo cuando se inoculó el virus en etapa

vegetativa y en el genotipo SofiMely[®] del 55 y 40 % de transmisión de TMV, cuando se inoculó en etapa vegetativa y en antesis, respectivamente. En ambos genotipos los tratamientos con aplicación de 360°Agrocker[®], resultaron en 0% de transmisión de TMV.

Palabras clave: TMV, *Solanum lycopersicum*, ELISA, mitigación, patogenicidad, fenología, transmisión, semilla, extractos vegetales, nanotecnología.

ABSTRACT

MITIGATION OF THE PATHOGENICITY OF VIRUS *Tobacco mosaic virus*
(TMV), IN THE DEVELOPMENT OF THE TOMATO PLANT (*Solanum*
lycopersicum L.), USING NANOTECHNOLOGY

BY

OMAR CORDERO GARCÍA

MASTER IN TECHNOLOGY OF GRAIN AND SEEDS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. LEILA MINEA VÁSQUEZ SILLER-ADVISER

Saltillo, Coahuila

November 2019

TMV causes serious damage and crop losses of 11 to 80%, particularly under greenhouse, where average annual losses of up to one million dollars are calculated. The objective of the study was to evaluate the biopesticide potential of 360°Agrocker® against the pathogenesis caused by TMV in different phenological stages in cultivated tomato. This study was carried out in the Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, starting first by evaluating the phytosanitary quality of seed of two genotypes to be used in the research, VILLA NARRO® and SofiMely®. These were analyzed microbiologically to detect phytopathogens in seed, in papa-dextrose-agar (PDA) and malt salt agar (MSA) medium. Phytopathogenic bacteria genera were identified using Gram stain, corroborating with the Ryu test and semi-selective medium such as CNS and Yeast-Dextrose-Calcium (YDC). The ELISA serological test (AGDIA®) was applied to detect TMV in seeds. A completely random design with a factorial arrangement was applied to analyze de fungi data. Significant differences were found between the number of fungi detected ($P=0.05^*$), including genera such as: *Fusarium* spp. *Alternaria* spp. *Penicillium* spp. *Aspergillus* spp. and *Cladosporium* spp., whose incidence was 15.83, 7.5, 3.33, 4.16 and 1.66% respectively. No significant differences were found between genotypes ($P=0.91$) and culture media ($P=0.07$). PDA developed bacterial strains potentially phytopathogenic yellow and orange in MSA only orange, which were associated with the genera *Xanthomonas* (0.66%) and *Clavibacter* (0.33%) respectively; the incidence of bacteria was low (0.74%). The absorbance readings of the spectrophotometer, in the seed samples of the ELISA test, were lower than those of the negative controls, consequently, it was negative for the Tobamovirus virus group. Subsequently, the VILLA NARRO® and SofiMely® varieties were inoculated with TMV in vegetative and anthesis stages; confirming infection with the ELISA (ADGIA®) technique, 360°Agrocker® was foliar sprayed (3.33 mL L^{-1}) every three or seven days after the ELISA confirmation. Controls inoculated in vegetative and anthesis stages without spraying and controls without inoculation and foliar spray were included. After

the first foliar application, four ELISA readings were taken at intervals of 15 days each per inoculated stage, including the controls. Plant height (AP), number of leaves (NH), ELISA readings (LE), fresh weight (PFP) and dry plant weight (PSP), fruit weight (PF), length (LF) and fruit diameter (DF), number of locules per fruit (NL), Number of seeds per fruit (NS), yield per plant (kg PL^{-1}), were statistically analyzed, using multivariate analysis that included a principal component analysis and conglomerates (Minitab 16.0). In this last, analysis of variance and Tukey Tests ($P=0.05$) were performed, for the established groups (SAS 9.1). The results showed highly significant differences ($P=0.01$) in the vegetative and yield component variables, the TMV-free treatments were statistically superior in all the variables measured, observing in the VILLA NARRO[®] genotype the highest fruit weight (220.66 g) and yield per plant (5.22 kg PL^{-1}), and the SofiMely[®] genotype was the one with the highest plant height (213.5 cm). Inoculation of TMV in the vegetative stage dramatically affected plant height in the two genotypes, reductions of 34.6% in the VILLA NARRO[®] genotype and 43.8% in the SofiMely[®] genotype, as well as in the number of leaves 29.95 and 26.08%, the fresh plant weight in 51.31 and 51.86%, the dry weight of the plant in 52.82 and 55.05%, the fruit weight in 70.40 and 71.63%, the yield per plant in 76.25% and 74.83%, and the number of seeds per fruit in 67.46 and 65.81%, respectively. In multivariate analyzes, the results showed highly significant differences between groups ($P=0.001^{**}$) for the variables evaluated. In the first component, a contrast was observed between the absorbance of the ELISA test (DO) and the rest of the variables, having a greater impact on the NL and LF variables, correlating negatively and highly significant with values of $r=-0.959^{**}$ and $r=-0.956^{**}$, respectively. In the second component a separation between variables (PFP, PSP) and performance was observed, indicating a positive and highly significant correlation of yield (kg Plant^{-1}) with PFP and PSP, with values of $r=0.928^{**}$ and $r=0.878^{**}$, respectively. In the inoculated treatments in the vegetative stage and with application of 360°Agrocker every three days at a dose of 3.33 mL L^{-1} , a maximum reduction

of the inoculum was observed, 26.73 and 19.38% in the VILLA NARRO[®] and SofiMely[®] genotypes, respectively. In this study, 360°Agrocker[®] constituted by nanoparticulate plant extracts, had the ability to decrease the amount of active viral particles but did not reduce them to undetectable levels. Similarly, the presence of TMV in seed of each treatment was evaluated, disinfestating the seed with 10% sodium hypochlorite, using 30 seeds per treatment and obtaining absorbance readings of the ELISA plate in a spectrophotometer, a statistical analysis was applied with a completely design randomly (SAS 9.1). Finally, the transmission of TMV from seed-seedling was evaluated, 20 seeds were treated in polyethylene trays per treatment, previously disinfected with 10% sodium hypochlorite, and transplanted into vessels; observing TMV symptoms and corroborating with the ELISA test, transmission percentages were obtained. The results were as follows: the presence of TMV in the seed, evidences highly significant differences ($P=0.01$), all treatments except the TMV-free controls were positive for the virus in the seed ELISA test, in the seed-seedling transmission, the VILLA NARRO[®] genotype presented a 45% transmission of TMV, only when the virus was inoculated in the vegetative stage, and in the SofiMely[®] genotype of 55 and 40% TMV transmission, when it was inoculated in vegetative and anthesis stages, respectively. In both genotypes, treatments with 360°Agrocker[®] application resulted in 0% TMV transmission.

Keywords: TMV, *Solanum lycopersicum*, ELISA, mitigation, pathogenicity, phenology, transmission, seed, plant extracts, nanotechnology.

INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) a nivel mundial es la segunda hortaliza de mayor importancia después de la papa (*S. tuberosum* L.). Se cultiva en diversos países, no obstante, en 2017 más del 50% de la producción se concentró en cuatro países: China el principal productor (19.8%), seguido de la India (18.8%), Nigeria (10.8%) y Turquía (6.4%) (SAGARPA, 2017). En México el tomate es la segunda hortaliza más importante después del chile (*Capsicum annum* L.). En 2017, México fue el principal exportador de esta hortaliza con una participación del 1.9%, lo que representó a diciembre del 2017 3'055,000 t, esto representa un incremento de 10.3% con respecto al 2016. La producción de tomate está altamente concentrada en cinco entidades: Sinaloa (27.4 %), Michoacán (7.2 %), San Luis Potosí (7.2 %), Baja California (7.1 %), y Jalisco (5.2 %). El valor de las exportaciones agropecuarias mexicanas de tomate, han registrado una participación de 15.0 por ciento, al ubicarse en 1,900 millones de dólares y 3.3 millones de toneladas en 2018 (SIAP, 2019), lo que significa una importante fuente de empleos y divisas para el país. No obstante, el cultivo de tomate suele verse afectado por distintas enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus que han puesto en peligro el rendimiento y la estabilidad de su producción en los últimos años en México.

El *Tobacco mosaic virus* (TMV) es el virus vegetal más infeccioso conocido y es una de las principales enfermedades virales en tomate, el TMV es un virus de ARN de cadena positiva que pertenece al género Tobamovirus de la familia Virgaviridae, tiene un rango muy amplio de hospedadores como el tabaco, las hortalizas (especialmente en la familia Solanaceae), lechuga, pepino y diversas especies ornamentales (Hull, 2002). La fuente de inóculo del TMV lo constituyen las plántulas procedentes de semillas contaminadas, el suelo contaminado con raíces y los restos vegetales de plantas enfermas; no se han reportado insectos vectores (Jones *et al.*, 2001). Se encuentra ampliamente

distribuido por todo el mundo. El TMV es muy estable, fácilmente transmitido por savia y puede transmitirse mecánicamente, donde el hombre es la principal fuente de diseminación (Hull, 2002). Dicho virus puede transmitirse por semilla y mantenerse viable en el endospermo de la misma hasta por 9 años (Subramanya, 2013) y por dos años en residuos de plantas de tabaco en suelos secos, sin embargo, rápidamente pierde su capacidad de infección, cuando los residuos se mantienen en suelos húmedos (Pernezny *et al.*, 2003).

En tomate, el TMV produce una infección sistémica con síntomas como achaparramiento, moteado, mosaicos de las hojas, enrollamiento y amarillamiento de tejidos de la planta, las infecciones tempranas pueden llevar a la muerte de las plantas. Causa daños graves y pérdidas en la cosecha del 11 al 80% (Jones *et al.*, 2014), particularmente bajo invernadero, donde se calculan pérdidas medias anuales por las virosis del tabaco de un millón de dólares (Requena *et al.*, 2010).

La complejidad de la patogénesis de TMV dificulta la posibilidad de aplicar medidas de control efectivas; algunas medidas preventivas en los invernaderos consisten de tener control de insectos y con ello reducir la transmisión del virus en el cultivo, desinfección de herramientas para prácticas culturales del cultivo, eliminar las plantas infectadas con TMV con el fin de tener un control y no transferir a las sanas y el uso de semillas sanas y registradas (Dombrovsky y Smith, 2017).

En los últimos años los extractos vegetales se han empleado en el manejo de enfermedades, Grainge y Ahmed (1988) han mostrado que existen alrededor de 400 especies de plantas con propiedades contra 142 especies de hongos, y otras especies de plantas contra 23 taxas de bacterias y 19 contra virus, sin embargo, el uso de extractos vegetales derivados de plantas ha recibido poca atención como fuente de posible control de virus. (Vitaco *et al.*, 1999).

Actualmente el advenimiento de la nanotecnología aplicada a la agricultura, ha generado resultados que indican un potencial significativo en la protección

fitosanitaria de cultivos agrícolas (Lira *et al.*, 2018) debido a su pequeño tamaño, alta relación superficie-volumen y propiedades ópticas únicas (Ghormade *et al.*, 2011). Por lo tanto, el uso de nanopartículas se ha considerado un enfoque alternativo para el control de patógenos vegetales (Kumar and Yadav, 2009; Prasad *et al.*, 2014).

En este contexto, la nanotecnología ha surgido como un avance tecnológico-científico que puede transformar los extractos de plantas con propiedades inhibitorias en nanopartículas que tienen una o más dimensiones del orden de 100 nm o menos (Auffan *et al.*, 2009).

El suministro de complejos de aceites vegetales funcionalizados en estructuras de óxidos metales a escala nanométrica, como los que constituyen el producto 360°Agrocker, ha generado resultados prometedores para controlar la roya del café (*Hemileia vastatrix*) cuando se asperjó foliarmente a una dosis de 1.0 y 1.25 L Ha⁻¹, reduciendo el daño en 82 y 83 % respectivamente, (Manuel, 2016). La potencialidad biopesticida de dicho producto, indujo el desarrollo del presente trabajo que evaluó la efectividad biológica del producto 360°Agrocker® contra la patogénesis causada por TMV, en diversas etapas fenológicas en tomate.

Considerando lo anterior, se presenta este trabajo de investigación el cual consta de los siguientes objetivos e hipótesis:

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el potencial de un producto nanoparticulado, 360°Agrocker formulado a base de extractos vegetales, para atenuar el impacto de la patogénesis del TMV en el desarrollo de la planta de tomate y su transmisión en la semilla producida.

Objetivos específicos

1. Determinar el estado fitosanitario de la semilla de dos genotipos de tomate a utilizarse en la investigación.
2. Determinar la respuesta de plantas inoculadas con TMV, en dos etapas fenológicas a la aplicación del producto nanoparticulado 360°Agrocker.
3. Determinar el potencial de transmisión del TMV de planta a semilla y de semilla a planta.

Hipótesis

H1: La aspersion de suspensiones con nanopartículas de extractos vegetales sobre la planta de tomate atenúan la patogenicidad del *Tobacco mosaic virus* (TMV), disminuyendo el daño en su desarrollo y el potencial de transmisión por semilla de dicho virus.

H0: La aspersion de suspensiones con nanopartículas de extractos vegetales sobre la planta de tomate no atenúan la patogenicidad del *Tobacco mosaic virus* (TMV), disminuyendo el daño en su desarrollo y el potencial de transmisión por semilla de dicho virus.

REVISION DE LITERATURA

Importancia del cultivo de tomate

El tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) a nivel mundial es la segunda hortaliza de mayor importancia después de la papa (*Solanum tuberosum* L.). Así mismo, es económicamente uno de los cultivos hortícolas más importantes en todo el mundo, la superficie cosechada de tomate a nivel mundial creció a una tasa promedio anual de 1.7 % entre 2004 y 2014, para ubicarse en 5.0 millones de hectáreas (FAO, 2017). Su demanda aumenta continuamente y con ella su cultivo, producción y comercio. La producción y el consumo mundial de tomate rojo, así como el consumo promedio per cápita, registran tendencia al alza durante la década reciente. China es el más importante productor (19.8 %) y consumidor mundial, seguido de la india (18.8 %), Nigeria (10.8 %) y Turquía (6.4 %), mientras que Estados Unidos es el principal importador, y México el principal exportador de esta hortaliza con una participación del 1.9 % (SAGARPA, 2017). Entre 2005 y 2015, las exportaciones mundiales crecieron a una tasa promedio anual de 3.8 %. En este rubro destacan México y Holanda, que participaron en 2015 con 20.9 y 15.1 % del volumen mundial exportado, respectivamente.

Importancia nacional del cultivo de tomate

En México, el tomate es el cultivo hortícola de mayor importancia económica y social, por la superficie sembrada, el volumen en el mercado nacional, y las divisas generadas (Cruz, 2007). Durante el 2018 fue el producto más importante en el valor de las exportaciones agropecuarias mexicanas, con una participación de 15.0 por ciento, al ubicarse en 1,900 millones de dólares y 3.3 millones de toneladas (SIAP, 2019). El cultivo del tomate es una importante fuente de empleo para un considerable número de familias en México. Se estima que para la producción de 75,000 ha de tomate se emplean a 172 mil

trabajadores de campo. El cultivo del tomate trae aparejado consigo una fuerte fluctuación migratoria de personas originarias de Estados como Oaxaca, Zacatecas, Guanajuato, Guerrero y Veracruz, principalmente; por ser éstos Estados que aportan una proporción considerable de trabajadores agrícolas a las principales regiones de cultivo del tomate, principalmente al Estado de Sinaloa (ASERCA, 1998).

Producción nacional

En México, el tomate es la segunda hortaliza más importante después del chile (*Capsicum annum* L.). La producción de tomate creció a una tasa promedio anual de 4.8 % entre 2006 y 2016, para ubicarse en un máximo histórico de 3.3 millones de toneladas (SAGARPA, 2017). En el cultivo a campo abierto la superficie sembrada se redujo, al pasar de 65,431 a 36,855 hectáreas. Por el contrario, la superficie establecida con agricultura protegida (malla sombra e invernadero) pasó de 1,078 a 15,006 hectáreas en el período mencionado, es decir, creció a una tasa promedio anual de 30.1 %. Desde 2006 el volumen de tomate obtenido en condiciones de agricultura protegida ha aumentado. Así, pasó de 135,533 toneladas en 2006 a 733,178 toneladas en 2010, a 2,034 millones de toneladas en 2016 (60.7 % del volumen total) (USDA. FAS, 2016).

El 56.3 % de la producción nacional de tomate se concentra en cinco entidades: Sinaloa, es el estado que se ha consolidado como el primer productor de tomate en México con una participación del (27.6 %), San Luis Potosí (9.2 %), Michoacán (7.0 %), Baja California (6.7 %), y Zacatecas (5.7 %) (SIAP, 2017). Aunque también ha adquirido mayor importancia en otras entidades como Jalisco, Coahuila, Sonora, Puebla, Baja California Sur, Guanajuato, Estado de México, Oaxaca y Querétaro.

En el país existen distintas variedades de tomate rojo, entre las más importantes están el tomate cherry, saladette y bola. La producción de tomate Saladette representa el 79.4 % del total de la producción de tomate en México,

el tomate bola 17.2 % y el tomate cherry 3.2 % (SAGARPA, 2017). La producción de tomate Saladette se concentra en cinco estados: Sinaloa (25.1 % de la producción nacional de esta variedad en 2016), San Luis Potosí (11.0 %), Michoacán (8.9 %), Zacatecas (6.8 %) y Morelos (4.6 % del volumen nacional de este tipo de tomate). Los principales estados productores de tomate bola son: Sinaloa (43.6 % del volumen nacional de esta variedad en 2016), Baja California (31.0 %), Estado de México (6.4 %) y Sonora (5.3 %). Por otra parte, los principales estados productores de tomate cherry son: Jalisco (32.9 % del total nacional de esta variedad), Baja California Sur (13.8 %) y Guanajuato (12.4 %). (SIAP-SAGARPA, 2017).

Consumo nacional

El consumo per cápita anual de tomate en México se ubica en alrededor de 15 kilogramos por año, volumen que es inferior al consumo per cápita promedio mundial, de 18 kilogramos. Alrededor del 98 % del volumen del tomate que se produce en el país se destina para el consumo en fresco y el resto se industrializa. Actualmente, se satisface 100 % de los requerimientos nacionales con producción interna; así mismo, las importaciones mundiales han aumentado 39.41 % en la última década, lo que ha generado un incremento en las exportaciones mexicanas principalmente a Estados Unidos de América (SIAP, 2017). Durante 2016 el tomate mexicano cubrió 90.67 % de las importaciones de Estados Unidos y 65.31% de Canadá. La productividad del tomate por unidad de superficie continúa creciendo. Los rendimientos varían en función de las tecnologías empleadas, desde el cultivo a campo abierto, hasta la producción en invernaderos altamente tecnificados con sistemas automatizados de riego, nutrición y control fitosanitario.

Descripción y taxonomía del tomate

El tomate, *Solanum lycopersicum* L., es una planta dicotiledónea perteneciente a la familia de las *Solanáceas*, el cual incluye más de 3000 especies ocupando una gran variedad de hábitats (Knapp 2002). En una primera clasificación taxonómica, Linnaeus en 1753 denominó al tomate cultivado *Solanum lycopersicum* (Esquinas-Alcázar y Nuez, 1995); posteriormente, en 1754, Miller le asigna el género *lycopersicon* y la especie *esculentum*, clasificación comúnmente aceptada hasta que trabajos recientes (Perealta y Spooner, 2000; Peralta *et al*, 2005, 2006) propiciaron que se volviera a renombrar como *Solanum lycopersicum* L.

Clasificación científica del tomate (según Jones, 2008)

Reino: Planta

División:*Magnoliophyta*

Clase:*Magnoliopsida*

Subclase:*Asteridae*

Orden:*Solanales*

Familia:*Solanaceae*

Género:*Solanum*

Especie:*Solanum lycopersicum* L.

Morfología de la planta de tomate

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta y, en las variedades determinadas su crecimiento es limitado mientras que es ilimitado en las indeterminadas. Para invernadero se utilizan las variedades de crecimiento

indeterminado, pues permiten tener producción durante periodos largos si se maneja de forma adecuada. (Muñoz y Medina, 2004).

Raíz

El sistema radical del tomate consta de una raíz principal y gran cantidad de ramificaciones secundarias. En los primeros 30 cm. de la capa del suelo se concentra el 70 % de la biomasa radical. Bajo condiciones de suelo la raíz principal crece unos 2.5 cm diarios hasta llegar a los 60 cm de profundidad. Simultáneamente se produce ramificaciones y raíces (Nuez *et al.*, 1999). Bajo condiciones de cultivo sin suelo la raíz queda confinada en contenedores de diferente volumen, geometría y disposición. Usualmente se utiliza un volumen de 5 a 10 litros por planta. (Castellanos, 2011).

Tallo

El tallo es el eje sobre el cual se desarrollan las hojas, flores y frutos, por ello es importante vigilar su vigor y sanidad; el diámetro de la base puede ser de 1.5 a 4 cm y el porte puede ser de crecimiento determinado (tallos que al llegar a cierto número de ramilletes detienen su crecimiento) e indeterminado (tallos que no detienen su crecimiento). Si al final del crecimiento todas las ramificaciones exhiben yemas reproductivas, estas se clasifican como de crecimiento determinado; y si terminan con yemas vegetativas, son de crecimiento indeterminado (Rick, 1978; Rodríguez *et al.*, 1984; Valadéz, 1990).

Hojas

Las hojas tienen un eje central o peciolo, de este eje salen pequeñas "hojitas" llamadas folíolos. Son compuestas, se insertan sobre los diversos nudos en forma alterna. El limbo se encuentra fraccionado en siete, nueve y hasta once folíolos. El haz es de color verde y el envés de color grisáceo, su tamaño depende de las características genéticas de la variedad. En tomates más rústicos el tamaño de sus hojas es más pequeño (Huerres y Caraballo, 1988).

La disposición de nervaduras en los foliolos es penninervia (Rodríguez et al., 2001; Garza, 1985).

Flor

La flor se presenta formando inflorescencias que pueden ser de cuatro tipos: racimo simple, cima unípara, cima bípara y cima múltipara. Se precisan de 56-76 días desde el nacimiento de la planta hasta que se inician los botones florales (Rodríguez et al., 2001). El número de flores depende del tipo de tomate. En tomates de grueso calibre el ramillete tiene de 4 a 6 flores; en tomates de calibre mediano aumenta de 10 a 12 flores por ramillete y en los tipos cereza o "cherry" no es extraño que se desarrollen hasta 100 flores por racimo (Rick, 1999). Es fundamental vigilar que ocurra una buena polinización. Frutos no polinizados no desarrollan semillas ni tamaño. Las condiciones que favorecen la polinización son una temperatura de 24°C y una humedad relativa en torno a 60 % (Cadenas et al., 2003). A mayor cantidad de óvulos fertilizados, mayor cantidad de semillas y por lo tanto mayor tamaño y peso del fruto.

La flor está formada por un pedúnculo corto, el cáliz es gamosépalo, es decir, con los sépalos soldados entre sí, y la corola gamopétala. El androceo tiene cinco o más estambres adheridos a la corola con las anteras que forman un tubo. El gineceo presenta de 2-30 carpelos que al desarrollarse darán origen a los lóculos o celdas del fruto (Rodríguez et al., 2001). Las flores son hermafroditas, hipoginas y regulares (Wien, 1997). El cáliz está compuesto de seis sépalos y la corola de seis pétalos amarillos. Los estambres, en un número de seis, se reúnen formando un tubo alrededor del gineceo.

Fruto

El fruto (Figura 2d y 2e) es una baya de color amarillo, rosado o rojo debido a la presencia de licopeno y caroteno; el más común es el rojo en la madurez, la pulpa contiene una proporción del 33% del peso fresco del fruto (Rodríguez et al., 2001). Una vez que las flores han sido polinizadas, los frutos tardan en

madurar alrededor de 55 a 65 días, esto depende de la variedad y condiciones ambientales.

Botánicamente, un fruto de tomate es una baya compuesta de varios lóculos, consistente de semillas dentro de un pericarpio carnoso desarrollado de un ovario. Su forma puede ser redondeada, achatada o en forma de pera y su superficie lisa o asurcada. Una variedad comercial contiene alrededor de 150-300 semillas por fruto (Desai et al., 1997).

Semilla

La semilla del tomate es de forma lenticular con dimensiones aproximadas entre 3-5 mm de diámetro y 2.5 mm de longitud, y cubierta de vellosidades. En un gramo puede haber de 300-350 semillas (Rodríguez *et al.*, 2001; Huerres y Caraballo, 1988). El peso de 1000 semillas es de aproximadamente 2.4 g (Desai *et al.*, 1997). En producciones bajo invernadero, 1 kg de fruto produce aproximadamente 4 g de semilla (1200 semillas aproximadamente). En campos de producción la regla es: el 1% del peso del fruto es el peso de semilla (George, 1999).

Manejo del cultivo de tomate en invernadero

Temperatura

El óptimo térmico para el desarrollo del tomate durante el día es de 23-25°C y de 15-17°C durante la noche; mientras que la humedad relativa apropiada es del orden de 70 %. Las temperaturas por debajo de 8°C y por encima de 30°C, alteran el desarrollo del tomate y suelen provocar una deficiente fructificación (Rodríguez et al., 2001).

Desinfección de instalaciones y herramientas

Ciertamente los invernaderos actúan como una barrera física contra insectos y patógenos, no obstante, las estructuras por muy herméticas que parezcan no

son infalibles a la entrada de microorganismos que aquejan a las plantas cultivadas, ya que herramientas, viento, agua e incluso personas, son vehículo y medios de entrada. Por ello, es importante considerar la desinfección de las instalaciones. Una vez concluido la cosecha del cultivo es fundamental retirar lo antes posible las plantas y los residuos de las mismas. Días previos a la plantación se debe llevar a cabo la desinfección de las instalaciones, herramientas y utensilios que se utilizan en el invernadero. Se emplean principalmente los productos siguientes: 1) Sales cuaternarias de amonio, 2) Hipoclorito de sodio y 3) Virkon (Monopersulfato potásico) (Berenguer, 2006).

Transplante

Es el paso de la planta desde el semillero al asiento definitivo del cultivo. El riego por goteo estará colocado según el marco, la densidad y la orientación de la plantación. Previo al trasplante se da un riego abundante, posteriormente se da un riego de asiento para asegurar un buen contacto entre la humedad del suelo y el cepellón. Se le puede aplicar un enraizador vía riego y algún fungicida para la prevención de Damping-off; por ejemplo, Popamocarb, a una dosis de 1.5 L/ha ó Carbendazim, 1 L/ha.

Entutorado

Durante el crecimiento de los tallos estos se van enredando con un hilo de rafia. La rafia debe ser especial para utilizarse en invernaderos, tratada contra radiación UV, por lo contrario, se puede romper antes de concluir el ciclo de cultivo. La rafia se enrolla en ganchos que existen para tal fin o bien en carretes unidos a ganchos para ir soltando la rafia. Cuando las plantas llegan a una altura de 20 cm se atan a la rafia. Es fundamental hacerlo con oportunidad, antes de que las plantas se acamen. La rafia se sujeta al tallo, ya sea mediante un nudo no corredizo o un anillo de plástico. Conforme va desarrollando la planta, la rafia se va enredando alrededor del tallo. El espacio entre el liado en

los tallos debe ser de una distancia adecuada, si es muy corto liga el tallo e interfiere con el transporte de agua, nutrientes y foto asimilados, mientras que si es muy largo, cuando los frutos desarrollan y adquieren peso y tamaño, la rafia se desliza y se corre el riesgo de que el tallo se rompa. El entutorado normalmente se hace cada ocho días, pero varía conforme a la tasa de formación de ramilletes, la cual difiere de variedades y estaciones de crecimiento (González, 2004), acortándose en tiempos de verano y alargándose en invierno.

Poda de tallos y hojas

La poda es una práctica obligada en variedades de crecimiento indeterminado. En cada axila de las hojas aparece un brote, los cuales son eliminados cuando su tamaño lo permite, alrededor de 5 cm de largo. Si no se podan oportunamente estos brotes axilares reducen el rendimiento. Cuando la planta está en etapa vegetativa, es conveniente desbrotar dos veces por semana. Una vez que la planta entra a etapa reproductiva puede hacerse cada semana. En la poda de hojas, se van eliminando todas aquellas inferiores senescentes, por debajo del último racimo que va madurando o pintando color y se deja un racimo adicional descubierto. El corte debe ser limpio y al ras del tallo principal para evitar la entrada de patógenos como (*Botrytis*). Evitar la poda severa de hojas para no desequilibrar la planta y causar agotamiento. La poda se hace con tijeras, se deben desinfectar para evitar el contagio de fusariosis y bacteriosis entre plantas. Con el deshojado se consigue una mayor ventilación y mejora el color de los frutos. Se hace periódicamente no quitando más de dos o tres hojas en una sola vez, para no provocar un desbalance hídrico y energético (Rodríguez et al., 2001).

Marco de plantación

Son influenciados por el sistema de cultivo. Se establecen líneas de cultivo pareadas a 1.8 m una de otra, dejando un pasillo de 0.8 m para labores culturales. Se recomienda una densidad de plantación de 2.5 a 3 plantas/m². El sistema de producción basado en altas densidades de población por unidad de superficie (10-16 plantas/m²) es técnicamente factible según Sánchez (2002). El principal problema de las altas poblaciones es el riesgo de enfermedades por exceso de follaje y la alta humedad relativa que se genera. La tendencia en los invernaderos ha sido usar de 2.5 a 3 plantas/m², apostando por los ciclos medios y largos y sosteniendo un determinado volumen a los mercados. Manejar densidades de 2.8 a 3 plantas/m² es lo más recomendable en México (Sánchez, 2014).

Fertiirrigación del tomate en invernadero

El riego adecuado permite compensar las extracciones de agua y nutrimentos de la planta y mantiene un adecuado nivel de oxígeno en el ambiente radical. En el Cuadro 1 se presentan las concentraciones recomendadas en la solución nutritiva de acuerdo con la etapa en que se encuentra el cultivo. En la primera etapa, durante los primeros 75 días después del trasplante (DDT), los requerimientos nutrimentales son menores; en la segunda, de los 75 a los 125 DDT, cuando inicia la cosecha, se tienen rendimientos altos y la extracción es mayor. Conforme la planta va creciendo e incrementa su follaje, la evapotranspiración es mayor y requiere riesgos más abundantes y frecuentes. Por ello se tiene un aumento paulatino en el riego que va desde los 8 hasta los 40 m³ por ha al día, para el período de los 0 a los 75 DDT.

Cuadro 1. Concentración de la solución nutritiva para el cultivo de tomate en suelo, en tres etapas de desarrollo y el volumen de riego requerido.

Nutrimiento	Etapa previa a cosecha 0- 75 ddt	Inicio de producción 75 - 125 ddt	125 ddt a fin de cosecha
	meq/L	meq/L	meq/L
No ₃	6 – 8	8 – 10	7 – 10
H ₂ PO ₄	0.5 – 0.9	0.6 – 1.0	0.6 – 1.0
SO ₄ ⁼	3 – 6	3 – 6	3 – 6
K ⁺	4 – 5	5 – 6	4.5 – 5.5
Ca ⁺⁺	5 – 6	5 – 6	5 -6
Mg ⁺⁺	1.5 – 2.0	1.8 – 2.5	1.5 – 2.0
CE, dS/m	1.1*	1.3*	1.2*
Vol. Riego Fertiliz.	8 a 30 m ³ /día/ha	30 m ³ /día/ha	30 m ³ /día/ha

*La conductividad eléctrica no considera el efecto del sodio del agua.

Factores que limitan la productividad del cultivo de tomate

Temperatura

A temperaturas entre 18 y 25°C, los granos de polen son viables durante 2 a 5 días después de la antesis. Las temperaturas extremas, por encima de los 37.5°C o por debajo de 5°C, limitan la germinación de los granos de polen e inhiben el crecimiento del tubo polínico. La receptividad del estigma es dañada por altas temperaturas, y un periodo de 4 horas a 40°C entre las 24 y las 96 horas después de la polinización, causan degradación del endospermo y daños al pro-embrión (Lorenzo y Sánchez, 2004).

Los ovarios fecundados pueden dejar de hincharse rápidamente debido a la baja radiación, alta temperatura o la interacción entre estos factores. El número de frutos por racimo está relacionado positivamente con la radiación solar,

sobre todo, a partir de la antesis inicial. Una baja luminosidad durante las dos semanas siguientes a la antesis de la primera flor de la inflorescencia impide el crecimiento de los frutos; los cuales se mantienen en la estructura reproductiva, pero un mes después de la antesis pueden seguir con un diámetro menor a 25 mm. Altas temperaturas, por encima de los 30°C durante largos periodos, agobian las plantas y ocasionan desórdenes fisiológicos en el fruto.

Desórdenes fisiológicos

Los desórdenes fisiológicos son debidos a componentes genéticos y ambientales, y en muchos casos la causa exacta del desorden no está bien entendida e involucra a varios factores. Los desórdenes fisiológicos ocurren o se hacen visibles cerca o durante la madurez de los frutos, los cuales no tienen valor comercial.

Pudrición apical del fruto o Blossom End Rot (*BER*)

Quizá la podredumbre apical sea la más común de las fisiopatías, primero aparece en frutos verdes con desarrollo medio. Se manifiesta como áreas blancas o cafés del tejido locular. Como lesión interna aparece dañado el tejido en la placenta del fruto y de manera externa el pericarpio, lesión no es del todo acuosa. En ésta aparece una pequeña mancha de agua húmeda cerca de la cicatriz floral. Conforme la mancha se ensancha, el tejido afectado tiende a secarse y se torna ligeramente café oscuro, generalmente se desarrolla de manera bien definida una mancha corchosa hundida, pero seca (Figura 1) (Nuez, 2001).

El BER se desarrolla cuando el calcio y/o los niveles de humedad en la zona radical son bajos. Sin embargo, ahora se conoce que una interacción compleja de factores anatómicos, genéticos y ambientales son los que determinan si un determinado fruto desarrolla o no el desorden (Ho et al., 1995; Saure, 2001). La

causa básica de BER es la falta de coordinación entre el transporte de asimilados por el floema y el calcio por el xilema y la rápida elongación celular en el tejido placentario distal del fruto. Se trata de una interacción entre la tasa de crecimiento del fruto y la tasa de adquisición del calcio en la parte distal del mismo. Los cambios en el ambiente tienen una marcada influencia sobre la incidencia de BER, un ambiente con alto déficit de presión de vapor es la principal condición ambiental que provoca este problema.



Figura 1. Pudrición apical en frutos de tomate (Nuez, 2001).

Dado que el calcio solo es transportado por los tejidos del xilema, cuando la absorción del agua es reducida, la absorción del calcio se reduce proporcionalmente y es cuando se genera el problema. Una baja humedad relativa durante el día, especialmente cuando es acompañada por altas temperaturas y luminosidad, incrementa la transpiración, de manera que proporcionalmente, más calcio se va a las hojas y menos calcio al fruto, el cual tiene una tasa de transpiración mucho más baja. La mayor parte de calcio es absorbido durante el día, más que por la noche, y el incremento del calcio en el fruto debido a la alta humedad durante la noche es relativamente pequeño comparado a los efectos de la humedad sobre la absorción del calcio durante el

día (Adams y Ho, 1993). En este sentido, el automatismo de los invernaderos juega un papel importante.

Rajeteado de frutos (cracking)

El rajeteado varía en tamaño y profundidad y se presenta en círculos alrededor del pedúnculo (rajeteo concéntrico) o radial desde el pedúnculo (rajeteo radial). En frutos con rajeteado diminuto (micro-cracking o russetting) como líneas de cabello, al inicio invisible a simple vista, después se hacen evidentes, cubren la mayor parte de la superficie del fruto confiriéndole una sensación rugosa. Este desorden no solo es desagradable a la vista disminuyendo su comercialización, sino que además, con las roturas de la epidermis, se incrementa la pérdida de agua y la entrada de patógenos (Castellanos, 2011) (Figuras 2).

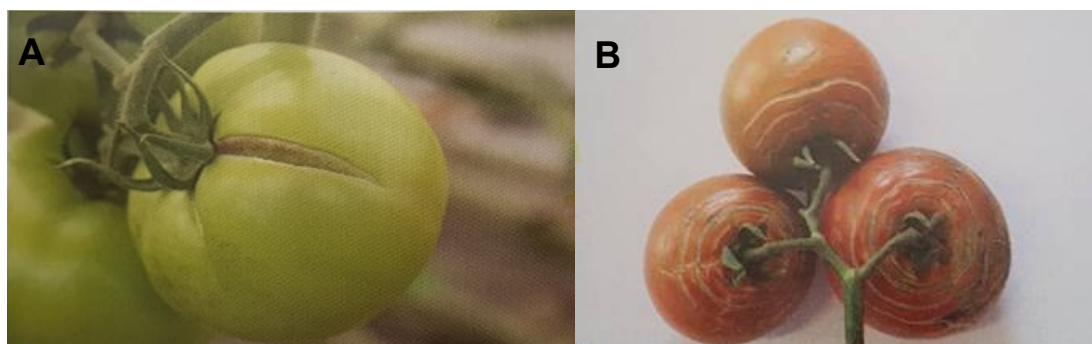


Figura 2. A) Rajeteado de frutos en forma radial. B) Rajeteo de frutos en forma concéntrica (Castellanos, 2011).

El rajeteo ocurre cuando hay un influjo rápido neto de solutos y agua hacia el fruto, al mismo tiempo que la maduración u otros factores reducen la fuerza o elasticidad del exocarpo del tomate (Peet, 1992). Al incrementarse la temperatura del fruto, se eleva la presión de gas e hidrostática del mesocarpos obre el exocarpo, resultando inmediatamente en un rajeteado visible en los frutos maduros o próximos a madurez. Después de un riego baja la tensión o fuerza del excarpo en los frutos. En frutos verdes, se crean grietas diminutas, las cuales más tarde se expanden y se hacen visibles (Figura 2). Una alta

intensidad luminosa eleva la temperatura del fruto, los sólidos solubles y las tasas de crecimiento. Estos factores están asociados con incrementos en el rajeteado. El russeting se incrementa en condiciones que conllevan a otras formas de rajeteado, pero particularmente está asociado con alta humedad (Figura 3).

Los cambios bruscos en la humedad del suelo o en el suministro de agua bajo sustrato, durante el crecimiento también afectan la fuerza del exocarpo (Peet, 1992). El porcentaje de cracking aumenta con el número de frutos por racimo. Aún no está claro por qué el rajeteado algunas veces toma una forma y otras veces otra.



Figura 3. Russeting en frutos de tomate (Peet, 1992).

Maduración manchada

La maduración manchada o “blotching”, es también conocida por su apariencia como “frutos payaseados”. Este desorden se caracteriza por presentar áreas verdes, amarillo-verdosas o blancas cerosas cercanas al cáliz, fuera de eso el fruto permanece con una coloración roja normal (Figura 4). La decoración normalmente se presenta en las paredes externas, sin embargo, en casos extremos las paredes radiales también pueden ser afectadas. Internamente, los tejidos del pericarpio y de la placenta tienen una decoloración blanquecina. Las

causas de la maduración manchada no son conocidas, la incidencia es más alta en suelos con contenidos bajos de potasio. Una nutrición inadecuada, daño por insectos y estrés ambiental (heladas o radiación solar) son factores que contribuyen a la presencia de este desorden (Castellanos, 2011).

Boyle (1994) supone que se trata de un síndrome provocado por el virus del mosaico del tabaco (*TMV*), pero la mayoría de los autores consideran que se trata de un desorden fisiológico con síntomas similares a los *TMV*, tomando en cuenta que la temperatura y el contenido de potasio tienen gran influencia.



Figura 4. Maduración manchada del tomate. Maduración manchada (Castellanos, 2011).

Cicatrización de la punta de floración

Se debe a un desarrollo anormal originado por una mala polinización. Ambos desórdenes se desarrollan en temperaturas bajas prolongadas o nublados continuos durante la floración y amarre de frutos.

Las bajas temperaturas durante el periodo sensible (de 20 a 30 días previos a la antesis dependiendo de las condiciones ambientales) incrementa el número de lóculos en el fruto. La “cara de gato” también se identifica así a cualquier malformación de la fruta debida a una polinización incompleta (Castellanos, 2011). En ocasiones la forma del fruto es arriñonada con cicatrices largas (Figura 5), pero pueden estar distorsionados formando otras figuras. Esta deformación es de gran importancia en los frutos grandes para consumo en

fresco. Las flores son susceptibles de sufrir podredumbre apical debido al frío, este se presenta 3 semanas antes de la antesis.



Figura 5. Tomate con “cara de gato” (Castellanos, 2011).

Golpe de sol (suncald, sunborn, o sunscorch)

Los frutos verdes expuestos directamente a la luz no maduran de manera uniforme, aparecen manchas blancas o amarillentas sobre los costados de los frutos maduros. Los síntomas aparecen en los estados de desarrollo final. Dependiendo de la temperatura y el grado de daño, las áreas pueden tornarse blancas y hundidas (Nuez, 2001). El tejido debajo de las áreas dañadas es blanquecino y las células parcialmente colapsadas, reduciendo el grosor normal de las paredes locales (Figura 6).



Figura 6. Daños en el fruto ocasionados por exposición directa a los rayos solares (Nuez, 2001).

Los golpes de sol en el pericarpio de los frutos son causados por temperaturas que exceden los 40°C. En días soleados, la temperatura de la superficie de los

frutos puede superar en 10°C la temperatura del aire. El grado de daño a los frutos depende de intensidad de la radiación, calidad espectral, temperatura y duración de exposición. Si las temperaturas sobrepasan los 30°C pero no rebasan los 40°C, las áreas permanecen amarillas porque se impide la formación de licopeno, mientras que la producción de carotenos continúa arriba de los 40°C (Castellanos, 2011).

Frutos huecos

Los frutos huecos o “bofos” no tienen una buena conformación, ya que unas áreas son resaltadas y otras hundidas o aplanadas. Generalmente son frutos con cavidades excesivas con o sin semillas y sección poligonal. En el interior de los lóculos se encuentran una o varias cavidades vacías entre el contenido locular y la pared exterior (Figura 7). Los frutos hinchados carecen del “gel” que normalmente rodea a la semilla, dejando un espacio entre el tejido de la placenta y la pared externa del lóculo. Externamente, la fruta es más angular que redonda. Algunas variedades son huecas de forma natural. Las causas que generan frutos ahuecados son cualquier factor que contribuya a una polinización, fertilización y desarrollo seminal inadecuado. Estos factores pueden ser altos niveles de nitrógeno y bajos de potasio, insuficiente luz y temperaturas extremas. El ahuecado de los frutos ocurre por un balance negativo de carbohidratos, debido a un consumo elevado por altas temperaturas, sobrecarga de frutos, o bien por una baja síntesis de los mismos, o por una baja luminosidad y concentración de CO₂ (Boyle, 1994).



Figura 7. Fruto hueco o “bofo” por mala polinización (Castellanos, 2011).

Principales problemas fitosanitarios del cultivo de tomate

Principales Plagas del cultivo de tomate

Mosca blanca

Existen diferentes especies que atacan al cultivo de tomate; las dos principales son la llamada mosca blanca del invernadero *Trialeurodes vaporariorum* (West); y la mosca blanca del tabaco *Bemisia tabaci* (Genn). Se han identificado otras moscas blancas de importancia consideradas como una nueva especie (*B. argentifolli*) (Bellows *et al.*, 1994), o como el biotipo B de *B. tabaci*.

Bemisia tabaci es originaria del medio oriente, llegó a México en la década de 1980, introducida a través de los Estados Unidos (López, 1986). *Trialeurodes vaporariorum* es originaria de áreas tropicales de Centroamérica (Mosti y Benuzzi, 1992). Mosca blanca es una plaga cosmopolita presente en todo México, se trata de una plaga polífaga (se alimenta de muchas especies vegetales), lo que le permite estar presente todo el año. Como hospederos, tienen gran preferencia por plantas de la familia cucurbitácea, también se encuentra en cultivos de la misma familia del tomate como papa, pimiento y tomatillo (Rondón, 2004).

Las condiciones óptimas de desarrollo para *Trialeurodes vaporariorum* incluye una humedad relativa óptima de 75 % (Bernal *et al.*, 2008); una temperatura

media de 30°C, tardando alrededor de 26 días en pasar de huevecillo a adulto, mientras que a 20°C puede darse la transformación completa en 32 días. A temperaturas mayores a 30°C hay un alto grado de mortalidad de adultos (Castresana, 1986).

Bemisia tabaci está más adaptada a condiciones cálidas o tropicales. Su temperatura óptima está alrededor a los 30°C. A menos de 16°C el crecimiento de la población se estabiliza. En condiciones de baja humedad y temperatura <9°C, las larvas mueren y la población disminuye bruscamente. A 30°C de temperatura media, *Bemisia tabaci* tarda alrededor de 18 días en pasar de huevecillo a adulto (Sánchez *et al.*, 2005).

Las ninfas y los adultos presentan un aparato bucal de tipo picador chupador (Perea *et al.*, 2003). Al alimentarse perforan las células del follaje y succionan la savia de los tejidos vegetales, ocasionando daños directos (amarillamiento y debilitamiento de las plantas). Cuando hay más de 15 larvas por cm² los daños directos son de importancia (Onillon, 1976 citado por Lacasa y Contreras, 1998; Rodríguez *et al.*, 1996).

Las larvas de la mosca blanca excretan una melaza rica en azúcares como desecho de su alimentación, la cual, al caer sobre el haz de las hojas inferiores, origina el desarrollo del hongo de la fumagina (*Cladosporium sphaerosporum*) (Davidson *et al.*, 1994), también conocido como “hollín” (Aparicio *et al.*, 1998). Otro daño indirecto, es que le sirve de transporte a ciertos ácaros plaga del tomate, como el ácaro blanco *Polyphagotarsonemus latus*, se transporta en las patas de *Bemisia tabaci* (Bautista *et al.*, 2005; Parker y Gerson, 1994).

Bemisia tabaci es muy eficiente en la transmisión de más de 10 diferentes virus de los tipos geminivirus y meganovirus (Markham y Bedford, 1993). Dentro de estos se encuentra el de mayor importancia y recurrencia en tomate bajo invernadero, el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV), conocido como virus de la cuchara o del rizado amarillo del tomate (Zitter, 2001).

Paratrioza

La paratrioza (*Bactericera cockerelli* Sule), es un insecto picador chupador de savia, que pertenece al orden hemíptero, dentro de la familia Triozidae. En México se reportó por primera vez en 1947. Este insecto cuenta con un amplio rango de hospedantes de 19 familias, de las cuales 40 especies de solanáceas son sus favoritas (Cranshaw, 2002). Temperatura media de 23°C es óptima para su desarrollo (favorecido por noches frescas y días cálidos), afectándole desfavorablemente las condiciones climáticas con temperaturas extremas y secas.

Los daños directos son causados por las ninfas al alimentarse e inyectar las toxinas. Se ha demostrado que las ninfas pueden llegar a matar a las plantas si se establece antes de la floración y no se realiza algún método de control. Las plantas se ven amarillentas y raquílicas, con pérdida de rendimiento y frutos pequeños de baja calidad comercial.

En cuanto a daños indirectos, este insecto transmite fitoplasmas en el cultivo de tomate y causa la enfermedad denominada “*permanente del tomate*” (Garzón *et al.*, 2003). Las plantas atacadas por fitoplasma tienen un crecimiento anormal y los primeros síntomas se observan en los puntos de crecimiento, éstos se tornan de un color amarillento a morado produciendo hojas pequeñas y enrolladas, las hojas desarrolladas se enrollan hacia arriba en forma de cuchara y son quebradizas. Las plantas son altamente susceptibles al ataque de otros organismos como hongos, bacterias y nematodos quienes causan la muerte de la planta.

Principales enfermedades del cultivo de tomate

Hongos Fitopatógenos

Damping off

Causado por el complejo de hongos: *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* sp., *Fusarium* sp.), es muy común atacando plántulas de tomate

desde el vivero y primeras etapas de desarrollo en campo e invernadero (Figura 8). Cuando las plantulas recién emrgidas del suelo se marchitan rápido debido a la pudrición de los tejidos del cuello de la raíz y presentan un estrangulamiento en esa zona (*Rhizoctonia solani*) y, en ocasiones, se observa coloracion negruzca arriba del cuello (Jone *et al.*, 2014).



Figura 8. Pudrición de raíz y base del tallo. Síntoma característico de *Damping-off* en tomate (Bautista y Alvarado, 2006).

Fusarium spp es un género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas (Agrios, 1998). Las pérdidas de rendimiento en la producción de tomate en invernadero a menudo son del 20-60 % y algunas veces son mucho más altas; En el campo, se han reportado pérdidas del 20-40% (Jarvis, 1998).

Moho gris

Moho gris *Botryotinia fuckeliana* (De Bary) Whetzel (= *Botrytis cinerea* Pers.)
Una de las enfermedades importantes en invernadero, en hojas, tallos y flores produce tizones (polvo grisáceo) color café de forma irregular y anillos concéntricos. Signos y síntomas de la infección aparecen primero en los pétalos

de las flores, en lugares de irrigación, o sobre tejido senescente. El síntoma más común es el debilitamiento repentino de los tejidos suculentos, como son las hojas jóvenes, tallos y flores (Bautista y Alvarado, 2006). El fruto presenta manchas circulares con los bordes blancos a las cuales se les ha llamado “fantasmas”, después ocurre una necrosis de color café-rojiza y se cubre del polvo grisáceo (Jones *et al.*, 2014) (Figura 9).



Figura 9. Aborto de racimo floral y pudrición del fruto de tomate por *B. cinerea* (Bautista y Alvarado, 2006).

Tizón tardío

Causado por *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary, el síntoma típico en las hojas es la aparición de manchas irregulares de tamaño variable, son de color verde oscuro con los márgenes pálidos (Figura 10), y si las condiciones ambientales son húmedas, en los márgenes de la lesión en el se observa un algodoncillo fino blanco grisáceo compuesto por esporangióforos y esporangios de este oomiceto. A medida que la infección avanza, la mancha ennegrece (Bautista y Alvarado, 2006; Jones *et al.*, 2014).

Tizón temprano

Causado por *Alternaria tomatophila* Simmons, *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler, forma lesiones irregulares de color café oscuro, en cuyo interior se forman anillos concéntricos que se rodean de un halo amarillo como consecuencia de

la reacción del tejido sano a una toxina liberada por el desarrollo del hongo (Figura 11). Las hojas atacadas se tornan amarillas y se caen. Si el ataque es severo, se defolia toda la planta, lo que además de debilitarla deja los frutos expuestos a quemaduras de sol; por lo general, el ataque inicia en las hojas viejas (Bautista y Alavarado, 2006; Jones *et al.*, 2014).

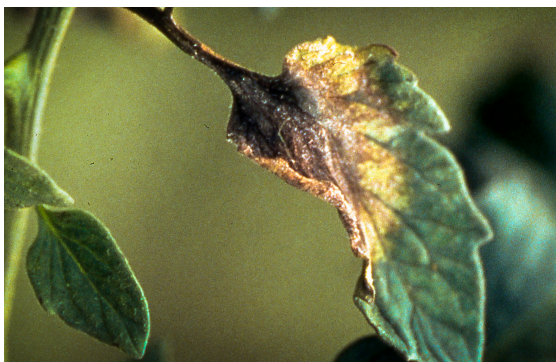


Figura 10. Síntomas por tizón tardío en hojas de tomate (Bautista y Alvarado, 2006).



Figura 11. Síntoma de Tizón temprano en hoja de tomate (Jones *et al.*, 2014)

El género *Alternaria* spp ataca los tallos, hojas y frutas del tomate. Este puede ahorcar las plántulas causando mal del talluelo en el semillero. En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo. Los daños de esta enfermedad pueden llegar hasta la defoliación. Las manchas en los frutos son similares a las de las hojas de color café y anillos concéntricos oscuros. (Jones *et al.*, 2014). La especie *Alternaria alternata* sp *lycopersici* Keissl. Es un hongo patogénico solo para el tomate y produce una toxina selectiva para el huésped (HST, por sus siglas en inglés), llamada toxina -AL. Esta toxina es soluble en agua y se desplaza

sistémicamente de los canchros del tallo a las hojas, dando como resultado lesiones necróticas intervenales (Akamatsu et al., 1997).

Bacterias Fitopatóneas

Cáncer bacteriano

Cáncer bacteriano del tomate *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Smith) (Davis et al., 1984), es considerada como la patología bacteriana de mayor importancia debido los efectos devastadores que tiene sobre los cultivos de tomate, disminuyendo la cantidad y calidad de los frutos (Borboa et al., 2009) y llegando a causar pérdidas de producción que van desde el 50 al 100%, según EFSA (2014). La principal vía de diseminación es por semilla o plántula injertada contaminada. En frutos presenta puntos hundidos de color café a negro con un halo, por lo cual es llamado “Ojo de Pájaro” (Figura 12). Las plantas infectadas pueden mostrar enanismo, clorosis, amarillamiento y presencia de canchros en tallos, posteriormente éstas se marchitan (Jones et al., 2014). Tanto los cultivos de siembra directa como los cultivos de trasplantes pueden verse afectados, lo que resulta en una pérdida de rendimiento de hasta el 100% (Hausbeck et al., 2000).

Después de infecciones externas, cuando la bacteria ingresa a través de tricomas rotos o aberturas naturales, las hojas, las flores y las frutas pueden mostrar infecciones localizadas (Carlton et al., 1998; Medina et al., 2001). Es una enfermedad sistémica, invadiendo los tejidos vasculares provocando marchitamiento, manifestándose inicialmente en algunos folíolos de un lado de la hoja hasta luego abarcar todas las hojas; canchros en tallos y pecíolos; oscurecimiento a nivel vascular en los tallos y en los frutos se pueden apreciar lesiones necróticas pequeñas y redondeadas rodeadas por un halo blanquecino. En condiciones de invernadero, con humedades elevadas el tallo se abre y se puede observar un flujo viscoso que contienen masas de bacterias (De León et al., 2011). En los frutos, *Clavibacter* puede transmitirse a las

semillas en desarrollo a través de los tejidos vasculares de la planta madre (Medina et al., 2001; Agrios, 1998).

Mancha Bacteriana

La mancha bacteriana (*Xanthomonas vesicatoria*) (Doige) Vauterin et al.(1995), se estiman que los daños causados por esta bacteriosis oscilan entre 3 y 18% y, en casos excepcionales, puede ocasionar pérdidas totales (Jones et al., 1991; Nuñez, 1998). Los síntomas inician en el envés, donde aparecen manchas angulares negras de 2 a 3 mm de diámetro de color verde oscuro y aspecto húmedo, las cuales adquieren una coloración gris púrpura cuyo centro es color negro y esta provisto de un halo amarillo claro. En ocasiones, el centro puede desprenderse, pero sigue manteniendo un halo amarillento. Como consecuencia de ello, las hojas caen prematuramente (Rodriguez, 2000).

Xanthomona spp se caracteriza por presentar lesiones necróticas en hojas, tallos y frutos. En verano causa severas defoliaciones de planta ocasionando perdidas en la producción (Pohronezny et al., 1986). En los frutos verdes aparece pequeñas manchas acuosas, tienen halos blancos verduscos de un diámetro de 3 a 6 mm (Agrios, 2004). Poco después los halos desaparecen y las manchas se van tornando de color marrón y de textura áspera (Jones, 1997). Como consecuencia, produce disminución del área foliar fotosintéticamente activa reduciendo el rendimiento, así como un desmerecimiento de la calidad cosmética del fruto (Jones et al., 1991; Blancard, 1992; Cerkauskas, 2005).

Peca bacteriana

(*Pseudomonas syringae* pv. Tomato) (Okabe) Young, Dye y Wilkie. La bacteria afecta hojas, tallos y frutos, en los que causa pequeñas lesiones de aproximadamente dos milímetros de diámetro, a menudo el centro de la lesión y

las hojas jóvenes pueden presentar agujeros (Rodríguez, 2000). Cuando el ambiente es favorable, las lesiones son más abundantes en el borde de los folíolos, en donde causa un tizón severo (Figura 13) (Apodaca *et al.*, 1998).

En los frutos, las lesiones son superficiales pero tienden a ser protuberantes y se encuentran hasta tomar apariencia de gotas de asfalto (Figura 13). Al madurar el fruto el halo que circula la lesión se vuelve más claro, hasta alcanzar un color amarillo intenso y brillante que contrasta con el rojo normal del fruto (Apodaca *et al.*, 1998).



Figura 12. Lesiones provocadas por cancro en hojas y frutos (Jones *et al.*, 2014).



Figura 13. Lesiones provocadas por la mancha bacteriana. A) Síntoma de la peca bacteriana en fruto. B) Síntoma de la peca bacteriana en hojas (Bautista y Alvarado, 2006)

Virus Fitopatógenos

Las enfermedades de origen viral en tomate son muy importantes en México debido a las pérdidas que ocasionan en la producción, así como al elevado costo que implica su manejo (Bautista y Alvarado, 2006). En muchas zonas productoras, el impacto de estas enfermedades ha sido devastador y, en casos extremos, la superficie cultivada ha disminuido considerablemente.

El tomate es afectado por más de 20 virus, de los cuales a continuación, se indican los virus más importantes reportados en México: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tomato mosaic virus* (ToMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Tobacco ringspot virus* (TRSV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) y *Alfalfa mosaic virus* (AMV) (Jones et al., 2014; Bautista y Alvarado, 2006).

Tobacco ringspot virus (TRSV)

Se reportó por primera vez en tabaco (*Nicotiana tabacum*) (Fromme et al., 1927). Los síntomas más importantes son la presencia de pequeñas manchas circulares de apariencia pálida en las hojas. Las manchas pueden estar rodeadas por un halo clorótico; otros síntomas pueden ser un moteado general de la hoja, mosaicos amarillentos y manchas anulares o necrosis (EPPO/CABI, 1997a y 1997b; DPVweb, 2012; VIDE, 2012).

EL TRSV pertenece al género de los *Nepovirus*, formas isométricas de aproximadamente 28 nm de diámetro y genoma de ARN de cadena sencilla (DPVweb, 2012).

Este virus puede transmitirse por semillas (Koike et al., 2007; DPVweb, 2012; EPPO, 2012), larvas de trips de la especie *Thrips tabaci* y, de manera menos eficiente, por ácaros del género *Tetranychus* (Stace-Smith, 1970).

El TRSV se ha encontrado de manera continua en plantaciones comerciales de tomate establecidas en Metztitlán, Hidalgo (Rubio, 2001).

Tobacco etch virus (TEV)

El TEV es importante en muchas zonas productoras de México y tiene como hospedante cerca de 120 especies de plantas pertenecientes a 19 familias (Shepherd y Purcifull, 1982).

Como el nombre lo indica, el síntoma característico por este virus consiste en un jaspeado de ligero a severo acompañado de distorsión foliar. Los síntomas en las hojas con un moteado intenso, pliegues y rugosidad. El fruto presenta moteados, deformes y disminución de tamaño. Cuanto más temprana ocurra la infección, menor será el rendimiento (Jones *et al.*, 2001; Pernezny *et al.*, 2003; Kalb, 2005; Koike *et al.*, 2007).

Son virus de varilla flexible, de 730 x 12 nm, y ARN de cadena sencilla. Más de 10 especies de áfidos se han señalado como vectores de TEV. La transmisión por semilla de TEV no se ha reportado (Pernezny *et al.*, 2003; Kalb, 2005; Koike *et al.*, 2007; Roberts *et al.*, 2004).

Se reportó en Canadá, USA, México, Puerto Rico, Jamaica y Venezuela, y es uno de los virus que causó las mayores pérdidas en algunas regiones de Venezuela y Estados Unidos. En México se ha reportado en Autlán, Jalisco y Metztitlán, Hidalgo (Martínez, 1990; Rubio 2001).

Cucumber mosaic virus (CMV)

El CMV es un virus que puede ser importante en muchas regiones productoras del país. Infecta especies mono y dicotiledóneas de al menos 40 familias botánicas (Francki *et al.*, 1979).

Los síntomas son variados, las plantas de tomate infectadas durante los primeros estados de desarrollo se muestran cloróticas, arbustivas y de tamaño reducido. Las hojas presentan un mosaico asociado con una reducción de la lámina foliar (más severa que la provocada por ToMV) que ocasiona lo que se conoce como “hoja de helecho” o “cordón de zapato”; en otros casos, las hojas

pueden tener un gran número de folíolos pequeños con los bordes hacia arriba (Francki *et al.*, 1979; Blancard, 1990; Dodson *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 2000).

El CMV es un miembro del género *Cucumovirus*, de partículas isométricas de 28-29 nm de diámetro, con cadena sencilla de ARN (VIDE, 2012). El virus puede ser transmitido por 75 especies de áfidos (Francki *et al.*, 1979). También se ha reportado su transmisión por semilla (Pernezny *et al.*, 2003; Persley *et al.*, 2010).

El CMV tiene una distribución mundial, se ha reportado en Metztitlán, Hidalgo (Rubio, 2001).

Tomato bushy stunt virus (TBSV)

El TBSV provoca la enfermedad conocida como “enanismo arbustivo” o “pinto” del tomate. Típicamente, el TBSV reduce el tamaño de las plantas y, debido al acortamiento de entrenudos, les proporciona una apariencia de arbusto (Martelli *et al.*, 1971). Los síntomas iniciales en hojas son lesiones necróticas circulares y locales, que aparecen cinco días después de la infección; estas hojas se vuelven cloróticas y con frecuencia caen. En los frutos se desarrollan manchas cloróticas y mosaicos lineales, lo cual reduce considerablemente su valor comercial (Jones *et al.*, 2001; DPVweb, 2012; VIDE, 2012; tbsv).

Contiene ARN de cadena sencilla que pertenece al género *Tombusvirus*, con partículas isométricas de 30 nm de diámetro (DPVweb, 2012; VIDE, 2012). Es muy estable y se transmite con facilidad mecánicamente (Dodson *et al.*, 1997) y sale a través de las raíces de plantas enfermas y puede entrar a raíces de plantas sanas por medio del agua de riego (Galindo *et al.*, 1980). Se puede transmitir por semillas e injertos en propagación vegetativa (Jones *et al.*, 2001). Se describió por vez primera en tomate en Gran Bretaña en 1935. En México el virus se ha reportado en Actopan, Hidalgo (Martínez, 1974).

Tomato spotted wilt virus (TSWV)

Este virus se reportó por vez primera en México infectando tomate en 1989 (Verdugo, 1989); en las variedades tipo saladette se han registrado daños de 100% (Ramírez y Ley, 1989).

Los síntomas ocasionados por TSWV son necrosis en folíolos, tallos y frutos asociada con una notoria disminución del crecimiento y marchitamiento que en grado extremo puede llegar a la muerte de la planta (Ramírez y Ley, 1989). En las hojas, este daño proporciona una coloración bronceada (Ie, 1970). Al inicio de la infección, en hojas apicales, se observan manchas anulares o circulares cloróticas que paulatinamente se vuelven de color amarillo hasta necrosarse (Dodson *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 2000). En fruto es frecuente la presencia de anillos concéntricos necróticos ligeramente realzados (Ramírez y Ley, 1998), de tamaño reducido y con deformaciones (Conti *et al.*, 2000).

El TSWV se transmite de forma persistente por diferentes especies de trips (Conti *et al.*, 2000). En tomate se ha reportado la transmisión por semilla (Ie, 1970).

El virus se ha reportado en Sinaloa, Meztitlán, Hidalgo (Ramírez y Ley, 1998; Rubio, 2001).

Alfalfa mosaic virus (AMV)

El AMV se encuentra distribuido a nivel mundial y puede infectar de manera natural cerca de 230 especies silvestres o cultivadas de 50 familias botánicas (Jaspars y Bos, 1980; Dodson *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 2000).

Este virus induce de manera frecuente infecciones latentes (asintomáticas); sin embargo, cuando hay manifestación de síntomas, lo típico es observar un mosaico o moteado amarillo brillante denominado comúnmente como “cálico” (Jaspars y Bos, 1980). La infección puede iniciar con un amarillamiento de las hojas superiores seguido de una coloración café de los ápices y necrosis de las venas (Conti *et al.*, 2000). En la médula de los tallos de plantas infectadas

con AMV pueden observarse lesiones necróticas longitudinales, mientras que en el floema de las raíces se presenta una coloración café rojiza (Dodson *et al.*, 1997)

El AMV puede transmitirse por semilla en porcentaje variable. Una vez establecido el cultivo, la principal forma de diseminación es por, al menos, 20 especies de áfidos de manera no persistente, destaca *Myzus persicae* (Jaspars y Bos, 1980; Dodson *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 2000).

Tobacco mosaic virus (TMV) y Tomato mosaic virus (ToMV)

El *TMV* y el *ToMV* son dos virus relacionados que infectan tomate y otras solanáceas. Ambos virus tienen una distribución mundial. En el tomate la presencia de estos virus bajo condiciones de invernadero y campo suelen ser una amenaza seria en todos aquellos lugares en donde los cultivares resistentes no están disponibles (Jones *et al.*, 2001; Pemezny *et al.*, 2003; Kalb, 2004a; Koike *et al.*, 2007). Pertenecen al género de *Tobamovirus*.

El *ToMV* induce la manifestación de un gran número de síntomas dependientes de la temperatura, intensidad luminosa, longitud del día, edad de la planta en la que ocurre la infección, variante del virus y la variedad del cultivo (Hollings y Huttinga, 1975). Provoca mosaicos o moteado amarillo y lesiones necróticas en tallo, pecíolos y frutos. Pueden provocar una disminución drástica de la lámina foliar, dando una apariencia de “hoja de helecho”, donde se tiene prácticamente a las venas (Dodson *et al.*, 1997). Los frutos pueden deformarse y mostrar anillos concéntricos o patrones en líneas de tejido necrótico, o bien, estrías y lesiones anulares de tejido suberificado (Conti *et al.*, 2000).

TMV y *ToMV* se transmiten fácilmente de manera mecánica y por semilla. En campo, se diseminan de manera rápida y eficiente por el roce de las plantas con manos y ropa, debido a la realización de labores culturales. La transmisión por semilla puede ser importante, pues se ha reportado que un fruto infectado con *ToMV* puede tener hasta 94% de semillas portadoras del virus (Hollings y

Huttinga, 1975; Dodson *et al.*, 1997; Conti *et al.*, 2000). El ToMV se ha reportado en Metztitlán, Hidalgo (Rubio, 2001), en Sinaloa y Autlán (Jalisco) (Martínez, 1990; ley y García, 1998).

Virus del *Tobacco mosaic virus* (TMV)

Tobacco mosaic virus (TMV) fue el primer virus en ser descubierto hace ya más de un siglo y fue el primer virus alguna vez purificado. Desde entonces ha generado fascinantes perspectivas de cómo los virus infectan a sus hospederos. En 1892, Martinus W. Beijerinck de los Países Bajos, propone sus ideas de que TMV era pequeño e infeccioso. Además, él demostró que TMV no podía ser cultivado, excepto en plantas vivas y en desarrollo. Este reporte, sugiriendo que los “microbios” no necesitan ser celulares, cambió para siempre la definición de patógenos. En 1946, Wendell Stanley fue premiado con el Premio Nobel por su aislamiento de cristales de TMV, de los cuales él sugirió incorrectamente, estaban compuestos enteramente de proteína. Una investigación realizada por F.C. Bawden y N. Pirie, en Inglaterra, durante el mismo periodo de tiempo, correctamente demostró que TMV era en realidad una ribonucleoproteína, compuesta de ARN y una proteína de cobertura. El TMV es un virus de ARN de cadena positiva que pertenece al género Tobamovirus de la familia Virgaviridae. Se multiplican con alta eficiencia. Por ejemplo, en un día se producen 10⁶ copias de la progenie ARN TMV en una célula de tabaco a partir de varias moléculas del genoma parental, y los viriones TMV se acumulan con un rendimiento de >1 g por 100 g de hojas de tabaco fresco infectadas con TMV varios días después de la simple inoculación mecánica. Desde su reconocimiento como virus, una entidad infecciosa que pasa a través de un filtro que retiene bacterias, TMV ha servido durante mucho tiempo como modelo para la investigación biológica básica y ha contribuido al

establecimiento de muchos conceptos importantes (Harrison y Wilson, 1999; Scholthof, 2004).

El TMV se encuentra distribuido en prácticamente todas las zonas productoras de tomate en México y tiene la capacidad de infectar a la mayoría de las variedades cultivadas (Ley y García, 1998).

Ubicación taxonómica (según ICTV, 2019).

Reino: *Riboviria*

Phylum: No asignado

Clase: No asignado

Orden. No asignado

Familia. *Virgaviridae*

Genero. *Tobamovirus*

Especie. *Tobacco mosaic virus*

Acrónimo. TMV

Código decimal ICTV 71.0.1.0.012

Etiología del *Tobacco mosaic virus* (TMV)

Morfología

Las partículas del virus tienen forma de varilla: no envueltos, miden cerca de 15-18 nm de diámetro y tienen una longitud predominante de 300-310 nm (Figura 14). La estructura y el ensamblaje de las partículas han sido revisados por (Klug 1999). Los viriones más cortos producidos por la encapsidación de ARN de tamaño subgenómico suelen ser un componente menor de la población de viriones, aunque los viriones de dos especies producen un virión corto abundante de 32-34 nm. Los viriones a menudo forman grandes conjuntos cristalinos visibles por microscopía óptica.

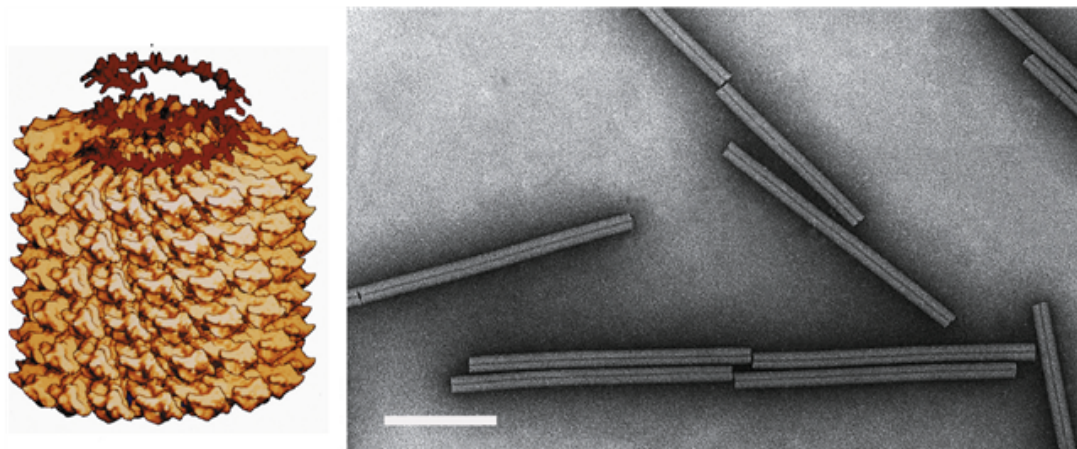


Figura 14. TMV. (zquierda) Modelo de partícula del virus del mosaico del tabaco (TMV). También se muestra el ARN, ya que se cree que participa en el proceso de ensamblaje. (Derecha) Micrografía electrónica de contraste negativo de partículas de TMV teñidas con acetato de uranilo. La barra representa 100 nm. Micrografía electrónica de partículas con forma de varilla de *Tobacco mosaic virus* (300 nm x 15 nm) (ICTV, 2018).

Propiedades de la partícula:

- a) **Propiedades físicas:** Un componente de sedimentación en preparaciones purificadas; coeficiente de sedimentación 194 s. densidad 1.325 g cm^{-3} en CsCl. Punto isoeléctrico pH 3.5.
- b) **Punto de inactivación térmica:** en savia de tabaco es de 90C por 10 min.
- c) El **punto de final de dilución** se desconoce.
- d) La **longevidad *in vitro*** sobrevive en savia de la planta hasta 10 años.
- e) **Propiedades bioquímicas:** Los viriones contienen 5% de ácido nucleico; 95% de proteína; 0% de lípidos. También incluye una pequeña cantidad de iones metálicos (ICTV, 2018).

Organización del genoma y replicación

El genoma de TMV consiste en un ARN de cadena sencilla (ss) de 6.3 a 6.6 kb. (ICTV, 2018). Una sola partícula de TMV está compuesta por una hélice de 2130 subunidades de proteína de cobertura (CP) que envuelve a un ARN de cadena sencilla con sentido positivo de aproximadamente 6400 nucleótidos. Esta cadena sencilla de ARN codifica cuatro genes: dos proteínas asociadas a la replicasa que son directamente traducidas del ARN de TMV, y la proteína de movimiento (MP) y la proteína de cobertura (CP) que son traducidas de ARNs subgenómicos (Figura 15) (Hull, 2002).

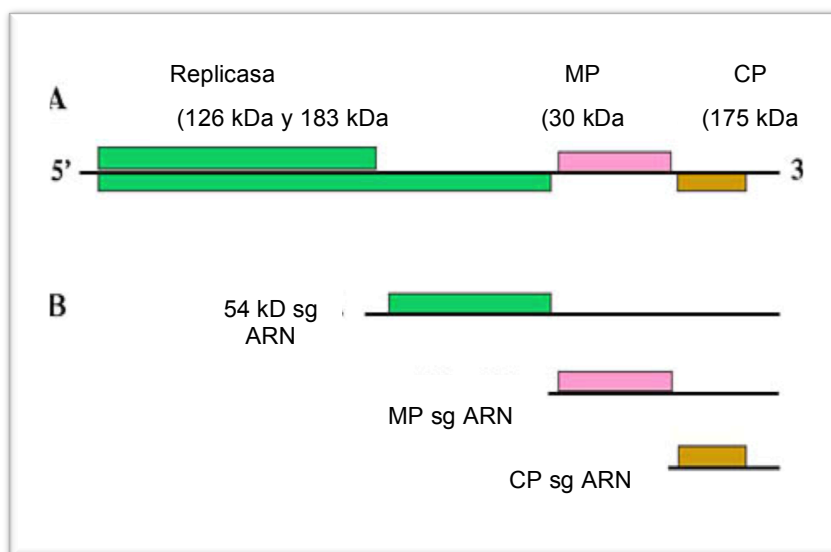


Figura 15. ARNs genómico y subgenómico de *Tobacco mosaic virus* (Scholthof, 2000).

El ARN genómico de TMV con sus 6,400 nucleótidos actúa como un ARN mensajero para la expresión de proteínas asociadas a la replicasa de 126 kDa y 183 kDa (Figura 16). Los otros genes en el ARN de *TMV* son expresados a partir de ARNs subgenómicos (sgRNAs) durante el ciclo de replicación. La proteína de movimiento (MP), la proteína de cobertura (CP), y las proteínas de

la replicasa (RP) han sido detectadas en plantas infectadas con TMV. El sgRNA de 54 kDa se acumula en plantas infectadas con *TMV*, pero hasta el momento proteínas predichas de 54 kDa no han sido detectadas. Los viriones de *TMV* con forma de varilla están compuestos por la CP y el ARN genómico. El número de codones que se utilizan para su síntesis es solo una fracción de la cantidad total de codones disponibles (158 de los 2130). Es probable que los codones restantes participen en la síntesis de varias otras proteínas, ya sea estructurales o enzimas. El peso de cada virus fluctúa entre 39 y 40 millones de unidades de peso molecular (ICTV, 2018).

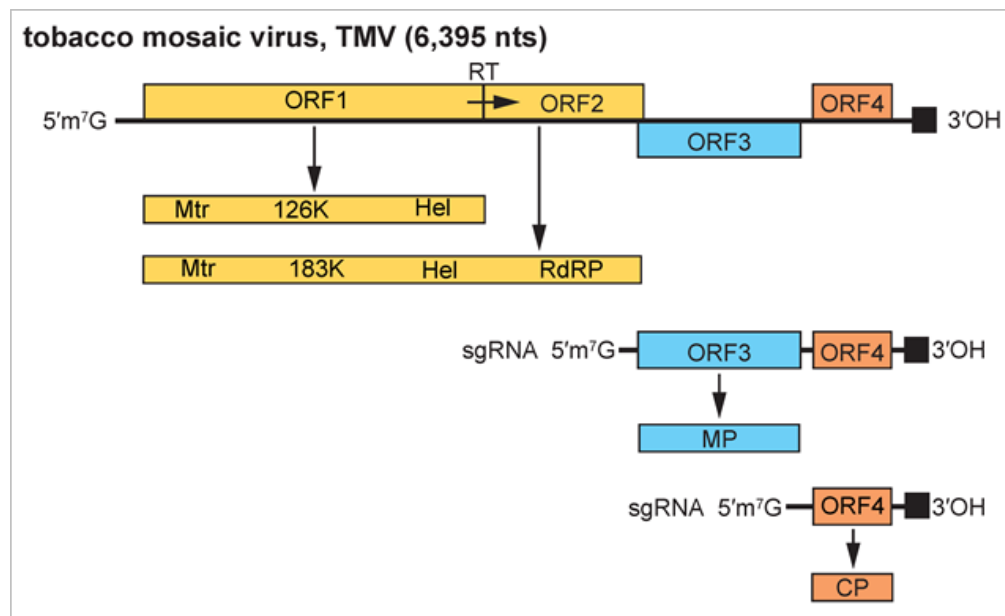


Figura 16. Organización del genoma del virus del mosaico del tabaco (TMV). El ARN genómico está cubierto y es una plantilla para la expresión de las proteínas de 126 y 183 kDa. Los ORF de proteína de movimiento distal 3' (MP) y proteína de cápside (CP) se expresan a partir de sgRNAs co-terminales 3' separados. El motivo de la estructura de ARNt en el extremo 3' del ARN está representado por un cuadrado oscuro (ICTV, 2018).

La replicación de ARN ocurre a través de varios pasos: (a) síntesis de proteínas de replicación viral por traducción del ARN genómico; (b) unión acoplada por traducción de las proteínas de replicación a una región 5'-terminal del ARN genómico; (c) reclutamiento del ARN genómico mediante proteínas de replicación en membranas y formación de un complejo con proteínas huésped TOM1 y ARL8; (d) síntesis de ARN complementario (cadena negativa) en el complejo; y (e) síntesis de ARN genómico de progenie (Ishibashi and Ishikawa 2016).

Ciclo de la enfermedad

TMV entra a la célula de la planta a través de heridas menores. Una vez que TMV penetra a la célula, las partículas virales se desarmen en una manera organizada para exponer el ARN del TMV. TMV entra a la célula de una planta herida para comenzar el ciclo de replicación (Figura 17 [1]). Mientras las moléculas de proteína de cobertura (CP) son removidas del ARN [2], ribosomas del hospedero comienzan a traducir las dos proteínas asociadas a la replicasa. Las proteínas de la replicasa (RP) son usadas para generar una plantilla del ARN en sentido negativo (sentido -) del ARN del virus [3]. Este ARN sentido - es, sucesivamente, usado para generar ambos ARN de longitud completa con sentido positivo (sentido +) de TMV [4] y el ARN subgenómico (sgARNs) con sentido + [5] que son usados para expresar la proteína de movimiento (MP) y CP. El ARN de TMV con sentido + puede ser encapsidado por el CP para formar nuevas partículas de TMV [6] o envuelto con MP [7] para permitir su desplazamiento a una célula adyacente para otra ronda de replicación (Scholthof, 2000). Se ha estimado que las células vegetales infectadas por el virus del mosaico contienen entre 1 000 000 y 10 000 000 de partículas virales por célula. (Markham *et al.*, 1964).

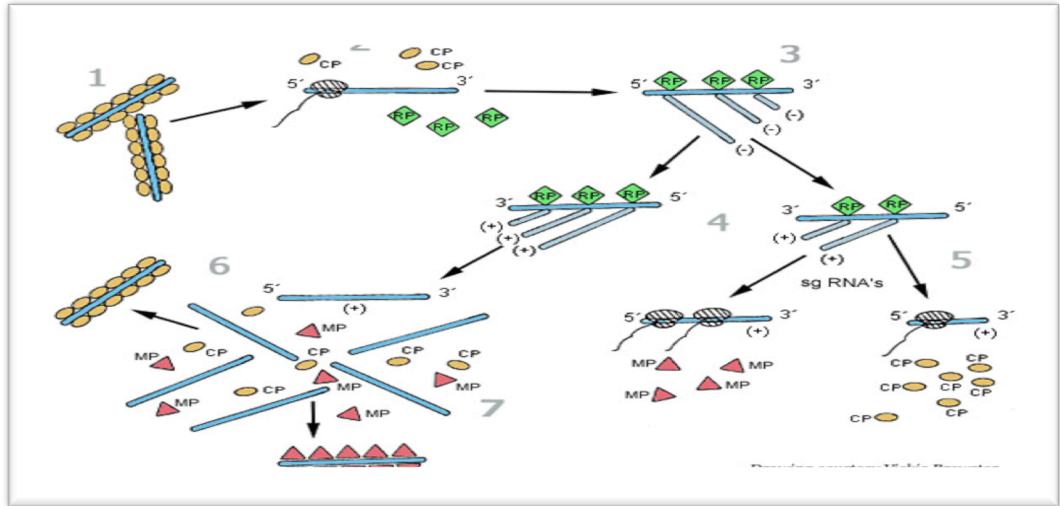


Figura 17. El ciclo de replicación de *Tobacco mosaic virus* (TMV) (Scholthof, 2000).

Movimiento dentro de la planta

TMV usa su proteína de movimiento para propagarse de célula-a-célula a través de los plasmodesmos, los cuales conectan las células de la planta (Figura 18). Normalmente, los plasmodesmos son demasiado pequeños para el paso de partículas intactas de *TMV*. La proteína de movimiento (probablemente con la asistencia de proteínas del hospedero aun no identificadas) agranda las aberturas plasmodesmales permitiendo que el ARN de TMV se mueva hacia células adyacentes, libere la proteína de movimiento y las proteínas del hospedero, e inicie una nueva ronda de infección. La proteína de movimiento (MP) se une al ARN viral (Figura 18 [1]). Proteínas del hospedero y/u otras proteínas codificadas por el virus pueden estar incluidas en el complejo-MP [2]. El complejo-MP después se mueve de célula-a-célula a través de los plasmodesmos [3]. Cuando el complejo se localiza en una nueva célula, el MP (y cualquier proteína del hospedero) son presumiblemente liberadas del ARN de TMV [4], permitiendo la traducción del ARN genómico para expresar las proteínas de la replicasa e iniciar una nueva ronda de replicación [5] (Figura 18).

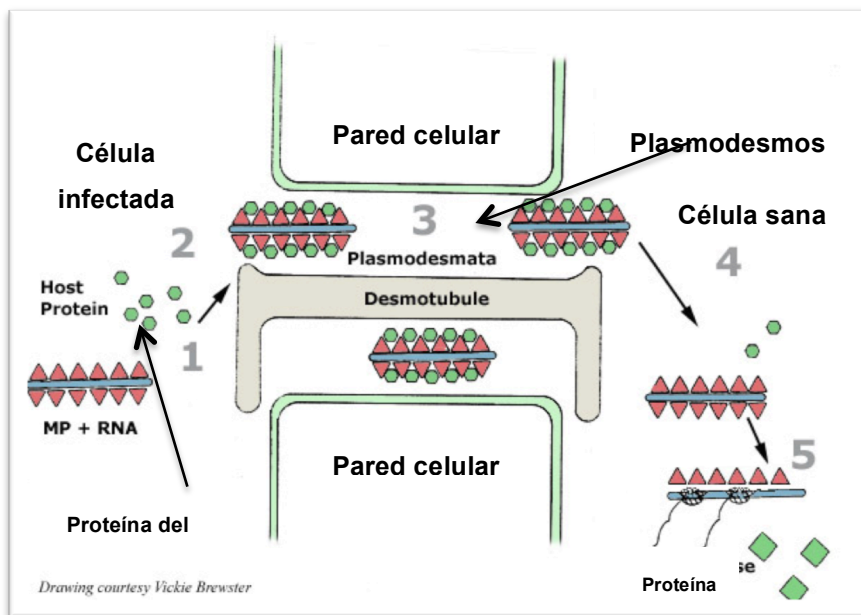


Figura 18. Movimiento de *Tobacco mosaic virus* (TMV) dentro de las células (Scholthof, 2000).

Mientras el virus se mueve de célula a célula, eventualmente alcanza el sistema vascular de la planta (nervadura) y se propaga rápidamente, de forma sistémica, a través del floema a las raíces y las puntas de la planta en crecimiento (Agrios, 2008). Para que un virus infecte a una planta, primero debe pasar de una célula a otra y propagarse por la mayoría de las células en las que se mueve. Dentro de las células, el TMV se sitúa principalmente en el citoplasma en forma de partículas individuales como agregados cristalinos (Figura 19) y en forma de cuerpos amorfos (cuerpos X).

Los primeros viriones aparecen en las células aproximadamente 10 horas después de haberse producido la inoculación. En las células parenquimatosas de la hoja, el virus se desplaza aproximadamente 1 mm a un ritmo de 8 a 10 células por día (Agrios, 2008). Gran cantidad de ellos son transportados con rapidez a grandes distancias a través del floema (Figura 20). Se mueven con una velocidad hasta de 15 cm en los primeros 6 minutos. Cuando el virus ha entrado al floema, se mueve con rapidez hacia las zonas en proceso de

crecimiento (meristemos apicales) o hacia otras regiones de la planta donde se utilizan los fotosintatos, tales como los frutos (Cheplick *et al.*, 1983).

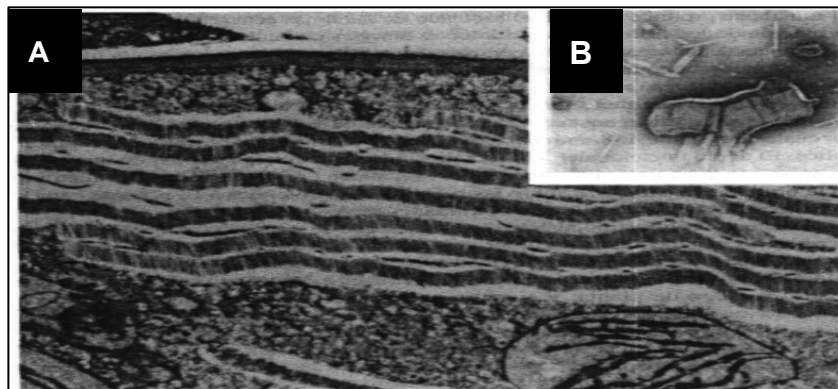


Figura 19. A) Capas de partículas del virus del mosaico del tabaco TMV en una célula epidérmica de la hoja del tabaco. B) Partículas del TMV en la savia de una hoja de tabaco infectada (Agrios, 2008).

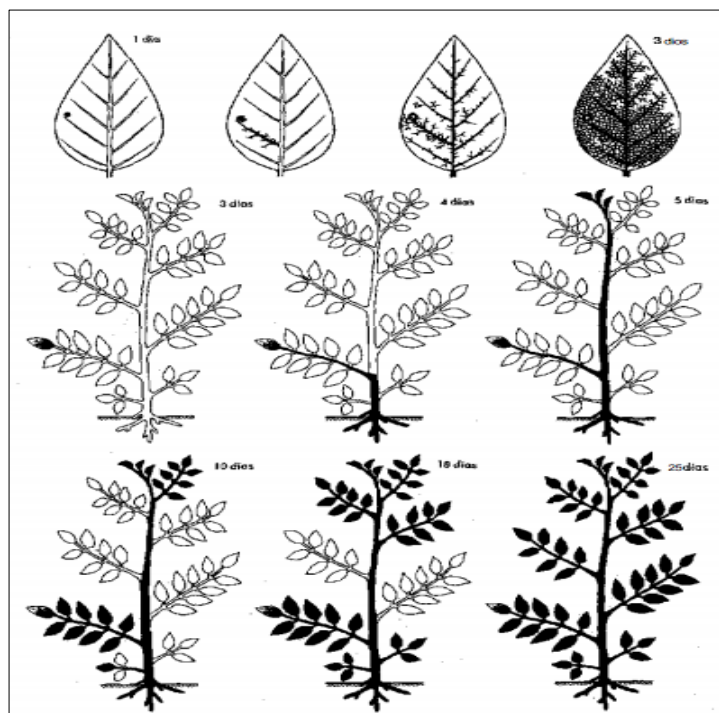


Figura 20. Esquema en el que se muestra la dirección y velocidad de translocación del VMT en una planta (Agrios, 2008).

Epidemiología

El ciclo de la enfermedad de TMV y su epidemiología están íntimamente relacionados porque el virus es completamente dependiente del hospedero para su replicación y propagación. Hay una amplia variación en la incidencia de la enfermedad, dependiendo del momento de iniciación de la enfermedad en el campo y de las prácticas de cultivo. Por ejemplo, unas pocas plantas podrían infectarse al principio de la temporada, ya sea por TMV presente sobre la cobertura de la semilla o por trabajadores que contaminan las plantas. La enfermedad podría después propagarse rápidamente en todo el campo o invernadero por plantas infectadas con TMV que entran en contacto con plantas sanas, por equipo contaminado o por medio de los trabajadores. TMV también puede sobrevivir o pasar el invierno en restos de plantas infectadas u hospederos perenes (maleza) y, quizás, en el suelo. Prácticas agrícolas, tales como cultivos continuos, tienen el potencial de ser un problema, especialmente en invernaderos, donde se puede incrementar el inóculo de TMV en más de una especie de planta (Scholthof, 2000).

Métodos de transmisión

La fuente de inóculo del TMV lo constituyen las plántulas procedentes de semillas contaminadas, el suelo contaminado con raíces y los restos vegetales de plantas enfermas. El virus inverna en los tallos y hojas del tomate infectadas que se encuentran sobre el suelo, sobre la semilla contaminada, sobre la ropa contaminada en los almácigos y en la hoja natural y manufacturada del tabaco, incluyendo cigarrillos. No se reportan insectos vectores (Jones et al., 2001). El virus es muy estable y son fácilmente transmitidos por savia, donde el hombre es la principal fuente de diseminación del TMV (Hull, 2002), el cual puede transmitirse mecánicamente y puede mantenerse viables por dos años en residuos de plantas de tabaco en suelos secos. Sin embargo, rápidamente

pierde su infectividad, cuando los residuos se mantienen en suelos húmedos. (Conti *et al.*, 2000; Pernezny *et al.*, 2003).

La forma de transmisión de este virus es esencialmente por contacto (Broadbent, 1961; Jones *et al.*, 2014; Hull, 2002). El contacto de una planta enferma con una planta sana, provocado por el viento o a través de las manos de los operarios, de su ropa o de herramientas de trabajo contaminadas, es suficiente para transmitirlo.

Además el virus es transmitido por la semilla del tomate, estando localizado en las envueltas de la semilla y, en menor proporción, en el endospermo, pero no en el embrión. El virus puede conservarse y mantenerse viable en el endospermo hasta 9 años (Subramanya, 2013; Jones *et al.*, 2014; Hull, 2002).

Síntomas y daños

En tomate, el TMV produce una infección sistémica con síntomas como achaparramiento, moteado, mosaicos de las hojas, enrollamiento y amarillamiento de tejidos de la planta, las infecciones tempranas pueden llevar a la muerte de las plantas (Schumann, 1991; Jones *et al.*, 2014). Causa daños graves y pérdidas en la cosecha del 11 al 79% (Broadbent y Cooper, 1964), particularmente bajo invernadero, se calculan pérdidas medias anuales por las virosis del tabaco de un millón de dólares (Requena *et al.*, 2010).

En tomate, los síntomas son muy dependientes de la edad de la planta infectada, las condiciones ambientales, la raza del virus, y el antecedente genético de la planta hospedera (Aguado *et al.*, 2014). El síntoma más característico consiste en alteraciones de la forma y color de los folíolos, alternándose áreas cloróticas con otras de color verde normal y verde oscuro (mosaicos), los folíolos se deforman apareciendo rizados, abarquillados o con aspecto filiforme (Figura 21). Causando pobre rendimiento o frutos deformados, madurez atrasada en frutos, y fruto con color no uniforme (Scholthof, 2000) (Figura 22).



Figura 21. Síntomas de TMV en folíolos de tomate (Aguado *et al.*, 2014).



Figura 22. Síntomas de TMV en frutos de tomate (Aguado *et al.*, 2014).

En infecciones precoces se reduce el crecimiento de la planta, el tamaño y el número de frutos con la consiguiente repercusión negativa en el rendimiento, también puede observarse la caída de flores. Frecuentemente los frutos reducen su tamaño y muestran manchas decoloradas amarillas, irregulares o en forma de anillo, otras veces se presentan alteraciones necróticas externas e internas (Aguado *et al.*, 2014; Jones *et al.*, 2014) (Figura 22). Cuanto más

precoz es la infección, mayor es la repercusión en la producción. La intensidad de los síntomas puede variar dependiendo de diversos factores, entre ellos: la cepa del virus, el cultivar de tomate, la intensidad de la luz, la temperatura, la edad de la planta en el momento de la infección, el contenido de nitrógeno en el suelo, etc (Aguado *et al.*, 2014).

El TMV produce infecciones sistémicas e invaden a todas las células parenquimatosas de la planta. Las hojas infectadas por el TMV muestran zonas de color amarillento o verde claro. En las áreas de color verde claro tanto las células del parénquima esponjoso como las del parénquima empalizada son redondas, a diferencia de su forma alargada normal (Hull, 2002).

El resultado más general de la infección viral es causar una reducción en la actividad fotosintética (Hull, 2002). Esta reducción parece ser una consecuencia secundaria de la infección que ocurre un tiempo después de que la producción del virus y el desarrollo de los síntomas están en marcha. En las áreas claras, el número de cloroplastos disminuye en grado considerable. El amarillamiento observado en las plantas inoculadas con TMV es la deficiencia de proteínas y ribosomas en las células del cloroplasto (Hull, 2002; Jones *et al.*, 2014, Agrios, 2008; Harrison y Wilson. 1999). Hirai y Wildman (1969) descubrieron que durante la infección sistémica temprana por TMV en el tabaco, se inhibió la síntesis de ribosomas y proteínas del cloroplasto. Así, la síntesis de la clorofila se altera, mientras que cierta cantidad de ella que se forma, se destruye o su actividad se inhibe debido a la infección por el virus. Esto da como resultado un menor nivel fotosintético y, por lo tanto, menores niveles de carbohidratos en las plantas infectadas por el TMV. Esto ocasiona una reducción en la altura y acumulación de biomasa en la planta e induce también alteraciones en varios otros procesos fisiológicos de las plantas (Scholthof, 2000; Hull, 2002).

Hirai y Wildman (1969) descubrieron que durante la infección sistémica temprana por TMV en el tabaco, se inhibió la síntesis de ribosomas y proteínas del cloroplasto. En las islas de color verde amarillo en el mosaico inducido por

TMV en la col china, la concentración de ribosomas de 68S se reduce considerablemente (Reid y Matthews, 1966). La pérdida de ribosomas es más o menos paralela a la pérdida de clorofila (Hull, 2002).

El contenido total de nitrógeno de las hojas de tabaco se ve poco afectado por la infección con TMV, y la cantidad de nitrógeno proteico sólo aumenta ligeramente, pero el virus puede representar hasta tres cuartos de la proteína en la hoja y se produce a expensas de proteínas foliares normales (Holden y Tracey, 1948; Bawden y Kassanis, 1950).

Manejo de la enfermedad

Algunas medidas preventivas en los invernaderos es tener control de insectos y con ello reducir la transmisión del virus en el cultivo, eliminar las plantas infectadas con TMV con el fin de tener un control y no transferir a las sanas y el uso de semillas sanas y registradas, con variedades de resistencia genética (Dombrovsky y Smith, 2017).

Prácticas Hortícolas: Para reducir la infección de plantas con TMV todas las herramientas deben ser lavadas con jabón o una solución a 10% de cloro para inactivar el virus. El suelo contaminado con TMV debe ser desechado. Para evitar transmitir el virus de una planta infectada a plantas sanas se debe evitar el contacto entre la manguera de riego o regaderas con las plantas. Se debe tener cuidado al desechar hojas muertas y plantas viejas, pues hojas viejas infectadas con TMV pueden ser diseminadas alrededor del invernadero como “polvo” que puede, subsecuentemente, infectar plantas sanas que estén heridas (Scholthof, 2000).

Protección cruzada: La inoculación de un raza leve del virus en plantas jóvenes puede protegerlas de una subsecuente infección por una raza más severa de TMV. Esta es una estrategia de control bien documentada, llamada “protección cruzada”, que es exitosamente aplicada en invernaderos. Las plantas

transgénicas también ofrecen estrategias alternativas para el control del virus (Scholthof, 2000).

Biología. Técnicas de ingeniería genética han permitido que científicos logren expresar el gen de la proteína de cobertura de TMV en plantas transgénicas de tabaco y tomate. Esta estrategia de control puede proteger a las plantas de infección por razas del virus cercanamente relacionadas (Abel *et al.*, 1986).

Eliminación de inóculo. Bajo condiciones experimentales, ha sido demostrado que TMV puede ser inactivado cuando los trabajadores sumergen sus manos contaminadas en leche antes de la siembra (Denby y Wilks, 1963). Esta técnica barata reduce notablemente la incidencia de la enfermedad. Plántulas, de las que se sabe son susceptibles, no deben ser trasplantadas a suelo que contiene raíces contaminadas con TMV o desechos de planta (Scholthof, 2000).

Debido a que TMV es altamente infeccioso, los enfoques agronómicos para el control, como los tratamientos de semillas, el saneamiento y la protección cruzada con cepas atenuadas, no han sido totalmente efectivos. El análisis fitosanitario de la semilla juega un papel predominante en el proceso de selección de lotes de semillas fitosanitariamente regulados, como una de las medidas de control más efectiva contra pérdidas de rendimiento y calidad causada por TMV en el cultivo de tomate.

La semilla de tomate como fuente de inóculo de fitopatógenos

La transmisión de fitopatógenos en el cultivo de tomate por medio de semilla es significativa por las mismas razones que los mecanismos de dispersión para los propágulos vegetativos (McCubbin, 1954; Smith *et al.*, 1993), además de que algunos son exclusivos de la semilla (Cuadro 2). La actitud de que la transmisión de semillas no es más que otro tipo de dispersión de patógenos

indica que no se tienen en cuenta las implicaciones biológicas y las adaptaciones involucradas.

Muchos patógenos no causan problema a la semilla ni a las plántulas durante su germinación y emergencia, pero constituyen uno de los mecanismos más eficientes en la introducción y la dispersión de patógenos a través de continentes y de la introducción de enfermedades en nuevas áreas (Gitaitis y Walcott, 2007).

Cuadro 2. Fitopatógenos transmitidos por semillas de tomate.

Hongos	Bacterias	Virus
<i>Didymella lycopersici</i> Kleb. (anamorfo <i>Phoma lycopersici</i> Cooke) (Fagg y Fletcher, 1987).	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> (Smith) Davis et al. 1984 (Werner et al., 2002).	<i>Tomato aspermy virus</i> TAV (Blancard, 2012; Brierley et al., 1955).
<i>Alterenaria solani</i> Sorauer. (Frazer, 2002)	<i>Pseudomonas syringae</i> van Hall pv. <i>tomato</i> (Okabe) Young, Dye and Wilkie (Cuppels et al., 2006)	<i>Tobacco mosaic virus</i> TMV (Broadbent, 1965; Pelham, 1996; Rast, 1975; Jones et al., 2014)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Radicis lycopersici</i> Jarvis and Shoemaker (Menziez and Jarvis, 1994).	<i>Xantomonas</i> : <i>X. vesicatoria</i> (ex Doidge) (Vauterin et al. 1995) <i>X. euvesicatoria</i> (Jones et al., 2014). <i>X.gardneri</i> (ex Sutic) (Jones et al., 2014) <i>X. perforans</i> Jones et al., 2014	<i>Tomato mosaic virus</i> ToMV (Broadbent, 1976; Aramburu y Galipienso, 2005; Fletcher, 1984; Jones et al., 2014)
	<i>Pseudomonas viridiflava</i> (Burkholder) Dowson. (Aysan et al., 2004).	<i>Pepino mosaic virus</i> PepMV (Ling, 2007; Ling and Carpenter, 2005; Salomone y Roggero, 2002).

Las semillas permanecen viables durante un período mucho más largo que los propágulos vegetativos, lo que prolonga el período de transmisión potencial y, por lo tanto, la posibilidad de diseminación de patógeno. Los patógenos generalmente permanecen viables durante más tiempo en asociación con el huésped que por separado o en el suelo, y esto parece ser particularmente

cierto en la condición latente en la semilla. Tanto la semilla como el patógeno generalmente sobreviven por varios años, la enfermedad reaparece en la progenie (Smith *et al.*, 1993). Por tales razones, la propagación de un patógeno en largas distancias se facilita mediante la asociación con la semilla más que con los propágulos vegetativos.

El establecimiento de patógenos en muchas áreas aisladas de cultivos de tomate se debe sin duda a la transmisión por semillas y esto a su vez proporciona numerosos focos de infección primaria (Jones *et al.*, 2014).

Mecanismos de transmisión de virus por semilla

El mecanismo específico por el cual algunos virus vegetales se transmiten a través de la semilla, mientras que otros están excluidos, se conoce muy poco. Las conexiones citoplasmáticas entre la planta madre infectada, la flor y las semillas en desarrollo influyen en la infección de la semilla. Cuanto mayor sea la infección de la semilla embrionaria, mayor será el tamaño y el número de conexiones citoplasmáticas. Como las legumbres desarrollan conexiones citoplasmáticas con mayor frecuencia que los cereales, el porcentaje de transmisión del virus a través de las semillas en las legumbres es mayor que en los cereales (Subramanya, 2013). Factores como los aspectos ambientales, la etapa de infección, el cultivar del huésped y la cepa del virus juegan un papel importante en la transmisión de semillas en diferentes combinaciones de virus y huésped (Hull, 2002).

La transmisión de la semilla se logra por invasión directa del embrión a través del óvulo o por invasión directa del embrión, mediada por gametos infectados. Para algunos virus en ciertos huéspedes (por ejemplo, BSMV en cebada), ambos procesos operan simultáneamente, aunque la contribución relativa de los dos procesos variará dependiendo de una gran cantidad de factores (Mandahar 1981). Para la invasión directa de embriones, actualmente no hay

una explicación de cómo el virus puede cruzar el límite entre las generaciones parentales y de progenie en el óvulo, y no se han identificado rutas que conduzcan al establecimiento del virus en los tejidos del embrión en desarrollo.

Distribución del virus en la semilla

La ubicación del virus en la semilla determina la transmisibilidad del virus a través de la semilla. Se considera que el virus se transmite externamente desde la semilla cuando está fuera de la semilla funcional y se transmite internamente cuando está dentro del tejido de la semilla, respectivamente. Cuando la semilla se transmite externamente, el virus se limita a la testa como contaminante. En el caso de semillas de frutas carnosas como tomate, pepino, sandía y manzana, los virus como TMV, ToMV, PVX, CGMMV y *Tomato bushy stunt*, respectivamente, se adhieren a la cubierta de la semilla. Durante la germinación, la infección por el virus se produce a través de las pequeñas abrasiones causadas por pequeñas partículas de suelo. Se sugiere que los puntos de contacto entre la testa y el suspensor sean una ruta de entrada. Se sugiere además que el virus puede pasar a través de la pared celular entre la testa y el sustrato por un mecanismo aún no identificado que no requiere plasmodesmos, o puede inducir la formación de nuevos plasmodesmos, lo que permite la invasión directa del embrión (Subramanya, 2013). Huttings y Rast (1995) informaron que el virus del mosaico del tomate en la semilla de tomate se localiza en la cubierta de la semilla y, a veces, en el endospermo.

Ahora se entiende claramente que hay dos formas de infectar al embrión en desarrollo: por invasión indirecta a través de la infección de los gametos antes de la fertilización o por invasión directa del embrión después de la fertilización. Para muchas interacciones virus-huésped, ambos modos de infección embrionaria pueden resultar en la transmisión máxima de semillas (Johansen *et al.* 1994).

Los virus transmitidos por semillas de la invasión directa del virus después de la fertilización se encuentran en diferentes tejidos de semillas y pueden limitarse al embrión o los tejidos del endospermo. En tales casos, la infección se origina en la producción de gametos femeninos. Algunos ejemplos de virus transmitidos internamente por semillas son BCMV, PSbMV, TRSV, SBMV, LMV, BSMV, PMV, PEBV, CMV, y *Urd leaf crinkle virus*. Cada virus ha sido detectado internamente en cotiledones y embriones de sus respectivos anfitriones (Ekpo y Saettler, 1974; Ladipo, 1977; Adams y Kuhn, 1977; Uyemoto y Grogan, 1977; Hoch y Provvidenti, 1978; Datta Gupta y Summanwar, 1980; Beniwal *et al.*, 1980; Beniwal y Chaubey, 1984; Bharatan *et al.*, 1984; Patil y Gupta, 1992; Varma *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1997; De Assis Filho y Sherwood, 2000; Roberts *et al.*, 2003; Ali y Kobayashi, 2010).

La longevidad de virus en semillas

La estabilidad del virus en la semilla depende de su tipo, ubicación y el huésped. En la mayoría de los casos, los virus que infectan al embrión sobreviven por períodos más largos, a veces incluso tanto tiempo como las semillas (Erkan, 1998). Por ejemplo, el BCMV en la semilla de frijol permaneció viable durante 30 años, el *Sowbane mosaic virus* en *Chenopodium murale* durante 14 años, el PNRSV en *Prunus pensylvanica* durante 6 años y el *Squash mosaic virus* (SqMV) en *Cucurbita pepo* y TRSV en soja durante más de 5 años. Muchos potyvirus como SMV y CpAMV sobreviven durante 2 a 3 años en sus respectivas semillas huésped de leguminosas. Se sabe que el TMV en la semilla de tomate está activo durante 9 años (Broadbent, 1965 ; Subramanya, 2013). En la semilla de papa verdadera, el viroide del tubérculo de la papa *Potato spindle tuber viroid* sobrevive durante 21 años (Singh *et al.*, 1991).

Uso de Biopesticidas Para Controlar Virus Fitopatógenos

Efectividad biológica de extractos vegetales

Desde siglos atrás el uso de extractos vegetales para el control de plagas agrícolas era una práctica ancestral, ampliamente utilizada en diversas culturas y regiones del planeta hasta la aparición de los plaguicidas sintéticos. En los últimos años, en la búsqueda de un equilibrio entre el ambiente, la producción y el hombre, se ha desarrollado un nuevo concepto de protección de cultivos mediante productos en cuyo diseño se considera: acción específica sobre el objetivo, impacto nulo o bajo en organismos circundantes, el ambiente y el cultivo (Molina, 2001).

En México, en los últimos años se ha dado mayor atención a la investigación de extractos vegetales con alternativas de control químico de enfermedades en las plantas de importancia económica. (Montes *et al.*, 1990) .

Una alternativa que se está explorando tanto para virus ha sido la utilización de extractos de plantas con propiedades inhibitorias en el establecimiento de la infección, sin embargo existen pocos intentos para aplicar estos resultados en campo. (Montes *et al.*, 1995).

Renuka *et al.*, (2004) demostraron que los extractos de *Mirabilis jalapa* y de *Harpulia cupanioides* fueron eficaces en inhibir de un 60 a 80% el virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) en tomate. Una concentración mínima de 400 µg/ml de Proteína Antiviral de *Mirabilis* (MAP) es suficiente para inhibir a TSWV en tomate. La concentración 800 µg/ml registro la inhibición de lesiones en un 98.41%. Así mismo, Chen *et al.*, (1991) reportaron que los extractos de *Phytolacca americana* inhibe en un 86% la formación de lesiones causadas por TMV, los extractos protegieron a las plantas contra siete virus, cinco virus de RNA: *Tabacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV) y *Potato virus X* (PVX) en plantas de *Chenopodium amaranticolor*, *Potato virus Y* (PVY) en plantas de *Gomphrena globosa*; y dos

virus de DNA: *African cassava mosaic virus* (ACMV) en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) en *Brassica campestris*.

Vivanco *et al.*, (1999) mencionan que evaluaron extractos de *Mirabilis jalapa* contra la infección del virus *Potato virus Y*, *Potato virus X*, y el viroide del tubérculo ahusado de la papa (*Potato spindle tuber viroid*) (PSTVd), los extractos se aplicaron en las plantas antes de la inoculación del virus o viroide. La actividad antiviral de estos extractos fue observada contra virus mecánicamente transmitidos pero no contra los virus transmitidos por los áfidos. Esto indica que los extractos se pueden utilizar como tecnología simple para la protección de la cosecha.

Pérez *et al.*, (1995), encontraron que: en tomate los mas bajos % de incidencia y severidad del enchinamiento del tomate se obtuvieron con extractos de diente de león (*Taraxacum officinale*) + Hierba Santa (*Piper auritum*). En Chile fueron los de rabanillo (*Raphanus raphanistrum*) + Hierba Santa + Artemisa (*Ambrosia artemisaefolia*).

Montes *et al.*, (1995) menciona que los extractos de *R. raphanistrum* redujeron la severidad de la virosis chino del tomate en un 48.6 %, con un rendimiento de 22.9 ton/ha, que casi duplico el rendimiento del testigo con rendimientos de 12.1 ton/ha.

Efectividad biológica del uso de la nanotecnología para la prevención y control de microorganismos patógenos.

La nanotecnología (NT) es definida como la ciencia que estudia la manipulación de la materia a escalas nanométricas, con tamaños de 1-100 nm, en al menos una de sus dimensiones, y son denominados nanopartículas (Wang *et al.*, 2011). Esta escala de medida es el resultado de dividir 1 milímetro un millón de veces, es decir, a nivel molecular. Su estudio se centra en el comportamiento y la manipulación de los átomos, de las moléculas y de las macromoléculas que

manifiestan diferentes propiedades a la de los materiales de mayores dimensiones (Auffan *et al.*, 2009). Actualmente el advenimiento de la nanotecnología aplicada a la agricultura, ha generado resultados que indican un potencial significativo en la protección fitosanitaria de cultivos agrícolas (Lira *et al.*, 2018) la nutrición y el manejo de las prácticas agrícolas debido a su pequeño tamaño, alta relación superficie-volumen y propiedades ópticas únicas (Ghormade *et al.*, 2011).

En la agricultura, su estudio ha tomado varias vertientes dentro de las cuales se encuentra; mejorar la asimilación de nutrientes esenciales por las plantas e incluso la construcción de nano biosensores importantes en determinados procesos biológicos. Así como, el efecto potencial biosida como alternativa para la prevención de microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos) (Rai y Ingle, 2012). Su uso puede incrementar la eficacia de los pesticidas e insecticidas comerciales reduciendo su cantidad de aplicación al suelo a unas dosis significativamente menores requeridas para los cultivos con la mejora medioambiental que eso implica.

El futuro de la industria agrícola puede pasar por usar estos materiales como nano pesticidas, nano fungicidas y nano herbicidas y algunas empresas ya los están desarrollando (Tortosa, 2012).

La NT puede ofrecer alternativas verdes y ecológicas para el manejo sustentable de enfermedades fitopatogénicas al usar ciertas NPs metálicas, así como microorganismos benéficos que se pueden incorporar a NPs o a matrices zeolíticas, las cuales pueden actuar como portadores de los organismos y NPs para posteriormente ser liberados gradualmente (Alghuthaymi *et al.*, 2015).

El uso de la nanotecnología se ha considerado un enfoque alternativo y eficaz para el control de patógenos vegetales (Prasad *et al.*, 2014), Estudios previos confirmaron que las nanopartículas de metal son efectivas contra patógenos de plantas, insectos y plagas. Al usar ciertas nanopartículas metálicas, por ejemplo, las nanopartículas de cobre tiene excelentes propiedades físicas,

químicas y antibacteriales (Carrillo et al., 2016; Shende *et al.*, 2015), a diferencia de otros metales antimicrobiales presenta un amplio espectro de acción contra hongos y bacterias fitopatógenas (Betancourt *et al.*, 2014; Lira et al., 2015). El factor responsable de las propiedades antimicrobiales del cobre es la habilidad que tiene para aceptar o donar electrones, ya que tiene un nivel alto de oxidación catalítica y una reducción potencial alta. Cuando el Cu está en un estado de oxidación, es altamente efectivo como antimicrobial debido a la interacción con ácidos nucleicos, sitios activos enzimáticos y componentes de la membrana en células que causan la enfermedad (Cioffi *et al.*, 2005). Por lo tanto, las nanopartículas se pueden usar en la preparación de nuevas formulaciones como fungicidas, insecticidas y repelentes de insectos (Barik et al., 2008; Gajbhiye *et al.*, 2009; Goswami et al., 2010; Owolade et al., 2008).

Ha sido reportado, que la aplicación de dióxido de titanio (TiO₂) en cultivos, promueve el crecimiento de las plantas, aumenta la tasa de fotosíntesis, reduce la gravedad de la enfermedad y aumenta el rendimiento en un 30% (Chao *et al.*, 2005). Bowen *et al.*, (1992) demostraron que una combinación de dióxido de titanio, aluminio y sílice fue eficaz para controlar el mildiú veloso y polvoriento de las uvas a través de un mecanismo que puede involucrar una acción directa sobre las hifas, la interferencia con el reconocimiento de la superficie de la planta y la estimulación de las defensas fisiológicas de la planta.

El trabajo realizado por Sarlak *et al.*, (2014) demostró que al mezclar ácido cítrico con NTC multiparedes se tuvo mejor control del hongo *Alternaria alternata*, en comparación con el efecto de fungicidas sintéticos comerciales como el Zineb y Mancozeb, los cuales son fungicidas de amplio uso en la agricultura tradicional. Esto sugiere que los NTC pueden ser empleados como fungicidas en la agricultura moderna de la “Nueva Revolución Verde”, pero aplicándolos en muy bajas dosis, lo cual reduciría los costos y el impacto negativo a los agroecosistemas.

Tipos de Nanopartículas

Los nanomateriales pueden tener diferentes tamaños, formas, naturaleza química y diferente procedencia. Los nanomateriales pueden ser de naturaleza orgánica o inorgánica (Cornejo, 2015) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Clasificación de nanopartículas por su naturaleza química.

Orgánicos	Inorgánicos
Fullerenos	Quantum dots (puntos cuánticos), nanocritales
Grafeno	Nanocables (nano wires)
Nanotubos de carbón	Nanovarillas (nano rods)
Coloides orgánicos	Nanotubos inorgánicos
Nano partículas poliméricas	Nanofibras
Negro de humo (carbón black)	Coloides silíceos, aluminosos
Lípidos	Nanoagrupación (nano cluster) d=0,1- 10 nm.
Nano partículas: lípidos, proteínas, ADN.	Nano partículas de oro, plata, platino, cobre, aluminio.
Nanofibras poliméricas	Nano partículas de óxidos metálicos: Al ₂ O ₃ , Cu ₂ O, TiO ₂ , SiO ₂ , ZrO ₂ , Fe ₂ O ₄ , Fe ₂ O ₃ , ZnO..
Nanocristales de celulosa (CNC ₅)	Nanoarcillas: metacaolín
	Nanosílice; d=10-50 nm
	Nano partículas de aluminio
	Nano nitruros y carburos de silicio, titanio, circonio.

Casos de protección vegetal, nanopartícula 360°Agrocker®

360°Agrocker® es una nano-bio-molécula única en el mundo, desarrollada en México por la empresa Corporativo Ferloguer, S.A De C.V.. Es una nanopartícula como alternativa para la prevención de microorganismos patógenos (virus, bacterias, hongos). La Nanopartícula 360°Agrocker consiste de un activo nanoparticulado de un complejo de aceites vegetales funcionalizados en estructuras de óxidos metálicos a escala nanométrica entre 0 y 100 nm, con una concentración de 4500 ppm del activo- L⁻¹. Funciona como un catalizador bioselectivo programado para inhibir la replicación, transcripción y traducción de material genético (ADN o ARN) de patógenos (Arteaga *et al.*, 2016).

Dada las características de formulación del producto 360°Agrocker (nanotecnología), no existen referencias publicadas para comparar resultados, sin embargo, el producto 360°Agrocker, ha generado resultados prometedores para controlar la roya del café (*Hemileia vastatrix*) cuando se asperjó foliarmente a una dosis de 1.0 y 1.25 L Ha⁻¹, reduciendo el daño en 82 y 83 % respectivamente, en plantas de cafeto *Coffea arabica* L., var Garnica (Manuel, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Características Generales de la investigación

Ubicación del experimento

El estudio se desarrolló en dos etapas; la primera etapa se realizó en los laboratorios del Centro de Capacitación y Desarrollo en Tecnologías de Semillas (CCDTS) y la segunda etapa en invernaderos del Departamento de Fitomejoramiento en la sede de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), municipio de Saltillo, Coahuila, México., km 7 carretera 54, la cual se localiza entre las coordenadas geográficas 25° 22" de latitud norte y 101° 02" longitud oeste y a una altitud de 1742 msnm.

Materiales Biológicos

Material genético

Se utilizaron dos genotipos de tomate tipo Beff, de hábito de crecimiento semi-indeterminado: VILLA NARRO® y SofiMely®. Dichos materiales son de reciente registro en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (Sánchez, 2018a, 2018b) y en proceso de incremento de semillas para su posterior comercialización. Los genotipos fueron generados en el programa de Mejoramiento Genético de Hortalizas de la UAAAN por el del M.C. Alfredo Sánchez López.

Nanopartícula

Se utilizó el producto sintético 360°Agrocker, desarrollado por la empresa Coporativo Ferloguer S.A De C.V., el cual es un producto nanoparticulado, con partículas que están en el rango de 0 a 100 nm de tamaño, integrado por activos de complejos de aceites vegetales funcionalizados en estructuras de óxidos metálicos, con una concentración de 4500 ppm del activo L⁻¹.

Virus

Se utilizó una cepa del virus *Tobacco mosaic virus*: (TMV). La fuente del inóculo fueron muestras de hojas de *Chenopodium* spp infectadas con TMV (Figura 23) caracterizado y proporcionado por del laboratorio de Virología del Depto. de Parasitología de la Universidad Autónoma de Chapingo (UACH).



Figura 23. Síntomas de TMV en hojas de *Chenopodium* spp.

Esta investigación se realizó mediante los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar el estado fitosanitario de la semilla de dos genotipos de tomate a utilizarse en la investigación.
2. Determinar la respuesta de plantas inoculadas con TMV, en dos etapas fenológicas a la aplicación del producto nanoparticulado 360°Agrocker.
3. Determinar el potencial de transmisión del TMV de planta a semilla y de semilla a planta.

Determinar el estado fitosanitario de la semilla de dos genotipos de tomate a utilizarse en la investigación.

Detección de hongos

Las pruebas microbiológicas para detectar hongos y bacterias fitopatógenos se realizaron sembrando 3 repeticiones de 10 semillas previamente desinfectadas

con Hipoclorito de sodio al 1 %, en cajas de Petri (Figura 24) con dos medios generales de cultivo, papa-dextrosa-agar (PDA) y malta sal agar (MSA). Se observaron individualmente cada semilla contabilizando colonias de hongos y bacterias. La identificación de los géneros de hongos se realizó mediante la observación de las características de las estructuras reproductivas y el uso de claves taxonómicas especializadas (Barnett y Hunter, 1998; Warham *et al.*, 1994).

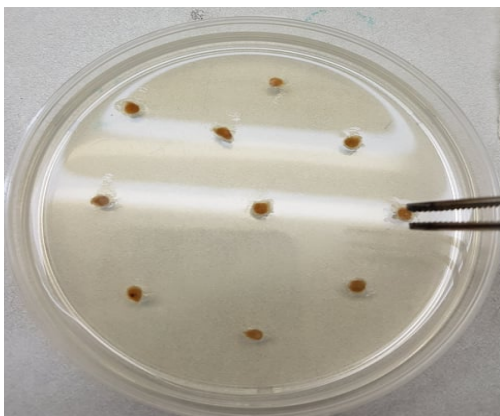


Figura 24. Siembra de semillas de tomate en cajas de Petri

Detección de bacterias

Para la identificación de bacterias se realizaron aislamientos de la semilla, sub-cultivándolos en dos medios semi-selectivos: CNS y Levadura-Dextrosa-Calcio (YDC) (Saettle *et al.*, 1989). Adicionalmente, se aplicó la tinción de Gram, prueba de Ryu y una prueba de patogenicidad en plantas de tomate variedad Rio Grande (Figura 25).

Detección de virus

En cuanto a los virus, se realizó la prueba serológica ENZYME-LINKED-IMMUNO-SORBENT-ASSAY (ELISA), utilizando el pathoscreen TMV de AGDIA®, siguiendo los protocolos de dicho proveedor. Se utilizaron 30 semillas por genotipo, las cuales se molieron en un buffer de fosfatos (Hull, 2002) y se dispusieron en los pocillos correspondientes de la placa, procesándose la

prueba de ELISA junto con otros bioensayos de acuerdo con los protocolos del proveedor (AGDIA®). Se obtuvieron lecturas de la placa en un lector de placas marca Biotek® modelo Elx808. Considerándose positiva una muestra cuando se obtiene una absorbancia tres veces la media de las absorbancias obtenidas con los controles negativos (Salomone y Roggero, 2002; De Blas, 1992). Esta prueba detecta diversos virus del grupo de Tobamovirus que incluyen: *Tobacco mosaic virus TMV*-cepa común, *Tomato mosaic virus (ToMV)* y *Sunn hemp mosaic virus (SHMV)*.



Figura 25. Pruebas de patogenicidad de cepas bacterianas fitopatógenas. Utilizando una jeringa e inyectando por el envés del foliolo de la hoja de tomate.

Análisis estadístico

Laboratorio

Para la fase de laboratorio en semilla, se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, en el cual el factor A= Fitopatógenos detectados (hongos), B= Genotipos, C= Medios de cultivos.

Modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_k + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\tau\beta\gamma)_{ijk} + E_{ijkl}$$

Donde:

$i = 1, \dots, a; \quad j = 1, \dots, b; \quad k = 1, \dots, c; \quad l = 1, \dots, nn$

Y_{ijkl} = número de tratamientos en la $ijkl$ -ésima unidad experimental.

μ = Efecto de la media general del experimento.

τ_i = Efecto verdadero de los i -ésimos géneros de hongos (A).

β_j = Efecto verdadero de los j -ésimos genotipos (B).

γ_k = Efecto verdadero del k -ésimo medios de cultivo (C).

$(\tau\beta)_{ij}$ = Efecto verdadero de la interacción de los i -ésimos géneros de hongos j -ésimos genotipos (AB).

$(\tau\gamma)_{ik}$ = Efecto verdadero de la interacción de los i -ésimos géneros de hongos con el k -ésimo medios de cultivo (AC).

$(\beta\gamma)_{jk}$ = Efecto verdadero de la interacción de los j -ésimos genotipos con el k -ésimo medios de cultivo (BC).

$(\tau\beta\gamma)_{ijk}$ = Efecto verdadero de la interacción de los i -ésimos géneros de hongos con los j -ésimos genotipos y el k -ésimo medios de cultivo (ABC).

E_{ijkl} = Error experimental en la $ijkl$ -ésima unidad experimental.

Se realizaron pruebas de comparaciones de medias con la Prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Para la realización del Análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS 9.1., 2004).

Determinar la respuesta de plantas inoculadas con TMV, en dos etapas fenológicas a la aplicación del producto nanoparticulado 360° Agrocker.

Bioensayos de Inoculación

Se realizaron bioensayos *in vivo* de inoculación de TMV en plantas de tomate variedad Rio Grande, para incrementar el inóculo y estandarizar una técnica de inoculación para el proyecto de investigación. Se utilizaron dos fuentes de inóculo de TMV:

1. En la primera inoculación la fuente del inóculo fueron muestras de semilla (Figura 26) que habían sido positivas a TMV con las tiras inmunológicas. Se inocularon 12 plantas de las cuales en ninguna se transmitió el virus.
2. En la segunda inoculación la fuente del inóculo fueron muestras de hojas de *Chenopodium* spp. Procedente del laboratorio de Virología del Depto. de Parasitología de la UACH (Figura 23). Previamente, se realizó una prueba con tiras inmunológicas para corroborar que fuera TMV, lo cual resultó positivo al virus. Figura 27.



Figura 26. Molienda de semilla de tomate en buffer fosfatado para inoculación.



Figura 27. Prueba con tiras inmunológicas donde se observa la presencia de dos líneas rojas, una de control y la otra indica positivo a TMV.

La inoculación se realizó a una temperatura que fluctuó de los 27 – 32°C. Se llevaron a cabo 3 técnicas de inoculación: Se maceraron hojas infectadas con TMV en una solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M, PH 8.0 (Hull, 2002), para obtener la savia infectada con TMV y se mantuvo a 2°C durante la inoculación.

Las técnicas de inoculación fueron las siguientes:

1. Solución buffer sin celite. Se espolvoreo el abrasivo Celite en los foliolos de la planta (Figura 28A) y se frotó con un hisopo embebido de savia infectada con TMV y posteriormente se enjuagaron con la misma solución fosfatada, esperando seis días hasta observar síntomas virales.
2. Solución buffer con celite. Se colocó el celite en la savia infectada con TMV (Figura 28B) y posteriormente se frotaron con un hisopo los foliolos de la planta y se enjuagaron con la misma solución fosfatada.
3. Inyección con aguja fina. Se inyectó savia infectada con TMV en el tallo de la planta, utilizando aguja fina (Figura 28C).

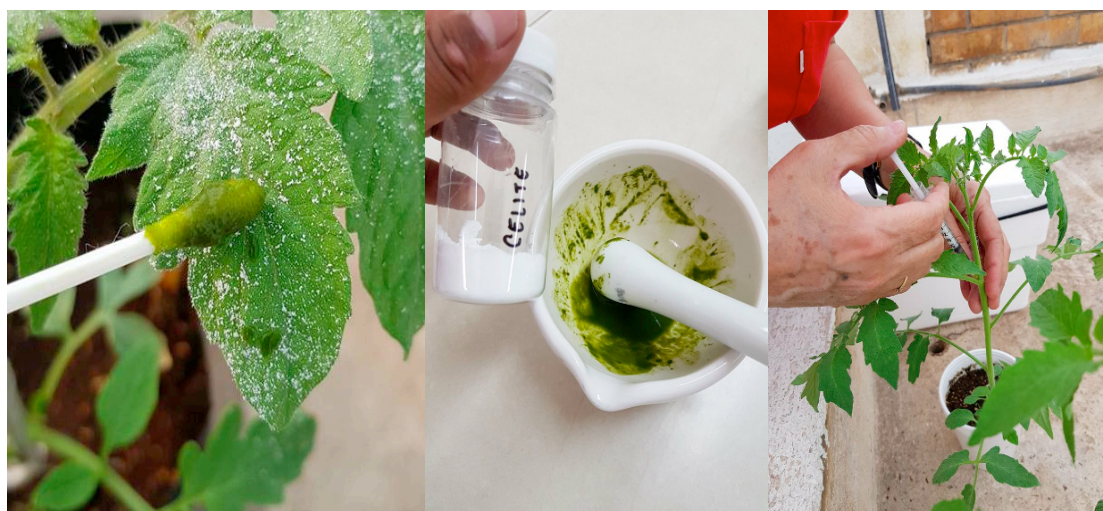


Figura 28. Métodos de inoculación de TMV. **A)** Celite espolvoreado en el foliolo de la hoja. **B)** El celite se colocó en la savia infectada. **C)** Inyección de la savia infectada con aguja fina.

La técnica de inoculación espolvoreando celite en los foliolos, fue la que presentó mayor porcentaje de transmisión de virus a la planta. Cuadro 4.

Cuadro 4. Técnicas de inoculación y porcentaje de infección.

Técnicas	Número de plantas inoculadas	Número de plantas infectadas	% de plantas infectadas
1	14	13	92 %
2	14	10	71 %
3	14	11	78.5%
Total	42	34	81 %

Detección del *Tobacco mosaic virus* en plantas y en semilla de tomate.

La detección y cuantificación del *Tobacco mosaic virus* (TMV) se realizó por el *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) Clarck *et al.*, (1997); en la cuantificación de TMV se ocupó el Kit Phathoscreen TMV, AGDIA®, que es un ensayo directo ligado a enzimas competitivas de inmunoabsorción el cual determina en forma cuantitativa niveles para la presencia de virus en planta y semillas.

Para la determinación de virus se incluyeron varios pasos, los cuales fueron la preparación de la muestra, detección y cuantificación.

a) Preparación de la muestra

1. Se tomaron muestras vegetales de la parte meristemática aérea de las plantas y se colocaron en una bolsa de ziploc y guardadas en el refrigerador a 5 °C.

2. Para realizar la extracción del virus, se utilizó un buffer de fosfatos (Hull, 2002). El buffer se utiliza a una relación 1:10 (peso del tejido en g: volumen de buffer en ml).

b) Detección y cuantificación.

1. Preparar las muestras. Se maceraron 0.5 g de tejido aplicando 5 ml de buffer fosfatado. Con ayuda de una micropipeta, se agregó 100 μ l de cada muestra dentro del pocillo correspondiente en la placa de ELISA.
2. Incubar la placa. Se colocó la placa dentro de una caja húmeda y se dejó incubando toda la noche en el refrigerador (4°C).
3. Preparar el conjugado enzimático. Para estimar el volumen necesario, se preparó 1ml por cada 8 pocillos utilizados.
4. Lavar la placa. Cuando se completa la incubación de la muestra, se lava la placa con un buffer 1X PBST.
5. Añadir el conjugado enzimático. Se dispensó 100 μ l del preparado enzimático por pocillo.
6. Incubar la placa. Incubar la placa dentro de una caja húmeda por 2 horas a temperatura ambiente.
7. Preparar solución PNP. Cada tableta PNP hará 5 ml de solución PNP, a una concentración de 1 mg/ml, suficiente para preparar 5 tiras de 8 pocillos.
8. Lavar el plato. Lavar el plato 8 veces con buffer 1X PBST.
9. Añadir el sustrato PNP. Se añadió un tampón de sustrato de dietanolamina con una fosfatasa alcalina soluble *p*-nitrofenol. Se dispensó 100 μ l de sustrato PNP dentro de cada pocillo.
10. Incubar la placa. Incubar la placa dentro de una caja húmeda por 20 minutos, para hacer visible la reacción al tornarse la solución transparente contenida en cada pocillo, en color amarillo.

11. Evaluar resultados. Se leyó la placa con un lector de placas marca Biotek® modelo Elx808 utilizando una longitud de onda de 450 nm. Se registraron los valores de densidades ópticas leídos para cada pocillo. Considerándose positiva una muestra cuando se obtiene una absorbancia tres veces la media de las absorbancias obtenidas con los controles negativos (Salomone y Roggero, 2002; De Blas, 1992).

Establecimiento del experimento

Se sembraron dos variedades de tomate VILLA NARRO® y SofiMely®, en charolas de 200 cavidades usando sustrato peat moss y perlita a una relación de 3:1; Se incubaron en una cámara de germinación a 25°C por 4 días, posteriormente se trasladaron al invernadero para el desarrollo de la plántula y se cubrieron con una malla antiáfidos. A los 30 días después de la siembra se trasplantó en macetas de polietileno con capacidad de 4 kg, se utilizó lombricomposta, peat moss y vermiculita a una relación de 6:1:1.

Las macetas se colocaron en mesas dentro del invernadero. Cada mesa se cubrió con malla antiáfidos para evitar la entrada de vectores que pudieran transmitir el virus a otras plantas (Figura 29).



Figura 29. Mesas cubierta con malla antiáfidos.

Se inocularon en dos etapas fenológicas con la primera técnica descrita anteriormente (Figura 28A; Cuadro 4). La primera inoculación se realizó a los 20 después del trasplante (ddt), en etapa fenológica vegetativa en la tercera y cuarta hoja. La segunda a los 40 ddt, en etapa fenológica de antesis en la séptima y octava hoja. La inoculación se realizó a temperaturas que fluctuaron de 25-28 °C.

A los siete días después de la inoculación de TMV en cada etapa fenológica inoculada, se observaron síntomas de virosis en las plantas inoculadas; se realizaron pruebas serológicas de ELISA (técnica explicada anteriormente) para confirmar la infección por TMV. Cuando se confirmó que fuera el virus, se iniciaron aplicaciones de manera foliar de 360°Agrocker, a una dosis recomendada por el fabricante de 3.33 mL·L⁻¹ con la frecuencia de cada 3 y 7 días, utilizando un atomizador de un litro, y se asperjaron individualmente cubriendo completamente la planta. Una vez iniciando aplicaciones foliares del producto nanoparticulado, se tomando cuatro lecturas de ELISA en intervalos de 15 días, para monitorear los niveles del inóculo, cada una por etapa inoculada en todos los tratamientos.

Se tuvieron testigos que sólo se inocularon en etapa fenológica vegetativa y en antesis sin aplicación de nanopartículas, y testigos absolutos, los cuales no se inocularon con TMV, ni aplicación de 360°Agrocker. Se aplicaron cuatro repeticiones por tratamiento (Cuadro 5).

Cuadro 5. Tratamientos para determinar la efectividad biológica de 360°Agrocker® en la mitigación de la patogenésis de TMV en el desarrollo del cultivo de tomate.

Número de Tratamiento	Genotipo	Etapa fenológicas con/sin Inoculación	Frecuencia de aplicación de 360°Agrocker
1	VILLA NARRO®	Sin inoculación	Sin aplicación foliar
2		Etapa Vegetativa	Sin aplicación foliar
3			Cada 3 días
4			Cada 7 días
5		Etapa Antesis	Sin aplicación foliar
6			Cada 3 días
7			Cada 7 días
8	SofiMely®	Sin inoculación	Sin aplicación foliar
9		Etapa Vegetativa	Sin aplicación foliar
10			Cada 3 días
11			Cada 7 días
12		Etapa Antesis	Sin aplicación foliar
13			Cada 3 días
14			Cada 7 días

Manejo del cultivo

Desinfección de instalaciones y herramientas, días previos al establecimiento del experimento, se llevó acabo la desinfección de las camas con hipoclorito de sodio donde se colocarían las macetas y se colocaron las mallas antiáfidos de igual manera en cada mesa de trabajo (Figura 29).

Entutorado

Durante el crecimiento de las plantas, se llevó a cabo el entutorado de las mismas, esta actividad se realizó cuando las plantas alcanzaron una altura de 30 cm, se ató en el tallo de la planta mediante un nudo no corredizo un hilo de rafia tratada contra radiación UV y se enredó alrededor del tallo. Esta actividad de enredar el tallo con la rafia se realizó cada 8 días.

Poda de tallos y hojas

Las variedades utilizadas en la investigación eran de crecimiento indeterminado, por lo cual, se requirió de eliminar los brotes en cada axila de las hojas. En la poda de las hojas, se eliminaron todas aquellas inferiores senescentes, por debajo del último racimo que iba madurando. El corte era al ras del tallo principal, se realizó con tijeras previamente desinfectadas con hipoclorito de sodio al 10% entre planta y planta, para evitar el contagio del TMV entre las mismas. Se determinó el peso fresco y seco de las hojas eliminadas de cada planta para llevar un control de la biomasa final de cada planta.

Las actividades culturales del cultivo y la toma de datos, comenzaba a realizarlas en las plantas libres de TMV, para evitar el contagio del virus, adicionalmente me desinfectaba las manos con hipoclorito de sodio al 10%.

Nutrición

Para satisfacer los requerimientos nutricionales del cultivo, durante el experimento se utilizó la solución nutritiva bajo la fórmula 196 N, 232 P, 174 K y 113 Ca. La solución nutritiva se preparó para 100 litros de agua. Se midieron 500 ml de solución A y 200 ml de solución B más 50 ml de solución amortiguadora de pH.

Solución concentrada A

- Fosfato mono amónico (MAP) – 340 g
- Nitrato de calcio – 2080 g
- Nitrato de potasio – 1100 g

En un recipiente plástico se midieron 6 litros de agua y se disolvieron uno por uno siguiendo el orden anotado, agitándolo constantemente y se completó con 4 litros de agua para obtener 10 litros de solución concentrada A.

Solución concentrada B

- Sulfato de magnesio – 492 g
- Sulfato de cobre – 0.48 g
- Sulfato de manganeso – 2.48 g
- Sulfato de zinc – 1.2 g
- Borax – 6.2 g
- Molibdato de amonio – 0.02 g
- Sulfato de hierro – 50 g

Para la solución concentrada B, se midieron 2 litros de agua y se disolvieron uno por uno siguiendo el orden anotado, agitándolo constantemente y se completó con 2 litros de agua para obtener 4 litros de solución concentrada B.

Control de plagas

Con la finalidad de combatir mosquita blanca y evitar posibles diseminaciones del virus entre las plantas por este insecto, se realizaron aplicaciones de Abamectina, Cipermetrina y Diazinón a razón de 1.5 mL L⁻¹, 1.0 mL L⁻¹ y 2 mL L⁻¹, respectivamente, utilizando un atomizador de un litro.

Control de enfermedades

Manejo de hongos y bacterias exceptuando TMV, se aplicó Clorotalonil y Sulfato de cobre pentahidratado a razón de 1.5 mL^{-1} y 2 gL^{-1} , respectivamente, para controlar enfermedades fungosas como tizones. No se presentaron enfermedades fungosas ni bacterianas.

Variables evaluadas

Altura de planta (**AP**).- Se midió la planta con una cinta métrica desde la base del tallo hasta el meristemo apical de la planta, en cada medición por planta se limpió la cinta métrica con hipoclorito de sodio (NaClO) al 10%.

Número de hojas (**NH**).- Se contabilizó cada hoja por planta.

Peso fresco (**PFP**) y peso seco de planta (**PSP**).- Para determinar el peso fresco, las plantas de cada tratamiento se cortaron en pedazos pequeños y se colocaron junto con el sistema radicular de cada planta en bolsas de papel estraza y se pesaron, posteriormente para determinar el peso seco, las plantas en las bolsas de papel estraza se secaron en una estufa marca SHEL-LAB modelo FX14-2 a 65°C durante 24 hr y después se pesaron, se utilizó una balanza marca AND modelo GF-2000 con precisión 0.01 g.

Monitoreo de niveles de inóculo (**DO**).- Se estimaron porcentajes de diferencia en los niveles de absorbancia de las lecturas de ELISA, usando la formula $[(\text{Valor nuevo} - \text{Valor anterior} / \text{Valor anterior}) \times 100]$.

Peso de fruto (**PF**).- Se pesó cada fruto en una balanza marca AND modelo GF-2000 con precisión 0.01 g.

Diámetro de fruto (**DF**).- Se determinó midiendo la zona ecuatorial del fruto con un vernier marca .

Longitud de fruto (**LF**).- Se determinó midiendo la zona longitudinal del fruto con un vernier marca.

Número de lóculos por fruto (**NL**).- Se cortó de manera ecuatorial el fruto y se contabilizó el número de lóculos que tuvieran un completo desarrollo.

Número de semillas por fruto (**NS**).- Se extrajo las semillas cuando el frutó alcanzó la madurez comercial (color rojo del fruto) y se contabilizaron por fruto.

Rendimiento por planta (**kg planta⁻¹**).- Se estimó pesando los frutos de sólo cinco racimos por planta de cada tratamiento.

Se estimaron porcentajes de mitigación del TMV en las variables AP, NH, PFP y PSP, PF, NL, NS y kg planta⁻¹, tomando como comparación los tratamientos absolutos contra los que se inocularon, usando la fórmula [Valor del tratamiento*100 / Valor del testigo absoluto].

Análisis estadístico

Invernadero

Para la evaluación de los tratamientos en invernadero, se utilizó un análisis univariado de varianza con diseño experimental completamente al azar. Para tratar de dar una explicación a las relaciones entre tratamientos para su clasificación entre grupos relativamente homogéneos con base en algunas similitudes entre ellas, se realizó un análisis de conglomerados (AC) y componentes principales (CP). A los grupos formados (G_n) en el análisis multivariado se realizó un análisis univariado de varianza y una prueba de Tukey ($P \leq 0.05$).

Análisis de varianza

Para la evaluación de las variables evaluadas en los tratamientos se adaptó el diseño completamente al azar con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} = Observación del i -ésimo tratamiento en la j -ésima repetición.

μ = Media general del carácter en estudio.

t_i = Efecto del i -ésimo tratamiento.

ε_{ij} = Efecto del error experimental.

$i = 1, 2, \dots, t$ (tratamientos).

$j = 1, 2, \dots, r$ (repeticiones).

Para verificar la eficiencia del manejo del experimento, se determinó el coeficiente de variación en cada una de las variables consideradas mediante la siguiente fórmula:

$$\text{C. V. (\%)} = \frac{\sqrt{\text{CMEE}}}{\bar{x}} \times 100$$

Donde:

C.V. = Coeficiente de variación.

CMEE = Cuadrado medio del error experimental.

\bar{x} = Media general de tratamientos.

100 = Constante para expresar el C.V. en porcentaje.

Prueba de Medias

Se realizaron pruebas de comparaciones de medias Tukey ($P \leq 0.05$).

Para la realización de los Análisis estadísticos univariados se utilizó el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS 9.1., 2004).

Análisis de Regresión

Adicionalmente se utilizó un análisis de regresión lineal, para realizar estimaciones de altura de planta, número de hojas y cantidad del inóculo viral durante el ciclo del cultivo, utilizando el programa Microsoft Excel 2010.

Dadas dos variables (Y: variable dependiente; X: independiente) se trata de encontrar una función simple (lineal) de X que nos permita aproximar Y mediante: $\hat{Y} = a + bX$

Donde:

a (ordenada en el origen, constante)

b (pendiente de la recta)

A la cantidad $e = Y - \hat{Y}$ se le denomina residuo o error residual.

Análisis Multivariados

Los análisis de conglomerados y componentes principales se utilizaron para analizar los datos obtenidos de las variables vegetativas, de fruto y del último monitoreo de TMV en la prueba ELISA en los 14 tratamientos, para clasificarlos en grupos relativamente homogéneos con base en alguna similitud existente entre ellas.

Análisis de Conglomerados (AC): este análisis básicamente lo que realiza es una implementación del siguiente algoritmo:

1. Examina la matriz de datos original ($n \times p$) conformada por n poblaciones y p variables.
2. Estandariza la matriz de datos originales ($n \times p$) con la siguiente fórmula para transformar los datos a distribución normal con media 0 y varianza 1.

$$Z = \frac{(X - \bar{X})}{\sigma}$$

Donde:

Z = Es la observación transformada a unidades de desviación estándar.

X = Es el valor original a estandarizar.

\bar{X} = Es la media de la variable original.

σ = Es la desviación estándar de la variable original.

3. Estima la distancia euclidiana en base a la matriz de datos estandarizados para el par de poblaciones (i, j) con la siguiente fórmula.

$$E_{ij} = \left[\sum_{k=1}^p (X_{ik} - X_{jk})^2 \right]^{1/2}$$

Donde:

E_{ij} = es la distancia entre la población i y la población j .

x_{ik} = es el valor de la k -ésima variable sobre la i -ésima población.

Lo que da por resultado una matriz de distancias euclidiana en forma de matriz simétrica donde solo se escriben los elementos que están debajo de la diagonal principal.

4. Examina la matriz simétrica de distancias euclidianas y agrupa el par de poblaciones (i, j) que son más similares y las une en un nuevo grupo; utilizando el procedimiento jerárquico, donde una población colocada en un grupo no puede ser agrupada en un paso posterior.
5. Forma una nueva matriz simétrica de distancias euclidiana para reflejar la supresión del par de poblaciones, i y j , que fueron unidas, enlazando la nueva población correspondiente al nuevo grupo, hasta que las n poblaciones estén en un solo grupo, finalmente se obtiene el dendograma.

El Análisis de Componentes Principales (CP): utiliza una matriz X de orden $n \times p$, de np observaciones correspondientes a los valores de p variables de cada una de n unidades de estudio (poblaciones) y consiste en transformar un conjunto de variables x_1, x_2, \dots, x_p a un nuevo conjunto y_1, y_2, \dots, y_p . Estas nuevas variables deben tener las siguientes propiedades (Johnson, 2000):

Son una combinación lineal de las x 's, por ejemplo, para el primer componente.

$$Y_1 = a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \dots + a_{1p}x_p = a_1'x.$$

Donde $x = [x_1, x_2, \dots, x_p]$ es el vector de valores muestrales de las variables originales, y a_{ij} es el valor del j -ésimo elemento del vector característico a_1 asociado al valor característico más grande λ_1 .

En forma matricial para todos los componentes, $Y=XA$, en donde Y es la matriz de orden $n \times p$ de componentes principales; A es una matriz de orden $p \times p$ de vectores característicos y X es la matriz de orden $n \times p$ de observaciones.

La suma de cuadrados de los coeficientes a_{ij} para cada i ($j=1, 2, \dots, p$) es la unidad.

De todas las posibles combinaciones, Y_1 tiene la máxima varianza: $\text{Var}(Y_1) > \text{Var}(Y_2) > \dots > \text{Var}(Y_p)$.

Las Y no están relacionadas.

Para la realización de los análisis multivariados se utilizó el paquete estadístico Minitab 16 (2009).

Determinar el potencial de transmisión del TMV de planta a semilla y de semilla a planta.

Para determinar la transmisión de TMV por semilla, primero se cosecharon los frutos en su madurez comercial, es decir cuando el fruto alcanzó una tonalidad rojiza, una pulpa gelatinosa y una consistencia firme; se tomaron los datos correspondientes a los frutos, mencionados anteriormente y se realizó la extracción de semilla. Las variables analizadas para este objetivo fueron:

- Determinar la presencia de TMV en la semilla.
- Evaluar la transmisión de TMV de semilla a plántula.

Extracción de semilla

1. Se cortó de manera transversal el fruto y se extrajo la semilla junto con el mesocarpio y el tejido placentar que es donde se encuentran las semillas (mucílago gelatinoso) con la ayuda de una cuchara y se colocó en una bolsa de polietileno (Figura 30).



Figura 30. Extracción de semillas por cada fruto de tomate.

2. Fermentación. Se trasladaron las bolsas con semillas al invernadero y se dejaron fermentar por 48 horas (Figura 31).
3. Lavado y secado de semilla. Después de 48 horas, apareció una capa blanca sobre el líquido de las bolsas donde se encontraban las semillas, que nos indicó que el tejido placentario (mucilago gelatinoso) que recubre las semillas se había disuelto.



4. En un recipiente, se vació el líquido con semillas y se enjuagó con agua esterilizada, las semillas se iban al fondo mientras los restos quedaban flotando, y se tiró el agua cuidadosamente. Se repitió la misma operación hasta que solo quedaron semillas limpias en el fondo. Posteriormente se

depositaron las semillas en toallas de papel previamente esterilizadas y se dejaron secar a temperatura ambiente dentro del laboratorio (Figura 32).



Figura 32. Secado de semillas de cada fruto en toallitas de papel esterilizado.

5. Se contaron las semillas por fruto y se colocaron en bolsas de ziploc y se almacenaron a 4°C.

Evaluar la detección de TMV en semilla

Se realizó una prueba serológica ELISA para detectar TMV en la semilla, utilizando 60 semillas por tratamiento. Se desinfectó la semilla con hipoclorito de sodio al 10 % (Figura 33).



Figura 33. Desinfección de TMV en semilla de tomate

La prueba de ELISA se realizó bajo los protocolos establecidos por el proveedor ADGIA®, descrito anteriormente en el procedimiento del segundo objetivo.

Se determinaron porcentajes de cantidad viral TMV en semilla, aplicando la formula [DO obtenida – DO del control negativo / DO obtenida].

Evaluar la transmisión de TMV de semilla a plántula de tomate

Se sembraron 30 semillas por cada tratamiento en charolas de 200 cavidades, usando sustrato peat moss y perlita a una relación de 3:1. Las charolas se incubaron en una cámara de germinación a 25°C por 4 días, cuando las semillas comenzaron a germinar, se colocó una semilla germinada en vasos con sustrato peat moss y perlita a relacion de 3:1, con un total de 20 semillas germinadas por tratamiento (Figura 34).



Figura 34. Trasplante de semillas germinadas de tomate a vasos.

Los vasos con las semillas germinadas se trasladaron al invernadero para el desarrollo de la plántula y se cubrieron con una malla antiáfidos, para evitar la contaminación por insectos e igualar las condiciones ambientales donde se desarrollaron las plantas de las cuales se obtuvieron las semillas (Figura 35).



Figura 35. Evaluación de transmisión de TMV de semilla a plántula. A la izquierda se observa la emergencia de los cotiledones de semilla de tomate, al centro la distribución de los tratamientos en la mesa cubierta con malla antiáfidos dentro del invernadero y a la derecha plántula de tomate después de 20 días de siembra.

La detección de TMV, se analizó mediante la observación los síntomas del virus (Jones *et al.*, 2014) en cada plántula. Las plántulas sintomáticas con TMV se recolectaron en bolsas de ziploc, realizando una mezcla de tejido con 3 repeticiones y se realizaron pruebas serológicas de ELISA descrita anteriormente, para corroborar que los síntomas desarrollados en las plántulas pertenecieran al virus TMV. Y se reportó en porcentaje.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinar el Estado Fitosanitario de la Semilla

Detección de hongos fitopatógenos

Se presentó diferencia significativa para el Factor C (género de hongos detectados), en los Factores A (genotipos) y B (medios de cultivos) no se presentaron diferencia significativa (Cuadro 6 del anexo).

Estadísticamente no hubo diferencias estadísticas entre los genotipos estudiados, no obstante, el genotipo VILLA NARRO® fue el que presentó mayor porcentaje de incidencia de hongos (6.66 %). Entre los medios de cultivo, no se presentaron diferencias estadísticas, se observó que el medio de cultivo PDA fue el que desarrolló un mayor porcentaje de incidencia (9.33 %) de hongos. En la detección de hongos, si hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$). Se detectaron 5 géneros de hongos, de los cuales el género *Fusarium* spp. y *Alternaria* spp fueron los que presentaron mayor incidencia 15.83 y 7.50 % respectivamente. *Cladosporium* spp presentó la menor incidencia (1.66 %). Como se observa en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Comparación de medias en los diferentes factores para porcentaje de incidencia de hongos fitopatógenos.

Factor A		Factor B		Factor C	
Genotipo	Incidencia (%)	Medio de cultivo	Incidencia (%)	Géneros de Hongos	Incidencia (%)
VILLA NARRO®	6.66 a	PDA	9.33 a	<i>Fusarium</i>	15.83 a
SofiMely®	6.33 a	MSA	3.66 a	<i>Alternaria</i>	7.50 a
				<i>Penicillium</i>	3.33 b
				<i>Aspergillus</i>	4.16 b
				<i>Cladosporium</i>	1.66 b
Tukey 0.05	6.39		6.39		10.1

PDA=Agar papa dextrosa; MSA= Agar manitol salado.

El comportamiento de la incidencia de géneros de hongos para la interacción de genotipos y medios de cultivo se observa en el Cuadro 8. El género *Fusarium* spp en ambos genotipos se observó con mayor porcentaje de incidencia en el medio de cultivo PDA, siendo SofiMely® el que presentó mayor incidencia de este género (43.33%). El género *Alternaria* spp se presentó con mayor incidencia (16.6%) en el genotipo VILLA NARRO® y en el medio de cultivo PDA. Ambos géneros de hongos necesitan mayores contenidos de humedad para su desarrollo, por lo que el medio de cultivo PDA favoreció ese ambiente y permitió la proliferación de estos patógenos.

En el medio de cultivo PDA, el género *Penicillium* se presentó con mayor incidencia en el genotipo SofiMely® (6.66%). VILLA NARRO® tuvo la misma incidencia de *Penicillium* (3.33%) en ambos medios de cultivo. El género *Aspergillus* se desarrolló en ambos genotipos en el medio de cultivo MSA con el mismo porcentaje de incidencia (6.66%). En el medio de cultivo PDA se presentó en menor porcentaje *Aspergillus* en el genotipo VILLA NARRO® (3.33%). *Cladosporium* solo se desarrolló en el genotipo VILLA NARRO® en el medio de cultivo PDA, como se muestra en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Incidencia de infección de hongos fitopatógenos en semilla de dos variedades de tomate.

Genotipos	Medio de cultivo	Incidencia de géneros de hongos (%)				
		<i>Fusarium</i>	<i>Alternaria</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Aspergillus</i>	<i>Cladosporium</i>
VILLA NARRO®	PDA	10.00	16.66	3.33	3.33	6.66
	MSA	6.66	10.00	3.33	6.66	0.00
SofiMely®	PDA	43.33	3.33	6.66	0.00	0.00
	MSA	3.33	0.00	0.00	6.66	0.00

PDA=Agar papa dextrosa; MSA= Agar manitol salado.

Es importante la detección de estos géneros de hongos para prevenir los posibles problemas fitopatológicos que se pudieran presentar en estos genotipos.

Detección de bacterias fitopatógenas

La incidencia de bacterias fue baja con respecto a los hongos. De los resultados obtenidos el genotipo VILLA NARRO® presentó colonias de bacterias amarillas en el medio PDA en la proporción de una semilla con respecto al total de 10 y en promedio de las tres repeticiones (Figura 36). El genotipo SofiMely® en el medio de cultivo MSA presentó colonias de bacterias anaranjadas presentándose en la misma proporción (que para las bacterias amarillas) y en el medio PDA se detectaron los dos tipos de colonias de bacterias, pero en menor proporción, como se muestra en la Figura 36.

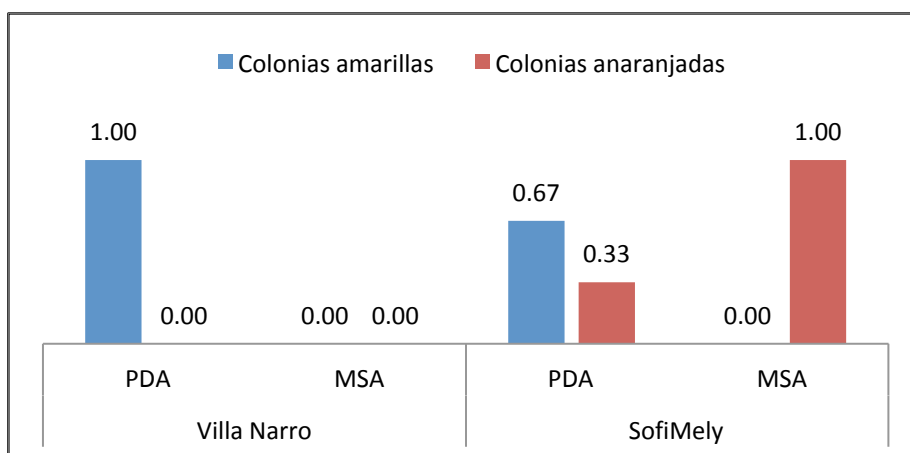


Figura 36. Incidencia de colonias de bacterias en dos genotipos de tomate.

Es importante señalar que el porcentaje de incidencia de bacterias por semilla es bajo, generalmente oscila entre el 0.1 al 5 % (Navarrete *et al.*, 2014; Agrios, 1998); Las bacterias que infestan semillas pueden mantenerse vivas durante un periodo de tiempo limitado, mientras que las bacterias presentes en el interior

de las semillas son extraordinariamente longevas (Navarrete *et al.*, 2014; Saettler *et al.*, 1989).

Se identificaron los géneros *Xanthomonas* spp (cepa amarilla) y *Clavibacter* spp (cepa anaranjada). Figura 37.

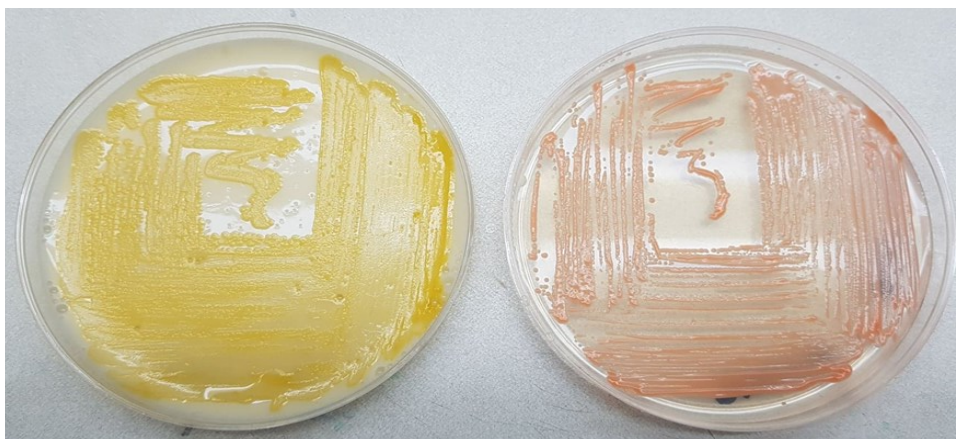


Figura 37. Morfología de colonias de bacterias. A la izquierda medio semi-selectivo YDC- asociándose al género *Xanthomonas* spp. A la derecha medio semi-selectivo CNS- asociándose al género *Clavibacter* spp.

La tinción de Gram fue negativa para la cepa amarilla (Figura 38c), la cual se corroboró con la prueba de Ryu, donde se observó un hilo mucoide (Figura 39). La cepa anaranjada resultó positiva para la tinción de Gram (Figura 38d), corroborándose con la prueba de Ryu al no observarse un hilo mucoide. Por las pruebas realizadas de patogenicidad (Figura 38 a y b) se consideran que son potencialmente los géneros *Clavibacter* spp y *Xanthomona* spp.

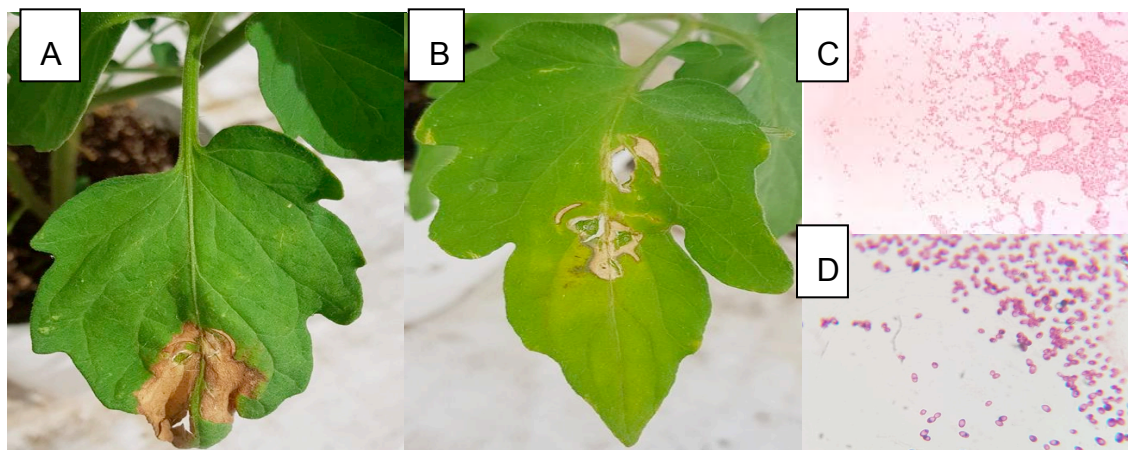


Figura 38. A las 48 horas se presentó una marchitez en el tejido sano del foliolo de la hoja donde se inoculó: A) Cepa amarilla, y (B) Cepa anaranjada. C) Tinción rosada, Gram negativo. Asociándose al género *Xanthomona* spp. D) Tinción violeta, Gram positivo. Asociándose al género *Clavibacter* spp.

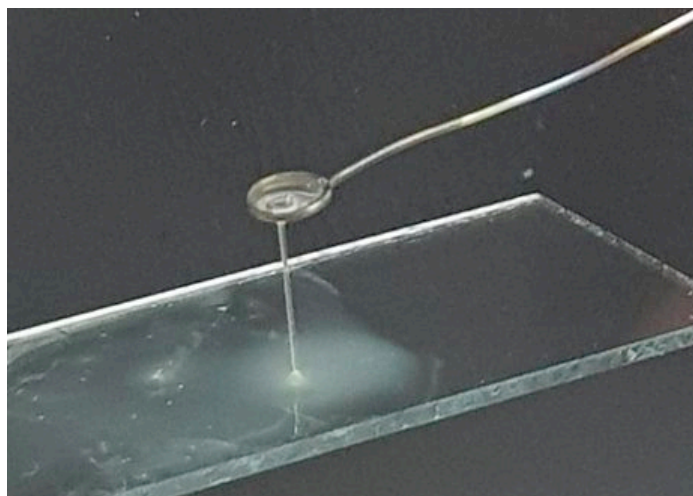


Figura 39. Prueba de Ryu de la cepa amarilla, una Gram negativa por la presencia de un hilo mucoide.

Los géneros detectados pudieran constituir un riesgo potencial de enfermedades en el tomate. El género *Xanthomona* comprende un grupo de

bacterias fitopatógenas de gran importancia económica, ya que tiene como hospedero a 268 especies de dicotiledóneas entre ellos el tomate (Leyns *et al.*, 1984). La mancha bacteriana es una enfermedad asociada a este género, se manifiesta en cualquier etapa fenológica del cultivo (Gitaitis *et al.*, 1992) Jones *et al.* (2014) determinaron que los agentes causales de la enfermedad son cuatro especies del género *Xanthomonas* (*X.*), *X. vesicatoria*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* y *X. gardneri* con cinco razas, T1, T2, T3, T4 y T5. Así mismo, el género *Clavibacter*, actualmente distribuido en todo el mundo (Jones *et al.*, 2014), se considera una de las enfermedades más importantes del cultivo de tomate en invernaderos. Tanto los cultivos de siembra directa como los cultivos de trasplantes pueden verse afectados, lo que resulta en una pérdida de rendimiento de hasta el 100% (Hausbeck *et al.*, 2000).

Detección de virus fitopatógenos

Las absorbancias obtenidas de las muestras del macerado de semillas de los dos genotipos de tomate, mediante el ensayo ELISA (Cuadro 9), para detectar el grupo Tobamovirus (TMV, ToMV y SHMV) resultó negativa.

Cuadro 9. Valores de absorbancia obtenidos de la prueba de ELISA

Genotipos	Absorbancia a 405 nm	Resultado
VILLA NARRO [®]	0.183	-
SofiMely [®]	0.178	-

> 0.178 se considera positivo a TMV; Signo (-) = negativo a TMV

TMV y ToMV son miembros del grupo de Tobamovirus y pueden distinguirse por las diferencias en sus afinidades serológicas y composiciones de proteínas

(Hull, 2002). Aunque el TMV puede infectar el tomate, el ToMV es el virus predominante en todo el mundo en los cultivos de tomate (Brunt, 1986). Se ha demostrado que la infección por ToMV y TMV reduce el rendimiento en tomates frescos para el mercado en un 10-50 % (Ahoonmanesh *et al.*, 1981; Broadbent, 1964 y 1976; Crill *et al.*, 1973; McRitchi y Alexander, 1957).

Prueba de fitosanidad

La prueba de transmisión mostró el 100% de plántulas sanas libres de síntomas asociados con los fitopatógenos detectados (Figura 40).



Figura 40. Germinación de semilla de dos genotipos de tomate, en charola de poliestireno para evaluar la transmisión de fitopatógenos de semilla a plántula de tomate.

Considerando que los patógenos detectados no se transmitieron en la prueba de germinación, la semilla analizada de las variedades SofiMely[®] y VILLA NARRO[®], se consideran potencialmente sanas. Muchos patógenos no causan problema a la semilla ni a las plántulas durante su germinación y emergencia (Gitaitis y Walcott, 2007).

Determinar la respuesta de plantas inoculadas en dos etapas fenológicas con TMV a la aplicación de nanopartículas de TiO₂ y extractos vegetales

Sintomatología de TMV sobre las plantas inoculadas

A los 7 días después de la inoculación, aparecieron mosaicos en los folíolos cercanos a donde se inoculó, como se muestra en la Figura 41A. Posteriormente a los 15 días se mostraron moteados y amarillamiento en las zonas meristemáticas de la planta (Figura 41B y C). Estos síntomas han sido reportados por Braodbent, (1964); Hull, (2002) y Jones *et al.*, (2014).

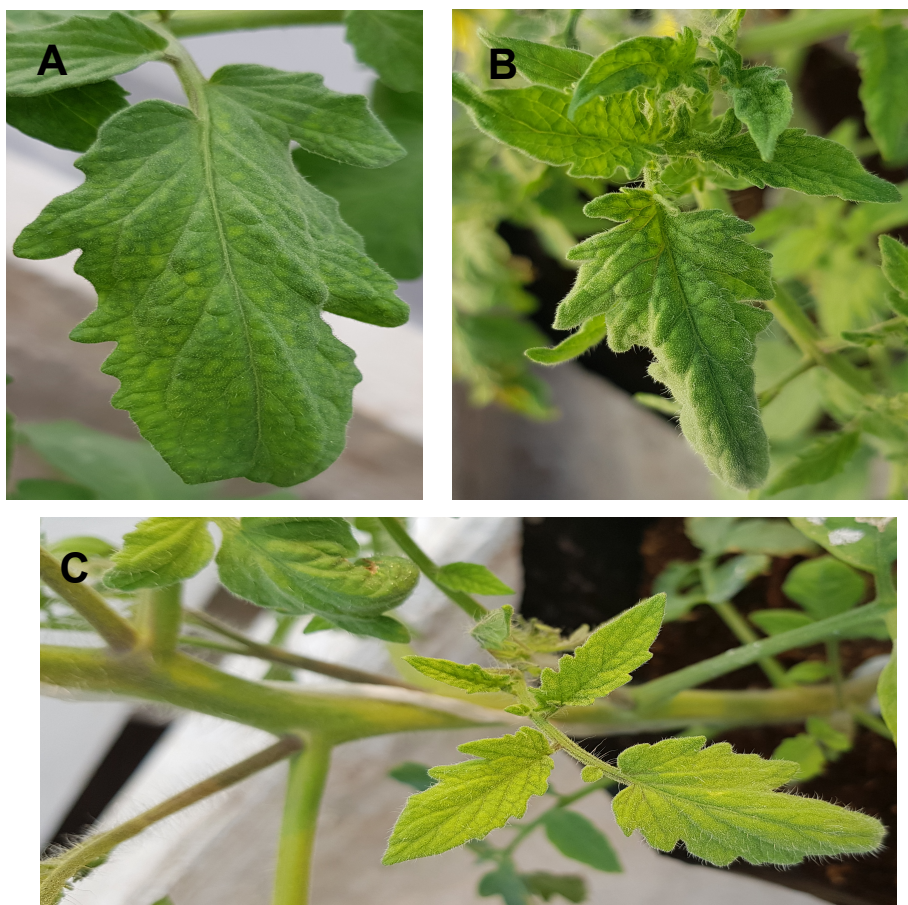


Figura 41. Sintomatología de TMV en tomate. A) Mosaicos en foliolo. B) Moteado y elongación de folíolos de hojas meristemáticas. C) Amarillamiento de hojas.

Uno de los primeros signos de infección viral sistémica por TMV es la eliminación de venas en las hojas más jóvenes y malformaciones; las venas se vuelven amarillas o translúcidas y las hojas producidas posteriormente pueden mostrar un mosaico, moteado o amarillamiento general (Fletcher y MacNeill, 1971; Scholthof, 2004), como se observó en las plantas inoculadas con TMV (Figura 42).



Figura 42. A la izquierda se observa malformación y eliminación de venas en las hojas causado por TMV. A la derecha se observa igual una malformación y desvanecimiento de venas presentando moteado y amarillamiento en las hojas.

Se observó un amarillamiento en las plantas inoculadas con TMV, lo cual se atribuye a la deficiencia de proteínas y ribosomas en las células del cloroplasto, ya que el virus puede representar hasta tres cuartos de la proteína en la hoja y se produce a expensas de proteínas foliares normales (Holden y Tracey, 1948; Bawden y Kassanis, 1950).

Altura de planta

Se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) en la altura de planta entre tratamientos para las 12 fechas evaluadas (Cuadro 10 del

apéndice). Los coeficientes de variación fueron bajos con valores de 5.27 a 13.04 %. La prueba de medias (Tukey 0.05) para altura de planta se presenta en el Cuadro 11a y b.

Cuadro 11a. Comparación de medias para 12 fechas de mediciones de altura de planta en dos genotipos de tomate, tratamientos ordenados por la variable 130ddt.

Tratamiento	20ddt cm	32ddt cm	40ddt cm	49ddt cm	57ddt cm	64ddt cm
T8	22.5 a	46.3 ab	52.8 ab	77.8 a	92.9 a	110.1 a
T1	20.3 ab	43.3 abc	48.5 bc	69.8 ab	83.9 abc	99.3 ab
T10	20.1 ab	38.3 abc	44.5 cd	69.3 ab	82.5 abcde	92.8 bcd
T3	19.1 ab	35.3 bc	44.5 cd	69.0 ab	82.3 abcde	91.0 bcde
T11	18.1 b	33.0 c	41.0 d	68.0 bc	82.8 abcd	94.3 bc
T4	19.4 ab	35.5 abc	45.3 cd	70.3 ab	85.5 ab	96.0 abc
T14	16.8 b	35.0 bc	52.5 ab	69.8 ab	75.5 bcdef	82.3 cdef
T7	16.5 b	38.0 abc	55.5 a	67.5 bc	71.5 defg	77.5 efg
T6	18.8 ab	36.0 abc	52.5 ab	68.8 ab	74.0 cdefg	81.3 cdefg
T13	17.8 b	36.8 abc	50.8 abc	71.0 ab	74.8 bcdef	78.5 defg
T2	18.0 b	34.5 bc	39.8 d	62.5 bc	68.5 fg	75.8 fg
T12	19.5 ab	40.5 abc	49.3 abc	70.8 ab	73.0 cdefg	82.3 cdef
T5	18.9 ab	48.0 a	52.0 ab	69.8 ab	71.3 efg	78.8 defg
T9	19.5 ab	35.5 abc	41.3 d	59.0 c	62.8 g	66.8 g
Tukey 0.05	4.10	12.5	6.33	9.36	11.30	14.84

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Cuadro 11b. Comparación de medias para 12 fechas de mediciones de altura de planta en dos genotipos de tomate, tratamientos ordenados por la variable 130ddt.

Tratamiento	71ddt cm	79ddt cm	85ddt cm	94ddt cm	99ddt cm	130ddt cm
T8	127.3 a	144.6 a	161.8 a	179.0 a	196.2 a	213.5 a
T1	114.6 ab	130.0 a	145.4 a	160.8 b	176.1 b	191.5 b
T10	102.8 bc	105.8 b	119.8 b	125.3 c	132.0 c	167.8 c
T3	97.0 bcdef	99.0 bcd	109.3 bcd	114.8 cd	119.0 cde	158.5 c
T11	99.8 bcde	103.5 bc	110.5 bc	116.3 cd	121.5 cd	157.8 c
T4	100.3 bcd	101.8 bc	105.3 bcde	106.8 de	115.8 cdef	155.5 c
T14	87.3 cdefg	89.0 bcde	96.3 cde	99.5 de	104.3 defg	133.3 d
T7	80.8 fg	82.0 de	88.5 ef	92.8 ef	95.0 gh	132.3 d
T6	85.3 cdefg	86.8 bcde	92.0 cdef	96.5 e	101.8 efg	131.5 d
T13	83.3 defg	87.0 bcde	97.3 cde	108.5 cde	116.3 cde	131.3 d
T2	82.0 efg	86.8 cde	89.8 def	92.8 ef	96.0 gh	121.8 d
T12	87.8 cdefg	90.3 bcde	95.0 cde	98.8 de	101.8 efg	124.5 d
T5	83.0 defg	84.5 cde	91.3 cdef	96.3 e	98.8 fg	125.3 d
T9	70.5 g	71.5 e	73.3 f	76.8 f	79.3 h	120.0 d
Tukey 0.05	18.11	19.11	19.51	18.04	17.37	21.51

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En los resultados de esta prueba se observa que en el primer grupo (a) los testigos absolutos T1 y T8 fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos los cuales no fueron inoculados con TMV y se mantuvieron libres del patógeno. SofiMely® (T8) fue estadísticamente superior presentando la mayor altura de planta 213.5 cm a los 130 ddt.

En contraste, los tratamientos T2, T5, T9 y T12 fueron estadísticamente inferiores en altura de planta, ya que estas plantas fueron inoculadas con TMV en etapa vegetativa (T2 y T9) y en etapa de antesis (T5 y T12) y no fueron tratadas con 360°Agrocker.

El T2 y T9 presentaron los mas bajos valores de altura de planta 121.8 y 120.0 cm, respectivamente, a los 130 ddt, esto indica que al inocular la planta con TMV a temprana edad, afecta significativamente la altura. La reducción La infección de TMV causa una reducción significativa en crecimiento hasta del 50% (Matthews, 1970). Los virus que causan achaparramiento, o cambios en el patrón de crecimiento, sin duda afectan las hormonas de crecimiento (Maramorosch, 1957; Chessin, 1958).

En la Figura 43, se observa la dinámica de crecimiento del genotipo SofiMely® durante su cultivo, el cuál fue estadísticamente superior a VILLA NARRO®. Es notable la diferencia desde los 50 ddt hasta los 130 ddt entre las plantas inoculadas con TMV en etapa vegetativa y tratadas con 360°Agrocker (T10 y T11) con relación a las que se inoculó en la misma etapa fenológica y sin aplicación de 360°Agrocker (T9).

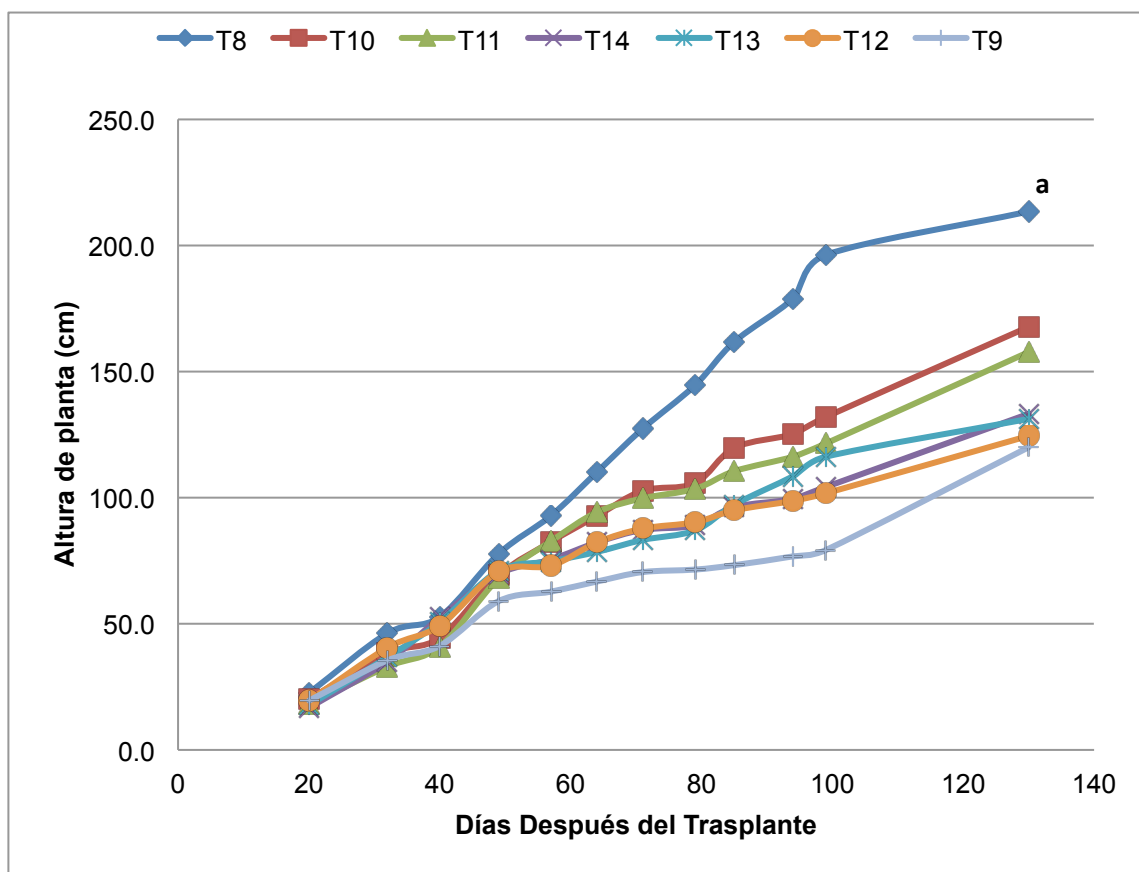


Figura 43. Dinámica de crecimiento del genotipo SofiMely[®] a partir de los 20 hasta los 130 días después del trasplante.

T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

La misma tendencia se observó en el genotipo VILLA NARRO[®] (Figura 44), donde es notable la diferencia a partir de los 50 ddt entre las plantas inoculadas con TMV en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker (T3 y T4) del

tratamiento inoculado en la misma etapa fenológica vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker (T2).

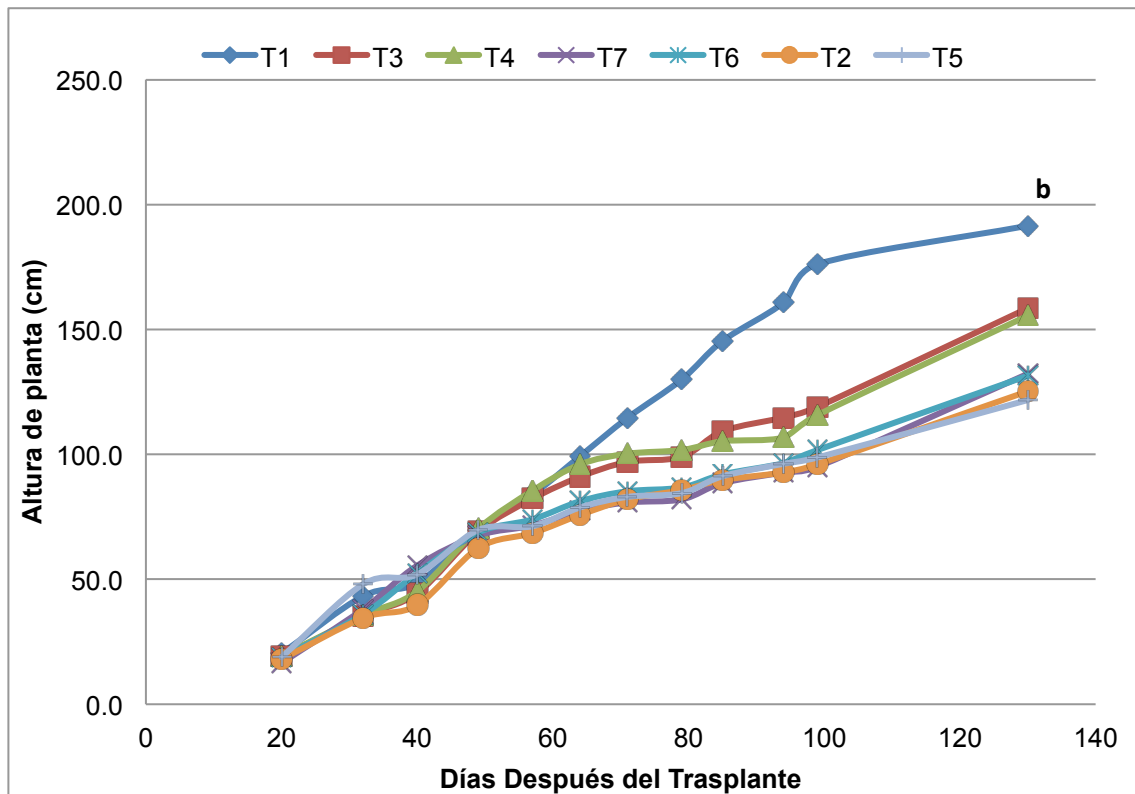


Figura 44. Dinámica de crecimiento del genotipo VILLA NARRO[®] a partir de los 20 hasta los 130 días después del trasplante.

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En ambos genotipos, los tratamientos libres de TMV (T1 y T8) presentaron un desarrollo normal y su altura fue estadísticamente mayor que los tratamientos inoculados con TMV. La altura de VILLA NARRO[®] y SofiMely[®] fue de 191.5 y 213.5 cm respectivamente, datos similares se reportó Cordero (2015), el cual, caracterizó estos genotipos junto con otras líneas avanzadas de tomate y

obtuvo una altura de 195 cm en el genotipo SofiMely® y de 180 cm en VILLA NARRO®.

Para determinar las tendencias de crecimiento en los dos genotipos de tomate, se realizó un análisis de regresión simple (Juárez *et al.*, 2015) y para verificar el ajuste de los mismos, se usó el coeficiente de determinación (R^2). En las ecuaciones de regresión generadas (Cuadro 12) los coeficientes de determinación varían de $R^2 = 0.934$ (T14) a $R^2 = 0.981$ (T5) esto indica que el grado de asociación lineal entre las variables es alto, y concretamente del 93.4 al 98.1% de la variación total de los valores.

El parámetro b_1 (pendiente) indica que se presentó un mayor incremento en altura de planta en los tratamientos T1 ($b_1=1.7437$) y T8 ($b_1=1.9532$) los cuales se mantuvieron libres del virus. En contraste, los tratamientos T9 y T5 registraron la menor tasa de crecimiento $b_1=0.7819$ y $b_1= 0.837$ respectivamente. Con respecto a los tratamientos T3 ($b_1=1.2409$) y T10 ($b_1=1.3641$) a los cuales se aplicó 360°Agrocker cada tres días, el parámetro b_1 presentó una menor reducción en altura de planta. Considerando estos resultados, es posible entonces estimar la altura de la planta de tomate con gran exactitud utilizando las ecuaciones de regresión generadas, ya que el R^2 para todos los casos fue mayor que 0.93.

Fletcher y MacNeill (1971) mencionan que la reacción de la planta de tomate a la infección con TMV depende del cultivar, la cepa del virus y de la etapa fenológica de infección. Este efecto se pudo observar en este estudio, donde la inoculación en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker, presentaron mayores porcentajes de reducción de altura, 36.4% en el genotipo VILLA NARRO® (T2) y 43.8% en el genotipo SofiMely® (T9) (Cuadro 13). Se ha demostrado que la infección por ToMV y TMV reduce la altura en tomates en un 10-50 % (Ahoonmanesh *et al.*, 1981; Broadbent, 1964 y 1976; Crill *et al.*, 1973; McRitchi y Alexander, 1957).

Cuadro 12. Ecuación de regresión, medias de altura de planta final (130 ddt) y coeficiente de determinación de 14 tratamientos en dos genotipos de tomate.

Tratamiento	Ecuación de regresión	Media de AP (130 ddt) cm	R ²
VILLA NARRO®			
T1	Y= 1.7437x - 12.214	191.5 b	0.968
T3	Y= 1.2409x + 1.7569	158.5 c	0.971
T4	Y= 1.1812x + 5.7123	155.5 d	0.942
T7	Y= 0.9102x + 12.616	132.3 e	0.939
T6	Y= 0.9434x + 12.616	131.5 e	0.948
T2	Y= 0.9382x + 8.4287	125.3 e	0.956
T5	Y= 0.8370x + 18.983	121.8 e	0.936
SofiMely®			
T8	Y= 1.9532x - 14.757	213.5 a	0.9679
T10	Y= 1.3641x - 1.4961	167.8 c	0.9816
T11	Y= 1.2756x + 0.0326	157.8 c	0.9614
T13	Y= 1.0225x + 9.5452	131.3 e	0.9538
T14	Y= 0.9855x + 11.092	133.3 e	0.9447
T12	Y= 0.9045x + 15.961	124.5 e	0.9343
T9	Y= 0.7819x + 11.236	120.0 f	0.9344
Tukey 0.05		12.21	

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

La mitigación de la patogénesis del TMV con 360°Agrocker, aplicándolo con una frecuencia de tres días fue superior, lo cual se reflejó en una menor reducción de altura en un 17.2 % en VILLA NARRO® (T3) y en un 21.4 % en SofiMely® (T10) (Cuadro 13), lo que se traduce en una mitigación de la patogénesis de TMV en altura de planta del 82.8 % en VILLA NARRO® y 78.6% para SofiMely®.

Cuadro 13. Reducción de la altura de con respecto a los tratamientos absolutos de ambos genotipos.

VILLA NARRO®			SofiMely®		
Tratamiento	Reducción de altura (%)	Mitigación del TMV (%)	Tratamiento	Reducción de altura (%)	Mitigación del TMV (%)
T1	0%	100§	T8	0	100§
T3	17.2	82.8	T10	21.4	78.6
T4	18.8	81.2	T11	26.1	73.9
T7	30.9	69.1	T14	37.6	62.4
T6	31.3	68.7	T13	38.5	61.5
T5	34.6	65.4	T12	41.7	58.3
T2	36.4	63.6	T9	43.8	56.2

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. § Dado que no fueron inoculadas, se consideró como testigo con una mitigación equivalente de 100 %.

Ramesh *et al.* (2015) estudiaron el efecto de nanopartículas de ZnO y TiO₂ sobre plantas de tomate y observaron que las plantas tratadas con

nanopartículas mostraron un aumento máximo en la altura de la planta del 24.5%. De la misma manera, Owolade *et al.* (2008) y Chen *et al.* (2014), mencionan que las nanopartículas de titanio (Ti) estimulan la producción de más carbohidratos, fomentando el crecimiento y la tasa de fotosíntesis en las plantas. Los resultados de los autores citados concuerdan con los nuestros, dado que observamos que las plantas infectadas con TMV y tratadas con “nanopartículas de extractos vegetales, 360°Agrocker®” mostraron un crecimiento y desarrollo superior a las plantas sin el tratamiento.

Número de Hojas

Para el número de hojas en los 14 tratamientos se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre tratamientos (Cuadro 14 del apéndice) para 8 fechas evaluadas. Los coeficientes de variación fueron bajos con valores entre 3.95 a 6.02 %.

En la comparación de medias para número de hojas (Cuadro 15) se observa la misma tendencia que en altura de planta, en el cual, el primer grupo (a) a los 130 ddt los tratamientos absolutos T1 y T8 fueron estadísticamente superiores al resto de los tratamientos, los cuales no fueron inoculados con TMV y se mantuvieron libres del patógeno, presentando el genotipo SofiMely® el mayor número de hojas 48.5. En el segundo grupo (b) se encuentran los tratamientos que fueron inoculados con TMV en ambos estados fenológicos y con aplicación de 360°Agrocker; notándose que los tratamientos con frecuencias de aplicación cada 3 días T3 y T10 presentaron el mayor número de hojas 40.7 y 41.0 respectivamente.

En ambos genotipos los tratamientos inoculados con TMV en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker, fueron estadísticamente inferiores en número de hojas, presentando 33.7 el genotipo VILLA NARRO® (T2) y 35.5 el genotipo SofiMely® (T5) (Cuadro 15).

Cuadro 15. Comparación de medias para número de hojas en dos genotipos de tomate durante 8 fechas de muestreo.

Trat	57ddt	64ddt	71ddt	79ddt	85ddt	94ddt	99ddt	130ddt
T8	17.0 ab	19.0 ab	20.0 a	25.5 a	28.0 a	32.5 a	36.0 a	48.5 a
T1	16.5 ab	18.0 ab	19.7 a	24.5 ab	27.7 a	31.2 a	34.5 ab	47.5 a
T10	16.7 ab	18.5 ab	19.7 a	22.2 bc	24.2 b	27.0 b	31.7 bc	41.0 b
T3	16.5 ab	18.3 ab	19.8 a	21.5 cd	23.2 bc	25.0 bcd	29.0 cde	40.7 bc
T13	16.0 b	17.3 b	17.7 a	19.20 d	20.7 cdef	24.5 bcd	28.2 de	40.0 bc
T14	16.5 ab	17.5 b	19.7 a	21.7 bcd	22.2 bcd	24.2 bcd	27.2 def	39.7 bc
T6	16.2 ab	18.3 ab	17.7 a	21.2 cd	22.0 bcde	24.7 bcd	27.5 def	39.2 bcd
T11	18.0 a	19.8 a	20.5 a	21.7 bcd	22.0 bcde	26.5 bc	30.0 cd	38.7 bcd
T4	16.5 ab	18.3 ab	19.8 a	21.7 bcd	22.2 bcd	24.2 bcd	27.2 def	37.7 bcde
T7	16.5 ab	17.5 b	18.7 a	20.2 cd	20.7 cdef	23.3 cde	27.0 def	37.7 bcde
T12	16.5 ab	17.8 ab	18.5 a	20.0 cd	20.5 cdef	23.0 de	26.0 efg	36.2 cdef
T9	16.0 b	17.0 b	17.7 a	19.0 d	19.0 f	20.7 e	23.5 g	35.5 def
T5	16.5 ab	17.3 b	18.0 a	19.0 d	19.2 ef	22.7 de	25.7 efg	34.2 ef
T2	15.7 b	17.0 b	17.7 a	19.2 d	20.2 def	22.0 de	24.7 fg	33.7 f
Tukey (0.05)	1.87	2.06	2.89	2.92	2.89	3.29	3.28	3.91

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En la Figura 45 y 46, se observa la dinámica del número de hojas de los genotipos SofiMely® y VILLA NARRO®. Es notable la diferencia en el incremento de hojas en T1 y T8 a los 70 ddt de los tratamientos inoculados con TMV, independientemente de la aplicación de 360°Agrocker.

Los tratamientos con aplicación de 360°Agrocker se diferenciaron de los que no se les aplicó el producto. Se observó que en ambos genotipos la inoculación de TMV en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada tres días (T3 y T10) presentaron mayor número de hojas (40.7 y 41, respectivamente), en contraste con los tratamientos inoculados en la misma etapa fenológica y sin aplicación de 360°Agrocker T2 (33.7 hojas) y T9 (35.5 hojas). Sin embargo, la inoculación en etapa vegetativa en el genotipo VILLA NARRO® (T2), fue estadísticamente inferior presentando el menor número de hojas.

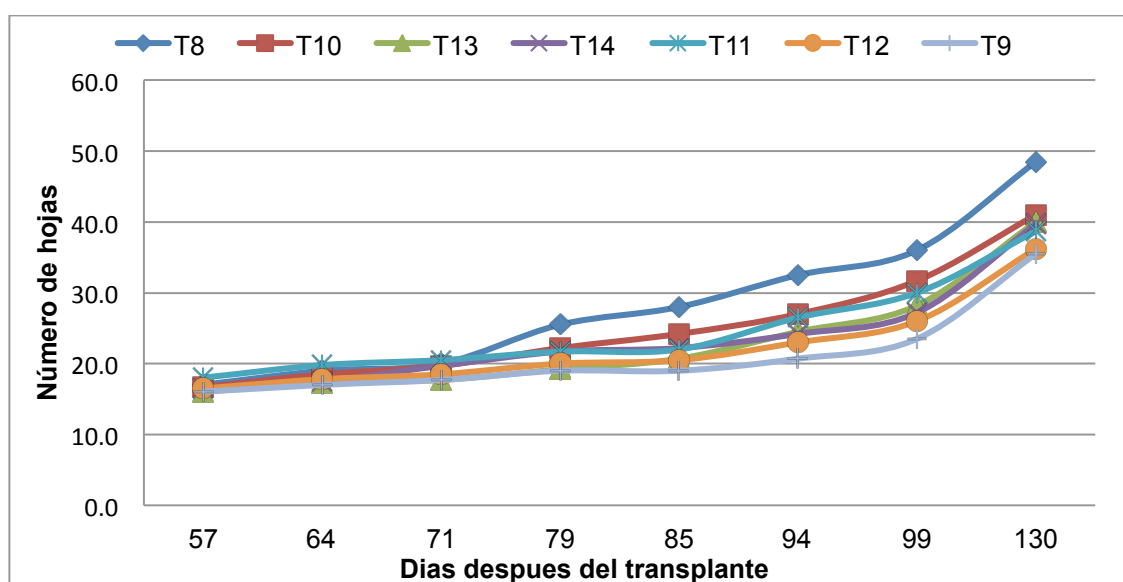


Figura 45. Dinámica del número de hojas del genotipo SofiMely®, a partir de los 50 hasta los 130 días después del trasplante.

T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

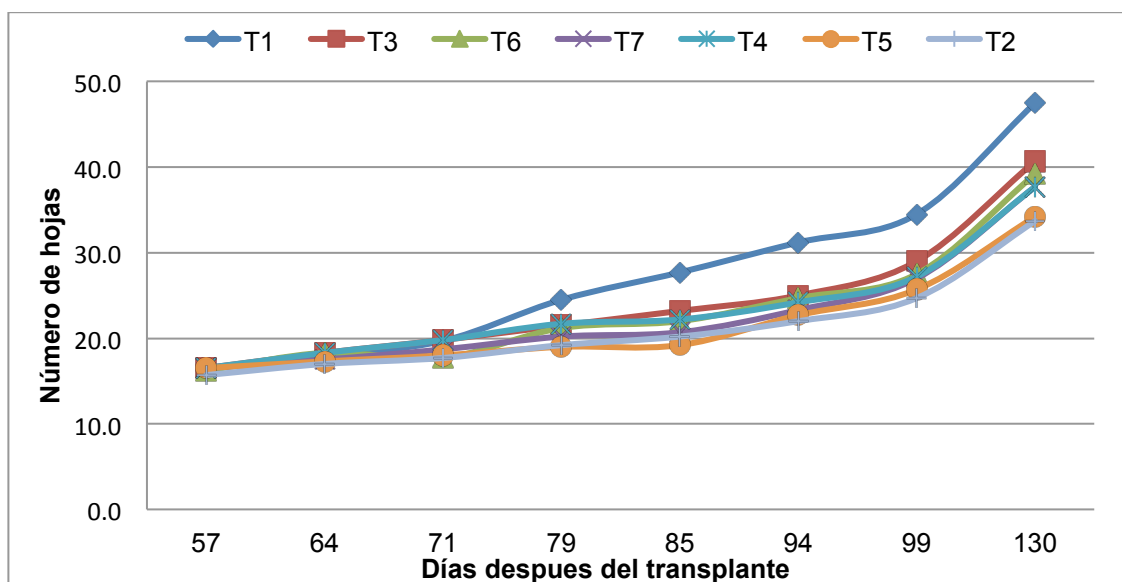


Figura 46. Dinámica del número de hojas del genotipo VILLA NARRO®, a partir de los 50 hasta los 130 días después del trasplante.

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

La mayor reducción del número de hojas se presentó en los tratamientos inoculados con TMV en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker en ambos genotipos, 29.05% en VILLA NARRO® (T2) y 26.8% en SofiMely® (T9).

Los tratamientos con aplicación de 360°Agrocker mostraron una menor reducción, donde los tratamientos T3 y T10 mostraron la menor reducción del 14.32 y 15.5%, respectivamente. Lo que se traduce en una mitigación de la patogénesis de TMV en número de hojas del 85.68% en T3 y 84.5% en T10 (Cuadro 16).

Cuadro 16. Reducción del número de hojas con respecto a los tratamientos absolutos de ambos genotipos.

VILLA NARRO [®]			SofiMely [®]		
Tratamiento	Reducción de número de hojas (%)	Mitigación del TMV (%)	Tratamiento	Reducción de número de hojas (%)	Mitigación del TMV (%)
T1	0	100	T8	0	100
T3	14.32	85.68	T10	15.50	84.50
T6	17.47	82.53	T13	17.50	82.47
T7	20.63	79.37	T14	18.10	81.86
T4	20.63	79.37	T11	20.20	79.79
T5	28.00	72.00	T12	25.40	74.64
T2	29.05	70.95	T9	26.80	73.20

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Se determinó la tendencia de desarrollo de hojas en los dos genotipos de tomate, utilizando un análisis de regresión simple (Juárez *et al.*, 2015), se usó el coeficiente de determinación (R^2) para verificar el ajuste de los mismos. En las ecuaciones de regresión generadas (Cuadro 17) los coeficientes de determinación variaron de $R^2 = 0.682$ a $R^2 = 0.916$, esto indica que el grado de asociación entre las variables es del 68.2 al 91.6 %. No fue tan alto como en la variable altura de planta.

Cuadro 17. Ecuación de regresión, medias de número de hojas final (130 ddt) y coeficiente de determinación de 14 tratamientos en dos genotipos de tomate.

Tratamiento	Ecuación de regresión	Media NH (130 ddt)	R ²
VILLA NARRO®			
T1	Y = 4.0143x + 9.3857	47.5 a	0.910
T3	Y = 2.8595x + 11.382	40.7 b	0.822
T6	Y = 2.7238x + 11.093	39.2 b	0.809
T7	Y = 2.5024x + 11.439	37.7 b	0.784
T4	Y = 2.4595x + 12.382	37.7 b	0.818
T5	Y = 2.1452x + 11.921	34.2 e	0.783
T2	Y = 2.1238x + 11.718	33.7 f	0.809
SofiMely®			
T8	Y = 4.1131x + 9.8036	48.5 a	0.916
T10	Y = 3.0952x + 11.196	41.0 b	0.889
T11	Y = 2.9095x + 9.8571	40.0 b	0.794
T13	Y = 2.6774x + 11.539	39.7 b	0.790
T14	Y = 2.5500x + 13.175	38.7 b	0.827
T12	Y = 2.2964x + 11.979	36.2 c	0.779
T9	Y = 2.1190x + 11.514	35.5 d	0.682
Tukey 0.05		3.91	

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

El parámetro b_1 (pendiente) indica que se presentó un mayor número de hojas en T1 ($b_1 = 4.0143$) y T8 ($b_1 = 4.1131$), los cuales se mantuvieron libres de TMV. La tendencia del desarrollo de hojas fue menor en los tratamientos con

inoculación de TMV en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker T2 ($b_1= 2.1238$) y T9 ($b_1= 2.1190$). En los tratamientos tratados con 360°Agrocker cada 3 y 7 días la tendencia se mantuvo intermedia, fueron estadísticamente iguales (grupo b) como se observa en el análisis de varianza efectuado a los 130 ddt (Cuadro 16). Sin embargo, con la aplicación de 360°Agrocker cada 3 días la tasa de desarrollo de hojas fue mayor T10 ($b_1= 3.0952$) y T3 ($b_1= 2.8595$). Aunque las ecuaciones de regresión obtenidas mostraron valores del R^2 mas bajos que en la altura de planta, es posible estimar el número de hojas en estos genotipos con las ecuaciones de regresión generadas (Cuadro 17).

El crecimiento de la planta esta estrechamente ligado al desarrollo de hojas durante el ciclo de la misma. Smith (1984), menciona que las plantas son organismos modulares. Esto implica que su crecimiento ocurre mediante la repetición de módulos. Cada módulo consiste en una hoja con una yema axilar. De esta forma, el crecimiento de las plantas consiste en la repetición de este patrón y en la expresión de las yemas axilares en apéndices reproductivos (flores) o vegetativos (ramas). Como se observó en la variable altura, 360°Agrocker favoreció el desarrollo de hojas en plantas infectadas con TMV. Juárez *et al.*, (2015), mencionan que al incrementarse el número de hojas se incrementa de igual manera el área fotosintéticamente activa, por lo que existe una mayor acumulación de fotoasimilados los cuales son necesarios para el desarrollo del cultivo y se expresan en una mayor altura y acumulación de biomasa.

Peso fresco y seco de planta

Para el peso fresco y seco de planta en los 14 tratamientos, se observaron diferencias altamente significativas ($P\leq 0.01$) (Cuadro 18 del apéndice). Los coeficientes de variación fueron bajos con valores de 6.01% para peso fresco de planta y 5.10% para peso seco de planta.

La mayor acumulación de biomasa de planta se obtuvo en los tratamientos T1 y T8, los cuales fueron estadísticamente superiores, dichos tratamientos se

Cuadro 19. Comparación de medias para peso fresco y seco de planta en dos genotipos de tomate.

Tratamiento	Peso fresco de planta (g)	Peso seco de planta (g)
T8	902.5 a	408.2 a
T1	895.0 a	402.7 a
T10	779.7b	378.2 ab
T3	765.7 b	377.0 ab
T11	708.2 bc	338.5 bc
T4	701.7 bc	335.5 c
T13	702.5 bc	320.0 cd
T6	700.7 bc	318.2 cd
T14	684.2 bc	317.0 cd
T7	680.7bc	314.2 cd
T5	610.7 c	303.7 cd
T12	615.0 c	286.2 d
T2	435.8 d	190.0 e
T9	434.5 d	183.5 e
Tukey (0.05)	103.95	41.04

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

mantuvieron libres de TMV, el genotipo SofiMely® (T8) presentó el mayor peso fresco y seco de planta 902.5 y 408.2 g respectivamente, así mismo, estos tratamientos presentaron la mayor altura y número de hojas por planta, lo cual se reflejó en mayor acumulación de biomasa. Este resultado llenó las expectativas orientadas a estos tratamientos, los cuales permanecieron protegidos y aislados con malla antiafidos, lo cual evitó la diseminación del virus, aspecto que concuerda con lo reportado por Hernández (2005) menciona que las cubiertas evitan la diseminación de virus y favorece el desarrollo de la planta.

Las plantas de los tratamientos inoculados con TMV en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker (T2 y T9), resultaron estadísticamente inferiores con la menor acumulación de biomasa, 435.8 y 434.5 g, respectivamente, de peso fresco de planta, y de peso seco de planta 190.0 y 183.5 g, respectivamente; de igual manera, en los resultados de altura de planta y Número de hojas por planta resultaron estadísticamente inferiores.

Las plantas de los tratamientos inoculados con TMV en etapa vegetativa y con frecuencias de aplicación de 360°Agrocker cada tres días (T3 y T10) obtuvieron mayor acumulación de biomasa en peso fresco de planta (765.7 y 779.7 g, respectivamente) y peso seco de planta (377.0 y 378.2 g, respectivamente), con respecto a los tratamientos a los que no se les aplicó 360°Agrocker (T5, T12, T2 y T9), como se muestra en el Cuadro 19.

En la Figura 47, se observa la acumulación del peso fresco y seco de la planta en los diferentes tratamientos; en donde es notable la diferencia de acumulación de biomasa en los tratamientos libres de TMV (T1 y T8) de los que están infectados con el patógeno; la inoculación de TMV en etapa vegetativa afectó mayormente en la acumulación de peso fresco y seco como se observa en el T9 (434.5 y 183.5, respectivamente). En los tratamientos con aplicación de 360°Agrocker, la frecuencia de aplicación cada 3 días fue la que mostró mayor

acumulación de peso fresco y seco (779.7 y 378.2 g, respectivamente) en T10 y (765.7 y 377 g, respectivamente) en T3.

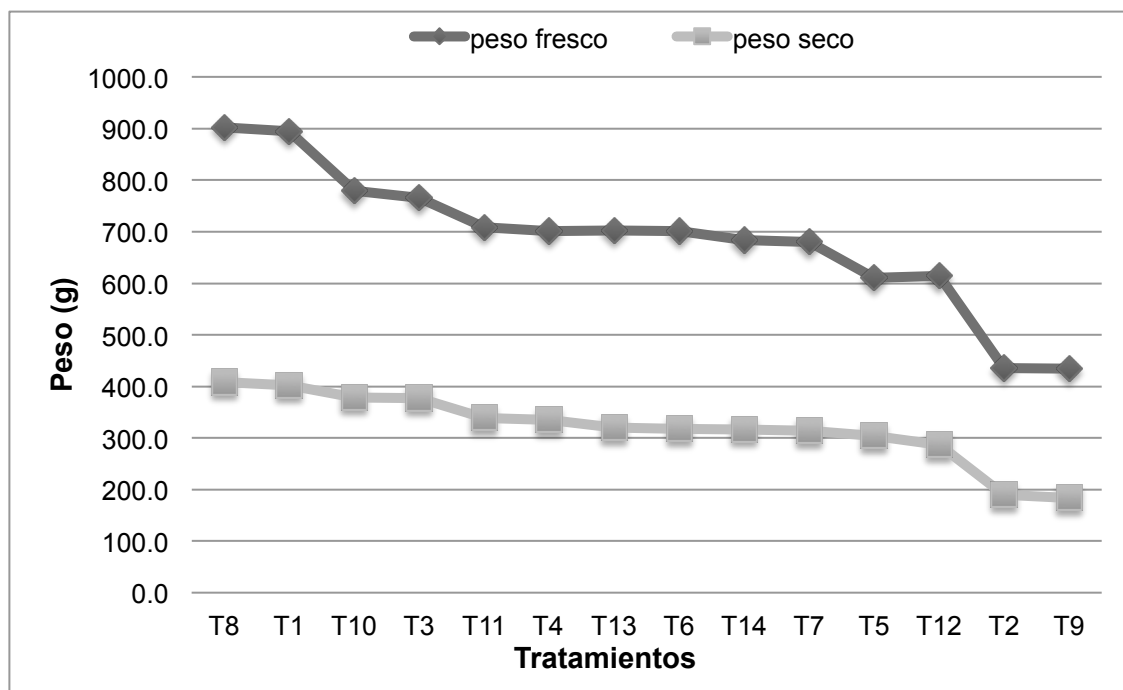


Figura 47. Acumulación de biomasa en dos genotipos de tomate a los 130 días después del trasplante.

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

El mayor porcentaje de reducción de biomasa se presentó en los tratamientos T2 y T9, cuyos porcentajes fueron en peso fresco de planta del 51.31 y 51.86% respectivamente, y en peso seco de planta del 52.82 y 55.05%

respectivamente. Estos tratamientos fueron inoculados con TMV en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker lo que indicó que el TMV afecta significativamente la acumulación de biomasa (Cuadro 20).

Cuadro 20. Reducción del peso fresco de planta con respecto a los tratamientos absolutos de ambos genotipos.

VILLA NARRO®					SofiMely®				
Tratamientos	Reducción (%)		Mitigación del TMV (%)		Tratamientos	Reducción (%)		Mitigación del TMV (%)	
	Peso fresco	Peso seco	Peso fresco	Peso seco		Peso fresco	Peso seco	Peso fresco	Peso seco
T1	0	0	100§	100§	T8	0.00	0.00	100§	100§
T2	51.31	52.82	48.69	47.18	T9	51.86	55.05	48.14	44.95
T3	14.45	6.38	85.55	93.62	T10	13.61	7.35	86.39	92.65
T4	21.60	16.69	78.40	83.31	T11	21.53	17.07	78.47	82.93
T5	31.77	24.58	68.23	75.42	T12	31.86	29.89	68.14	70.11
T6	21.71	20.98	78.29	79.02	T13	22.16	21.61	77.84	78.39
T7	23.94	21.98	76.06	78.02	T14	24.19	22.34	75.81	77.66

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días; § Dado que no fueron inoculadas, se consideró como testigo y una mitigación equivalente de 100 %.

Cuando se aplicó 360°Agrocker la disminución de la acumulación de biomasa se redujo, siendo la frecuencia de aplicación cada tres días la que presentó menor porcentaje de reducción en los tratamientos T3 y T10, 14.45 y 13.61%

respectivamente, en peso fresco de planta y 6.38 y 7.35% respectivamente, en peso seco de planta.

Los resultados de acumulación de biomasa coinciden con lo mencionado por Méndez-Natera (2002), citan que los principales parámetros influyentes sobre la materia fresca y seca de una planta, son el número de hojas por planta y la altura de la misma, un incremento de ambos conlleva a un aumento del peso fresco y seco.

Vázquez y Torres (2006) expresan, que el producto seco obtenido por planta o por unidad de área, depende del balance existente entre la fotosíntesis y la respiración. En este estudio, las hojas de plantas infectadas con TMV mostraron mosaicos y amarillamiento, lo cual seguramente se asocia a un menor nivel de clorofila y, en consecuencia, a una menor producción de hidratos de carbono durante la fotosíntesis; por tal motivo, en las plantas infectadas con TMV el nivel de clorofila disminuyó por la presencia de mosaicos, malformaciones y amarillamiento en las hojas (como se discutió en los síntomas generados por TMV, Figura 41 y 42) y esto repercutió en la producción de hidratos de carbono durante la fotosíntesis. De la misma manera, Hull (2002), menciona que el grado de pérdida en la acumulación de biomasa por TMV está generalmente correlacionado con la severidad de los síntomas, particularmente donde la pérdida de clorofila en las hojas es evidente; así mismo Salazar (1995), explica que la aparición de síntomas de mosaicos se debe a una reducción en la producción de clorofila, dado por la destrucción de cloroplastos debido al efecto del virus. Cabrera *et al.* (2009) señalaron resultados similares con TMV en *Carica papaya* L una pérdida del 50 % de biomasa. La pérdida de pigmentos producto de la infección viral conduce a la disminución de la eficiencia en la producción de hidratos de carbono durante la fotosíntesis e influye en la acumulación de biomasa final de planta (Scholthof, 2004).

Sintomatología de TMV en frutos de plantas inoculadas con el patógeno.

El desarrollo de síntomas en los frutos de plantas infectadas con TMV fue notablemente favorecido a temperaturas entre 22 y 28°C, los síntomas observados en su madurez fisiológica incluyeron lesiones cloróticas, manchas anulares amarillas y patrones de anillados blanquecinos (Figura 48), en la madurez comercial alteraciones en la coloración como el “flaming” o maduración irregular y la aparición de manchas blanquecinas y reducción en tamaño de frutos y número de lóculos y semillas (Figura 49 y 50).



Figura 48. Sintomatología de TMV en frutos de tomate en madurez fisiológica.

Lo cual coincide con lo descrito por Jones *et al.* (2014) y Scholthof (2004) mencionan que los frutos infectados con TMV muestran manchas decoloradas

amarillas, irregulares o en forma de anillo, otras veces se presentan manchas necróticas o alteraciones blanquecinas, como se observa en la Figura 50.



Figura 49. Reduccion del número de lóculos en fruto de tomate causado por TMV.



Figura 50. Sintomatología de TMV en frutos de tomate en madurez comercial.

Las aplicaciones foliares de 360°Agrocker no disminuyeron la sintomatología por TMV en las hojas ni en los frutos, resultados similares observó Broadbent y Winsor (1964), donde las aplicaciones foliares de urea en plantas infectadas con TMV, no afectaron la sintomatología del TMV en las hojas o los frutos.

Cordero (2015), caracterizó los genotipos VILLA NARRO[®] y SofiMely[®] y observó que en ambos genotipos los frutos presentaban formas circulares a rectangular, frutos grandes, la relación longitud-diámetro era grande, los tomates en su madurez fisiológica presentaban un color verde claro sin presencia de hombros verdes y en su madurez comercial un color rosa claro, así mismo, los frutos eran multiloculares o en su caso presentaban más de 6 loculos, estas características se observaron en los frutos de plantas libres de TMV en ambos genotipos (Figura 51).

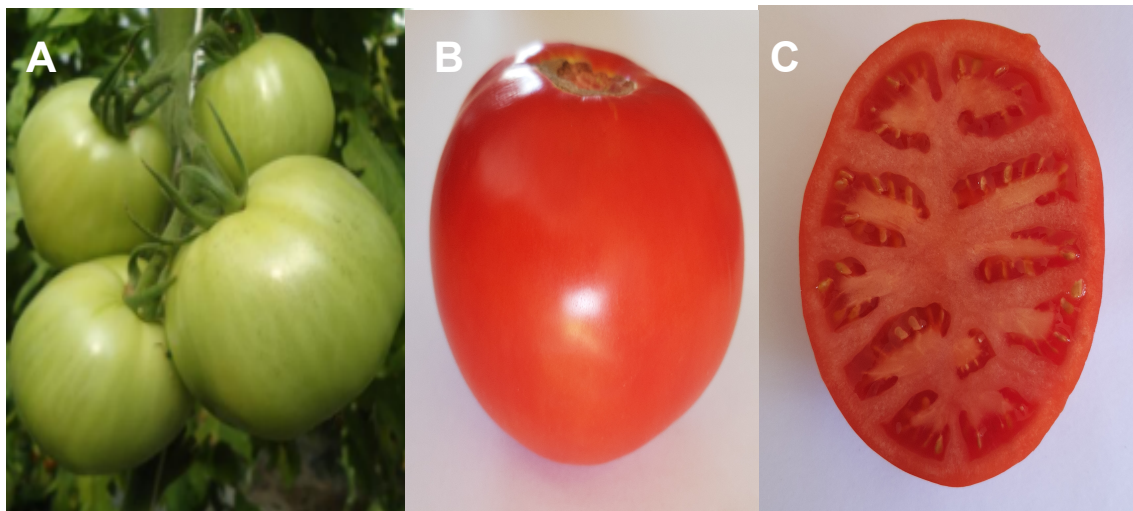


Figura 51. Frutos de tomate libres de TMV. A) Fruto en su madurez fisiológica. B) Fruto en su madurez comercial. C) Lóculos de fruto.

Peso, diametro, longitud, número de lóculos y número de semilla de frutos.

Para las variables de fruto en los 14 tratamientos, se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) (Cuadro 21 del apéndice). Los coeficientes de variación fueron bajos con valores que van del 6.49 a 13.28 %.

En la prueba de comparación de medias para fruto (Cuadro 22), los tratamientos libres de TMV (T1 y T8) presentaron estadísticamente los más altos valores en las variables de fruto. Sin embargo, el genotipo VILLA NARRO[®] (T1) obtuvo el mayor peso de fruto y rendimiento por planta con valores de 220.66 g y 5.22 kg planta⁻¹ respectivamente. Estos resultados se asemejan a lo obtenido por Bernabé y Solís (1999), el cual reportaron que el mayor rendimiento obtenido al evaluar 21 genotipos de tomate lo registró el genotipo PS 388164 con 4.26 kg planta⁻¹. De la misma manera Santiago (1998) al evaluar 12 genotipos de tomate en invernadero obtuvo un rendimiento de 5.42 kg planta⁻¹

Los tratamiento con inoculación de TMV en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker (T2 y T9), fueron estadísticamente inferiores en todas la variables medidas, observándose un mayor efecto de virus sobre el peso de fruto (65.32 y 56.47 g, respectivamente), número de semillas por fruto (64.31 y 60.72, respectivamente) y rendimiento por planta (1.24 y 1.14 kg planta⁻¹, respectivamente).

En los tratamientos inoculados con TMV en etapa vegetativa y con aplicación de 360°Agrocker cada tres días (T3 y T10) fueron los que mostraron un mayor peso de fruto (101.04 y 96.44 g, respectivamente) y rendimiento por planta (3.68 y 3.40 kg planta⁻¹, respectivamente) (Cuadro 22).

Cuadro 22. Comparación de medias para variables de fruto de dos genotipos de tomate.

Tratamiento	Peso (g)	Diámetro (mm)	Longitud (mm)	No. de Lóculos	Rendimiento (kg planta ¹)	No. de Semillas
T1	220.66 a	85.78 a	73.75 a	6.72 a	5.22 a	197.66 a
T8	199.06 b	78.15 a	69.82 a	6.22 a	4.53 b	177.60 a
T3	101.04 c	53.50 b	52.17 b	4.79 b	3.68 c	96.92 b
T10	96.44 c	52.02 bc	50.04 b	4.70 b	3.40 cd	93.94 bc
T4	92.73 c	49.49 bc	48.93 bcd	4.60 b	3.22 cde	92.01 bcd
T6	90.67 cd	49.06 bc	47.55 bcde	4.59 b	3.08 cde	91.45 bcd
T11	90.40 cd	49.08 bc	48.03 bcde	4.48 bc	3.19 cde	90.37 bcd
T13	89.70 cd	48.85 bc	47.36 bcde	4.36 bc	2.91 de	88.07 bcd
T7	88.78 cde	47.63 bc	46.72 bcde	4.22 bc	2.97 de	90.90 bcd
T14	86.30 cde	47.28 bc	46.94 bcde	4.20 bc	2.79 e	86.14 bcd
T5	72.19 def	43.98 bc	43.37 cde	3.94 bc	1.33 f	70.06 bcd
T12	69.36 ef	43.70 bc	43.19 cde	3.75 bc	1.25 f	65.21 bcd
T2	65.32 f	42.27 bc	41.07 de	3.90 bc	1.24 f	64.31 cd
T9	56.47 f	41.59 c	40.57 e	3.41 c	1.14 f	60.72 d
Tukey 0.05	19.84	11.62	8.16	1.14	0.60	32.58

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En la Figura 52 se observa la diferencia en el peso por fruto entre los tratamientos absolutos libres de TMV de los tratamiento inoculados con el virus.

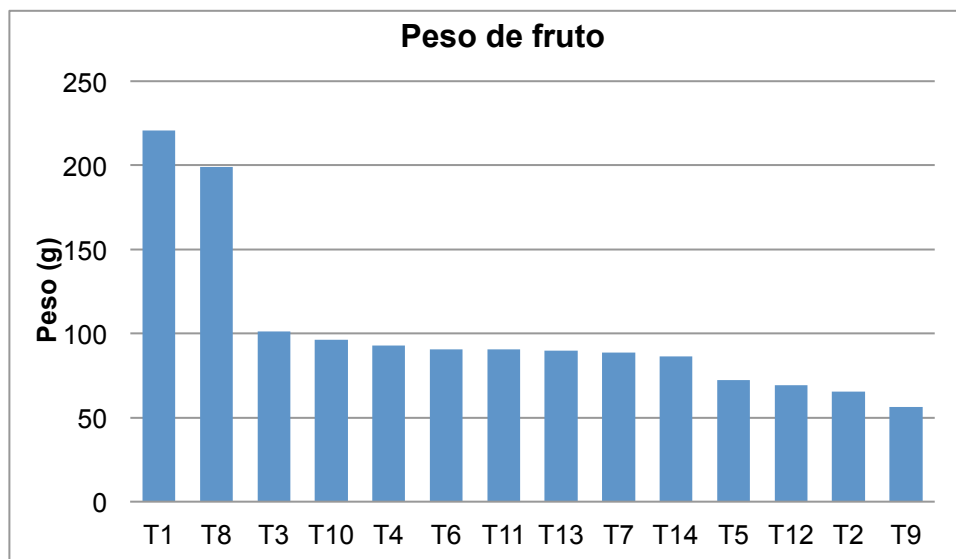


Figura 52. Peso por fruto en 14 tratamientos de dos genotipos de tomate

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En los tratamientos donde no se trataron con 360°Agrocker el peso de fruto fue menor, presentando la mayor disminución del peso de fruto en la inoculación de TMV en etapa vegetativa del 71.63% en el genotipo SofiMely[®] (T9) y del 70.40% en VILLA NARRO[®] (T2) (Cuadro 23).

Cuadro 23. Reducción del peso de fruto en los tratamientos inoculados con TMV y sin aplicación de 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.

VILLA NARRO®		SofiMely®	
Tratamiento	Reducción (%)	Tratamiento	Reducción (%)
T2	70.40	T9	71.63
T5	67.28	T12	65.16

T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker;

Los síntomas que se presentaron en hojas de las plantas inoculadas con TMV, en forma de mosaicos, entre nervaduras con puntos verdes bien definidos descritos anteriormente (41 y 42), influyeron en el peso de fruto, dada la afectación en la reducción en la capacidad fotosintética se tradujo en una considerable disminución de calidad y tamaño de los frutos. Los resultados obtenidos demuestran que la inoculación de TMV en etapa vegetativa afecta considerablemente el peso de fruto en estos genotipos. Así mismo Broadbent (1964) reportó una pérdida en peso de fruto de tomate del 21% cuando inoculó TMV en etapa vegetativa y 14 % cuando inoculó en etapa de antesis.

La aplicación de 360°Agrocker cada tres días tuvo un mayor efecto sobre el peso de fruto en ambos genotipos, mostrando una mitigación de la patogénesis de TMV sobre el peso de fruto del 48.45 % en SofiMely® (T10) y 45.79 % en VILLA NARRO® (T3). La menor mitigación se presentó en T7 y T14, con la aplicación de 360°Agrocker cada siete días del 40.23 y 43.35 %, respectivamente, cuando se inoculó TMV en etapa de antesis (Cuadro 24).

Cuadro 24. Mitigación del TVM sobre el peso de fruto en los tratamientos inoculados con TMV y tratados con 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.

VILLA NARRO®		SofiMely®	
Tratamiento	Mitigación (%)	Tratamiento	Mitigación (%)
T3	45.79	T10	48.45
T4	42.02	T11	45.41
T6	41.09	T13	45.06
T7	40.23	T14	43.35

T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Estudios similares llevó acabo Broadbent (1964), al realizar aplicaciones foliares de nutrientes para reducir el efecto de TMV en plantas inoculadas con el virus y demostró que aplicaciones de urea foliarmente no afectó el número de frutos (33,384 y 33,363 en los tratamientos sin rociar y rociados, respectivamente) o los síntomas del TMV en las hojas o los frutos, pero la aplicación foliar de urea aumentó significativamente ($P=0.01$) el peso promedio por fruto en las plantas infectadas tempranamente con TMV de 55.1 g a 59.8g. Los resultados citados concuerdan con los nuestros, dado que observamos que las plantas infectadas con TMV en etapa vegetativa y tratadas con “nanopartículas de extractos vegetales, 360°Agrocker®” mostraron un incremento en el peso por fruto superior al peso por fruto de plantas sin el tratamiento.

Dimensiones de fruto

En la Figura 53, se observó una diferencia notable en las dimensiones del fruto (diámetro y longitud) entre los tratamientos libres de TMV de los que se inocularon con el virus, independientemente si se trataron con 360°Agrocker, obteniéndose la mayor longitud en el genotipo VILLA NARRO® (T1) con un valor de 73.75 mm. Siendo estos valores similares a los reportados por Cordero (2015), con el mismo genotipo tuvo una longitud de fruto de 70.6 mm. De la misma manera Ocegueda (2004), con el cultivar Rio Milagro que tuvo la mayor longitud de fruto con 74.2 mm seguido por Sonia con 69.2 mm.

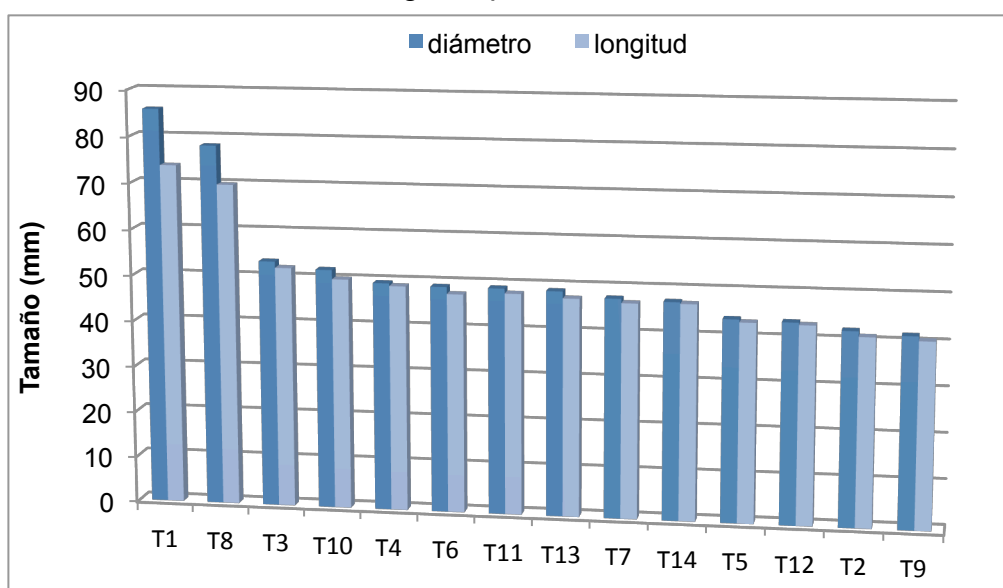


Figura 53. Dimensiones de fruto de los genotipos VILLA NARRO® y SofiMely®.

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Respecto a la longitud del fruto para los tratamientos inoculados con TMV, hubo diferencia altamente significativa, resultando en una menor longitud de fruto cuando se inoculó TMV en etapa vegetativa del 40.57 mm en T9 y 41.07 mm en T2, en contraste cuando se inoculó en la misma etapa fenológica pero tratados con 360°Agrocker cada tres días, la longitud obtenida fue de 52.17 mm en T3 y 50.04 mm en T10.

En relación al diámetro ecuatorial de fruto, se observó la misma tendencia como en longitud de fruto, los tratamientos libres de TMV (T1 y T8) fueron estadísticamente superiores, obteniendo el mayor diámetro de fruto el genotipo VILLA NARRO® (T1) con un valor de 85.78 mm. La inoculación de TMV en etapa vegetativa afectó el diámetro ecuatorial de fruto en ambos genotipos (T2 y T9) con valores de 42.27 y 41.59 mm respectivamente. Los tratamientos con aplicación de 360°Agrocker fueron estadísticamente iguales, sin embargo, la frecuencia de aplicación cada tres días de 360°Agrocker resultó en un mayor diámetro ecuatorial en ambos genotipos con valores de 53.50 mm en T3 y 52.02 mm en T10. En este estudio se observó que las nanopartículas de extractos vegetales de 360°Agrocker, favorecieron el desarrollo de la planta con mayor altura y número de hojas, lo cual seguramente incrementaron los fotoasimilados y estos aumentaron el peso y tamaño de frutos. Así mismo, Marrero (1986) menciona que los fotosintatos que asimila la planta en algunos casos aumenta el número de frutos y en otros aumenta el tamaño y peso.

Número de lóculos

En la Figura 54, se observa el número de lóculos de fruto en ambos genotipos. Los tratamientos absolutos libres de TMV T1 y T8 fueron estadísticamente superiores en número de lóculos por fruto 6.72 y 6.22, respectivamente. Sánchez (2018), menciona que los frutos que tienen mas de 6 lóculos son variedades grandes, “tipo beef”. Estos datos son similares con lo reportado por

Cordero (2015) y Sánchez (2018a, b), ellos evaluaron las variedades SofiMely[®] y VILLA NARRO[®] y observaron que los frutos eran multiloculares o en su caso presentaban más de 4 lóculos, en el caso de VILLA NARRO[®] observaron mas de 7 lóculos.

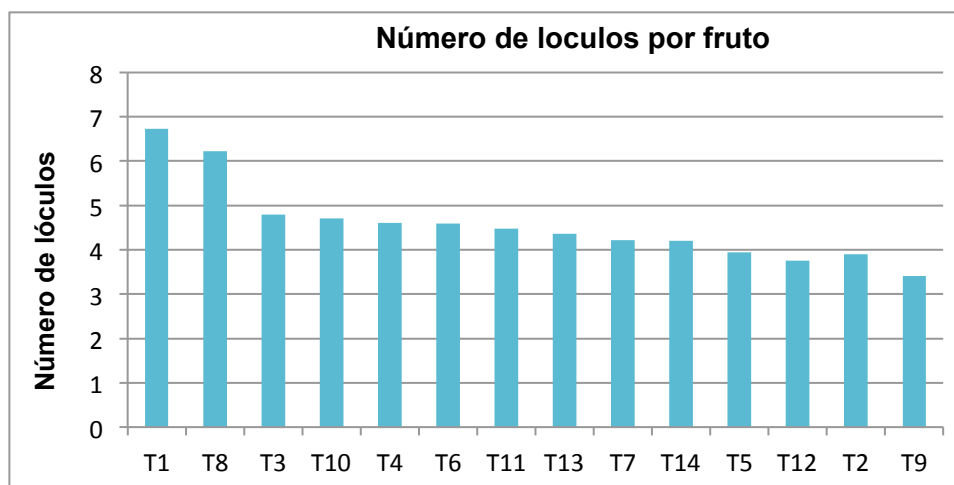


Figura 54. Número de lóculos de frutos en dos genotipos de tomate.

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Los tratamientos inoculados con TMV y sin aplicación de 360°Agrocker el número de lóculos no fue mayor a cuatro, presentando mayor reducción de lóculos en la inoculación del virus en etapa vegetativa de 3.41 en T9 y 3.9 en T2.

En las frecuencia de aplicación de 360°Agrocker no hubo diferencia estadística, no obstante, la aplicación del producto cada 3 días en ambos genotipos

incremento el número de lóculos en 4.79 y 4.70 en los tratamientos T3 y T10 respectivamente, como se observa en la comparación de medias y en la grafica (Cuadro 22 y Figura 54).

Rendimiento kg planta^{-1}

En la figura 55, se observa la diferencia del rendimiento por planta entre los tratamientos, en el cual es evidente el contraste del rendimiento entre las plantas libres de TMV de las inoculas con el virus.

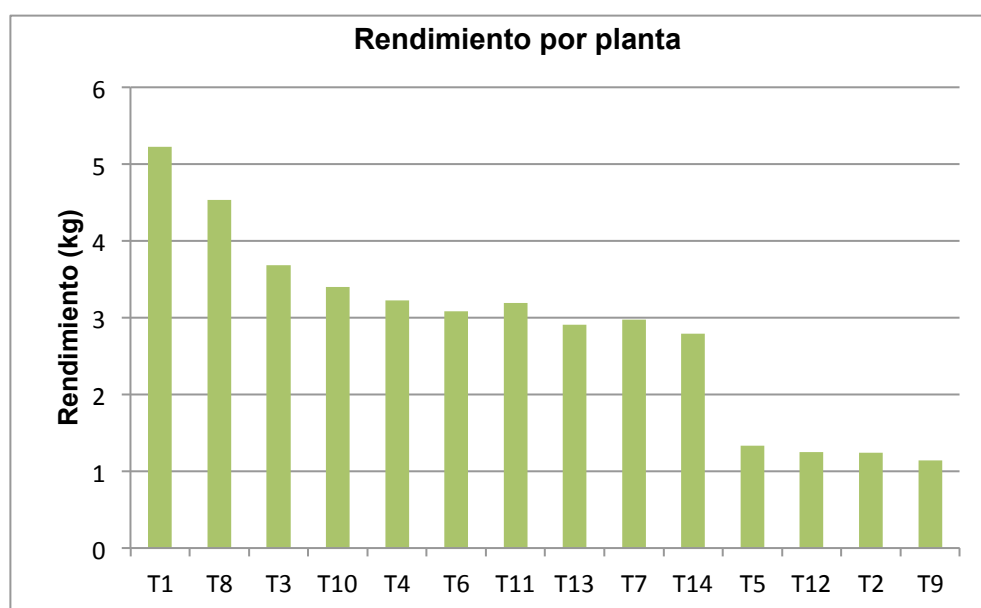


Figura 55. Rendimiento del 1er al 5to racimo por planta en dos genotipos de tomate (kg planta^{-1}).

T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

La inoculación en etapa vegetativa y sin aplicación del producto 360°Agrocker T2 y T9 fueron los que registraron valores menores de rendimiento, con 1.24 y 1.14 kg planta⁻¹, respectivamente.

En las plantas inoculas con TMV y tratadas con 360°Agrocker, los tratamientos que obtuvieron el mayor rendimiento fueron los que se aplicaron cada 3 días, T3 (con 3.68 kg planta⁻¹) seguido de T10 (con 3.40 kg planta⁻¹).

Las plantas infectadas con TMV y sin aplicación de 360°Agrocker, presentaron mayor reducción en rendimiento por planta, cuando se inocularon con dicho virus en etapa vegetativa en ambos genotipos (T2 y T9), observándose mayor reducción del rendimiento kg planta⁻¹ en VILLA NARRO[®] (T2) del 76.25% (Cuadro 25).

Cuadro 25. Reducción del rendimiento kg planta⁻¹ en los tratamientos inoculados con TMV y sin aplicación de 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.

VILLA NARRO [®]		SofiMely [®]	
Tratamiento	Reducción (%)	Tratamiento	Reducción (%)
T2	76.25	T9	74.83
T5	74.52	T12	72.41

T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker;

Las plantas infectadas con TMV y expuestas a nanopartículas, 360°Agrocker, produjeron relativamente más frutos que a las que no se les aplicó, y los frutos también fueron relativamente más grandes y pesados, lo cuál favoreció al incremento en rendimiento kg planta⁻¹. El mayor efecto se observó cuando se aplicó 360°Agrocker cada tres días cuando se inoculó TMV en etapa vegetativa, la reducción en rendimiento kg planta⁻¹ fue menor en SofiMely[®] (T10) 29.94%, esto significó una mitigación sobre rendimiento del 75.06 % T10 (Cuadro 26).

Cuadro 26. Mitigación del TVM sobre rendimiento kg planta⁻¹ en los tratamientos inoculados con TMV y tratados con 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.

VILLA NARRO [®]			SofiMely [®]		
Tratamiento	Reducción de kg planta ⁻¹ (%)	Mitigación kg planta ⁻¹ (%)	Tratamiento	Reducción de kg planta ⁻¹ (%)	Mitigación kg planta ⁻¹ (%)
T1	0	100	T8	0	100
T3	29.50	70.50	T10	24.94	75.06
T4	38.31	61.69	T11	29.58	70.42
T6	41.00	59.00	T13	35.76	64.24
T7	43.10	56.90	T14	38.41	61.59

T1= VILLA NARRO[®] sin TMV ni 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días; T8= SofiMely[®] sin TMV ni 360°Agrocker T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Los resultados obtenidos son consistentes con los informes con otras nanopartículas en tomate. Raliya *et al.* (2015) mencionan que las nanopartículas de TiO₂ en plantas de tomate no ejerció ningún efecto significativo en rendimiento, mientras que las nanopartículas de ZnO aumentaron el rendimiento del fruto en plantas tratadas foliarmente y en suelo. En las plantas tratadas foliarmente, se produjo un 81.9% más de frutos de tomate (en peso) que el control, mientras que las plantas tratadas con suelo aumentaron la producción de fruta en un 305.4%. De la misma manera, Rico *et al.* (2014) y Kole *et al.* (2013) encontraron que las nanopartículas basadas en óxido de cerio (CeO₂) y carbono aumentaron el rendimiento de trigo y melón en 36.6% y 128%, respectivamente. De manera similar, Wang *et al.* (2012) encontraron que plantas de tomate expuestas a CeO₂ mejoró el rendimiento de la fruta en un 81.9%.

Número de semillas

El mayor número de semillas se registró en el genotipo VILLA NARRO® (T1), como se observa en la comparación de medias (Cuadro 22) y Figura 56. La inoculación de TMV afectó considerablemente el número de semillas por fruto como se muestra en T5, T12, T2 y T9.

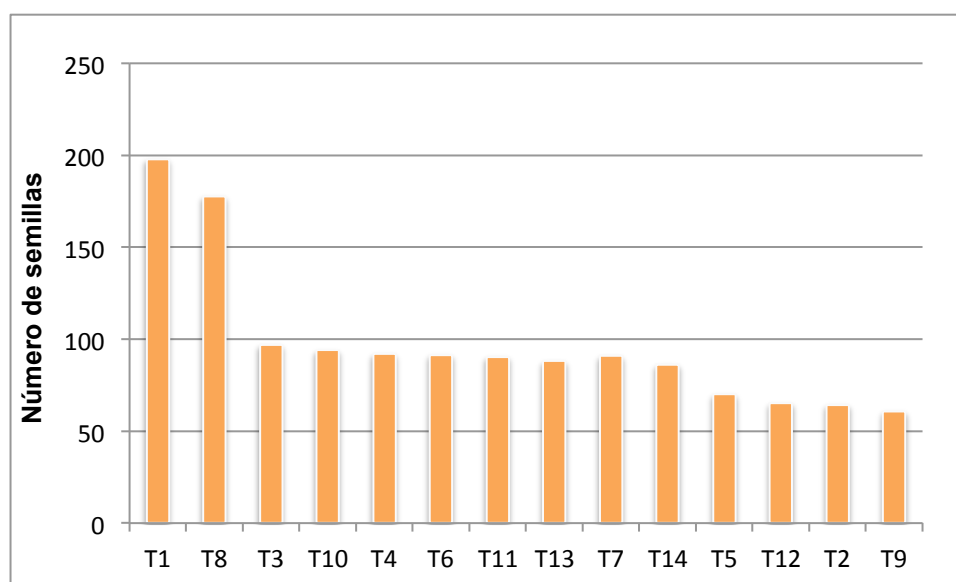


Figura 56. Número de semillas por fruto en dos genotipos de tomate.

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

La inoculación del virus en etapa vegetativa en ambos genotipos, fue la que presentó menor número de semillas por fruto 64.31 y 60.72 semillas por fruto en VILLA NARRO[®] (T2) y SofiMley[®] (T9) respectivamente, esto significó una reducción del 67.46% en T2 y 65.81% en T9 del número de semillas por fruto (Cuadro 27); Mientras que los tratamientos con aspersiones foliares cada 3 días de 360°Agrocker, el número de semillas fue de 96.92 en T3 y 93.94 en T10 (Cuadro 22).

Cuadro 27. Reducción del número de semillas por fruto en los tratamientos inoculados con TMV y sin aplicación de 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.

VILLA NARRO [®]		SofiMley [®]	
Tratamiento	Reducción (%)	Tratamiento	Reducción (%)
T1	0	T8	0
T2	67.46	T9	65.81
T5	64.55	T12	63.28

T1= VILLA NARRO[®] sin TMV ni 360°Agrocker; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T8= SofiMley[®] sin TMV ni 360°Agrocker; T9= SofiMley[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T12= SofiMley[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker.

El porcentaje de reducción del número de semillas en estos tratamientos fueron menores, del 50.97% en T3 y 47.11% en T10, lo que significa una mitigación de la patogénesis del TMV sobre el número de semillas por fruto del 52.89 % en T10 y 49.03% en T3 (Cuadro 28).

La infección por virus a menudo afecta tanto el polen como el óvulo, lo que resulta en una disminución de la competitividad del polen, una reducción de la formación de semillas y una calidad de semilla reducida (Mandahar y Gill, 1984). El desarrollo de las flores se ve gravemente afectado en algunas

combinaciones de virus-huésped, dando como resultado una disminución de la producción de semillas o incluso detener cuando es infectada por virus.

Cuadro 28. Mitigación del TVM sobre el número de semillas por fruto en los tratamientos inoculados con TMV y tratados con 360°Agrocker con respecto a los tratamientos absolutos.

Tratamiento	VILLA NARRO®		Tratamiento	Sofimely®	
	Reducción de NS (%)	Mitigación (%)		Reducción de NS (%)	Mitigación (%)
T1	0	100	T8	0	100
T3	50.97	49.03	T10	47.11	52.89
T4	53.45	46.55	T11	49.12	50.88
T6	53.73	46.27	T13	50.41	49.59
T7	54.01	45.99	T14	51.5	48.50

T1= VILLA NARRO® sin TMV ni 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días; T8= SofiMely® sin TMV ni 360°Agrocker T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Caldwell, (1952) observó que el virus *Tomato aspermy cucumovirus* (TAV) en tomate reduce la producción de semillas porque la infección del virus interfiere con la meiosis, causando esterilidad tanto del polen como de los óvulos. De manera similar Ghanejar *et al.*, (1974), mencionan que la inoculación temprana con *Tobacco streak virus* cepa W (W-TSV) redujo la producción de flores y evitó el desarrollo de semillas. Así mismo, Agarwal *et al.*, (1976) reportan que el virus *Bean common mosaic virus* (BCMV), causó la transformación de la inflorescencia en estructuras con forma de hoja (phyllody) en *Phaseolus mungo*, lo que resultó en una producción de semillas severamente reducido. Cuando la haba (*Vicia faba*) se infecta con *Bean leafroll virus* (BLRV) ninguna flor abscisa

son producidas, y los óvulos ya fertilizados producen semilla pequeña (Gibbs y Harrison, 1979).

Monitoreo de niveles de inóculo con prueba ELISA

Para las lecturas de absorbancia en la prueba ELISA, se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre tratamientos (Cuadro 29 del apéndice) para 5 lecturas evaluadas. Los coeficientes de variación fueron bajos con valores de 1.98 a 3.49 %.

Los tratamientos T1 y T8 resultaron negativo a TMV en la prueba de ELISA, estos tratamientos permanecieron libres del patógeno durante el desarrollo del experimento, lo cual se evidencia en las absorbancias obtenidas, con cinco lecturas que van del 0.182 al 0.223 de densidades ópticas (Cuadro 30). El resto de tratamientos resultaron positivo a TMV con lecturas mayores al control negativo de 0.593, y fueron estadísticamente superiores en cada lectura de absorbancia después de la inoculación del TMV (Cuadro 30; Figura 57).

En la Figura 57, se observan los niveles del inóculo en los tratamientos, densidades ópticas registradas con la prueba ELISA; la concentración del virus en la planta, después de cada inoculación, presentó una tendencia lineal, fue incrementándose en los tratamientos sin aplicación de 360°Agrocker y decreciendo en los tratamientos donde si se trató con el producto nanoparticulado de extractos vegetales.

Cuadro 30. Comparación de medias para lecturas de ELISA en planta en dos genotipos de tomate.

Tratamiento	Después de inoculación	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4
T2	1.273 a	1.462 ab	1.523 a	1.612 a	1.697 a
T5	1.272 a	1.477 a	1.540 a	1.612 a	1.689 a
T9	1.282 a	1.485 a	1.520 a	1.572 a	1.632 ab
T12	1.275 a	1.445 ab	1.525 a	1.548 a	1.595 b
T7	1.285 a	1.402 bc	1.357 b	1.180 b	1.152 c
T14	1.274 a	1.403 bc	1.353 b	1.175 b	1.131 cd
T6	1.254 a	1.375 cde	1.234 c	1.154 b	1.126 cd
T11	1.282 a	1.297 f	1.250 c	1.150 b	1.087 cde
T13	1.282 a	1.312 ef	1.119 d	1.106 b	1.070 de
T4	1.256 a	1.376 cd	1.277 bc	1.165 b	1.061 de
T10	1.254 a	1.320 def	1.232 c	1.147 b	1.020 ef
T3	1.282 a	1.314 def	1.225 c	1.152 b	0.962 f
T8	0.182 b	0.221 g	0.197 e	0.211 c	0.163 g
T1	0.199 b	0.221 g	0.233 e	0.193 c	0.157 g
Tukey (0.05)	0.055	0.063	0.086	0.100	0.080

Positivo a TMV ≥ 0.593 ; T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely[®] libre de TMV; T9= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

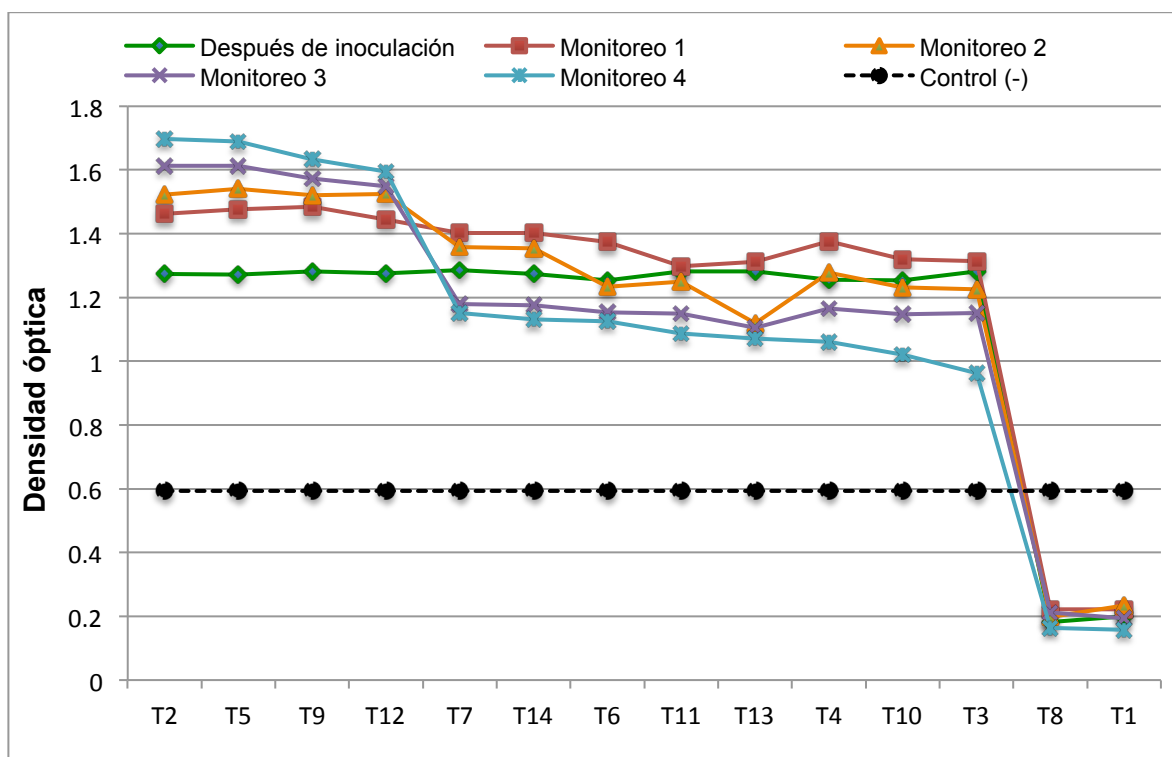


Figura 57. Dinámica de lecturas de ELISA durante el desarrollo del experimento en dos genotipos de tomate.

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En ambos genotipos la inoculación de TMV en etapa vegetativa mostró mayor concentración del virus, presentando el genotipo VILLA NARRO[®] (T2) la mayor densidad óptica, con una lectura inicial después de la inoculación de 1.273 hasta la lectura final de 1.697, seguido de SofiMely (T9) de 1.282 hasta 1.632. (Cuadro 30). Estas absorbancias significaron un incremento total del inóculo del 30.14% en T2 y 25.43% en T9. Así mismo, se observa que el genotipo VILLA NARRO[®] (T2, T5) fue el que presentó los mayores porcentajes de incremento cuando no se le aplicó 360°Agrocker, 30.14% de incremento de TMV cuando se inoculó el virus en etapa vegetativa (T2) y 29.83% de incremento del inóculo en etapa de antesis (T5) (Cuadro 31), dichos tratamientos presentaron una tendencia lineal creciente.

En los tratamientos inoculados con TMV, y tratados con 360°Agrocker, presentaron una tendencia lineal decreciente a partir de la primera aplicación de dicho producto, los tratamientos con la frecuencia de aplicación del producto nanoparticulado cada tres días e inoculado con TMV en etapa vegetativa resultó con menor lectura de densidad óptica, observándose en el genotipo VILLA NARRO[®] (T3) una lectura inicial de 1.282 y una lectura final de 0.962 y en el genotipo SofiMely[®] (T10) una lectura inicial de 1.254 y una lectura final de 1.020 (Cuadro 30). Estas disminuciones de absorbancias después de las aplicaciones de 360°Agrocker, resultaron en una disminución máxima de inóculo del 26.73% en VILLA NARRO[®] (T3) y 19.38% en SofiMely[®] (T10) (Cuadro 31).

Cuando se aplicó 360°Agrocker cada 7 días en ambos genotipos, se observaron menores porcentajes de disminución del inóculo 15.34% en el genotipo VILLA NARRO[®] (T4) y 15.93% en el genotipo SofiMely[®] (T11) (Cuadro 31).

Cuadro 31. Monitoreo de niveles del inóculo de TMV, expresados en porcentajes y registrados con la prueba de ELISA durante el desarrollo del cultivo.

Tratamientos	Monitoreo 1	Monitoreo 2	Monitoreo 3	Monitoreo 4	Total
T2	14.85	4.17	5.84	5.27	30.14
T5	16.12	4.27	4.68	4.78	29.83
T9	15.83	2.36	3.42	3.82	25.43
T12	13.33	5.54	1.51	3.04	23.41
T7	9.11	-3.21	-13.04	-2.37	-9.52
T14	10.13	-3.56	-13.16	-3.74	-10.34
T6	9.65	-10.25	-6.48	-2.43	-9.51
T11	1.17	-3.62	-8.00	-5.48	-15.93
T13	2.34	-14.71	-1.16	-3.25	-16.79
T4	9.55	-7.19	-8.77	-8.93	-15.34
T10	5.26	-6.67	-6.90	-11.07	-19.38
T3	2.50	-6.77	-5.96	-16.49	-26.73

Signo (-) indica disminución del inóculo; Positivo a $TMV \geq 0.593$; T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Esto se constata con un análisis de regresión simple (Juárez *et al.*, 2015), las ecuaciones de regresión obtenidas y sus correspondientes R^2 (Cuadro 32), en los dos genotipos la inoculación de TMV en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker fue mayor que $R^2=0.875$; cuando se trato con 360°Agrocker cada

tres días fueron mayores de $R^2 = 0.769$, esto indica que el grado de asociación lineal entre las variables es alto, y concretamente del 87.5 y 76.9% respectivamente.

Cuadro 32. Ecuación de regresión, medias de la última lectura de ELISA y coeficiente de determinación de 12 tratamientos en dos genotipos de tomate.

Tratamiento	Ecuación de regresión	X LE1	R ²
VILLA NARRO®			
T2	$y = 0.0998x + 1.214$	1.697a	0.95809
T5	$y = 0.0969x + 1.2273$	1.689 a	0.93190
T7	$y = -0.0488x + 1.4216$	1.152 c	0.50554
T6	$y = -0.0477x + 1.3717$	1.126 cd	0.59564
T4	$y = -0.0601x + 1.4073$	1.061 de	0.63433
T3	$y = -0.0802x + 1.4276$	0.962 f	0.81991
SofiMely®			
T9	$y = 0.0787x + 1.2621$	1.632 ab	0.87555
T12	$y = 0.0743x + 1.2547$	1.595 b	0.87495
T14	$y = -0.0514x + 1.4214$	1.131 cd	0.49942
T11	$y = -0.0537x + 1.3743$	1.087 cde	0.87303
T13	$y = -0.063x + 1.3668$	1.07 de	0.80834
T10	$y = -0.0641x + 1.3869$	1.02 ef	0.76939
Tukey 0.05		0.080	

T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Las ecuaciones generadas se pudieran aplicar para predecir la concentración viral de TMV en plantas de tomate tratadas con 360°Agrocker o sin tratar con el producto nanoparticulado en estos genotipos de tomate.

Todos los tratamientos se mantuvieron aislados con malla antáfidos para evitar la entrada de insectos; los tratamientos T1 y T8 no se les inoculó TMV y no presentaron presencia del virus al realizar la prueba de ELISA y por ende se obtuvieron mayores índice de altura, número de hojas, acumulación de biomasa fresca y seca, peso de fruto, tamaño de fruto y número de semillas por fruto, como ya se discutió anteriormente, esto concuerda con lo reportado por Hernández (2005) quien encontró que las cubiertas evitan la diseminación de virus y favorece el desarrollo de la planta.

En cuanto a las etapas de inoculación, los resultados obtenidos concuerdan con Hernández (2005), el cual comparo dos fechas de inoculación de PVY, las cuales fueron vegetativa y prefloración en plantas de papa y obtuvo mayor concentración viral en plantas inoculadas en etapa vegetativa.

Otros estudios relacionados con el uso de extractos vegetales como los realizados por Renuka *et al.* (2004) demostraron que los extractos de *Mirabilis jalapa* y de *Harpulia cupanioides* fueron eficaces en inhibir de un 60 a 80% el virus bronceado del tomate (TSWV). Chen *et al.* (1991) reportaron que los extractos de *Phytolacca americana* inhibe en un 86% la formación de lesiones causadas por TMV, los extractos protegieron a las plantas contra siete virus, cinco virus de RNA: *Tabacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV) y *Potato virus X* (PVX) en plantas de *Chenopodium amaranticolor*; *Potato virus Y* (PVY) en plantas de *Gomphrena globosa*; y dos virus de DNA: *African cassava mosaic virus* (ACMV) en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) en *Brassica campestris*. De la misma manera, Verma *et al.*, (1979) reportaron que los extractos obtenidos de la raíz de *Boerhavia diffusa*, mostraron actividad

inhibitoria en TMV del 85 y 93 % cuando se aplicaron 24 horas antes de la inoculación del virus en *Chenopodium amaranticolor* y *Nicotina tabacum* var. NP31, respectivamente, y del 95 y 70 % cuando se inocularon con el virus *Sunnhemp rosette virus* (SRV) en *Chenopodium amaranticolor* y *Crotalaria juncea*, respectivamente. Los extractos de los filamentos de *Cuscuta reflexa* inhibieron el virus en un 78% cuando se inoculó TMV en *Chenopodium amaranticolor* y 61% en *Nicotina tabacum* var. NP31. Sin embargo, no se observó dicha inhibición cuando estos extractos se aplicaron 24 horas después de la inoculación del virus. La proteína antiviral de *Phytolacca* (PAP) inhibe la infección del virus inoculado en la superficie de las hojas, y previene la transmisión del *Potato virus Y* (PVY).

La acción de estos compuestos antivirales puede darse de manera general a tres niveles diferentes:

- a) Aglutinando las partículas virales, impidiendo así la infección.
- b) Inhibiendo algún proceso bioquímico indispensable para que prospere la infección viral, por ejemplo la síntesis de proteínas.
- c) Estimulando la producción de otros compuestos de defensa de la planta infectada.

El producto nanoparticulado de extractos vegetales 360°Agroker no eliminó la partícula viral de TMV, pero si tuvo la capacidad de disminuir las partículas virales, lo cual seguramente fue a través de contrarrestar su replicación. Se postula además que el mecanismo de acción de la proteína PAP es mediante la inactivación de los ribosomas utilizados por el virus para la síntesis de la replicasa. Por otra parte Márquez *et al.* (1999) mencionan que se han aislado varios compuestos de las diferentes partes de la planta de *Phyllanthus* sp, y han encontrado compuestos como diterpenos, triterpenos, esteroides, flavonoides, polisacáridos, aminoácidos, el cual nos dice que son compuestos que tienen

actividad biológica sobre diferentes tipos de microorganismos incluyendo a los virus.

Rao *et al.*, (1984) demostraron que los extractos de *Cycas revoluta* tiene actividad contra los virus de las plantas del tomate: *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Potato virus X* (PVX), *Potato virus Y* (PVY), cuando se aplicaron 24 h antes de la inoculación del virus, o cuando estaba mezclado con diversos virus inoculados. Los extractos obtenidos de la col inhibieron la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) en *Nicotiana tabacum* var. Xhantine y *Nicotiana glutinosa* (Varma, 1979) citado por Hernández (2005).

Análisis Multivariados

Para evaluar la mitigación de TMV sobre dos genotipos de tomate con el uso de un producto nanoparticulado, se utilizó un análisis multivariado para analizar simultáneamente medidas múltiples (11 variables). Con el método multivariado en el Análisis de Conglomerados (AC), se trató de dar una explicación a las relaciones entre tratamientos para su clasificación entre grupos (Gn) con diversos grados de similitud existentes entre ellas.

ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

Núñez y Escobedo (2011), mencionan que la formación del número correcto de grupos se lleva acabo realizando un corte del dendograma a una altura definida, de manera que los individuos incluidos en un mismo grupo guarden relación entre ellos de acuerdo a las características morfológicas evaluadas. Teniendo esto en cuenta en el AC, se formaron 7 grupos a una distancia euclidiana de 0.76 (Figura 58), cuando la población 2 se unió con la población 9 (Cuadro 33, del apéndice).

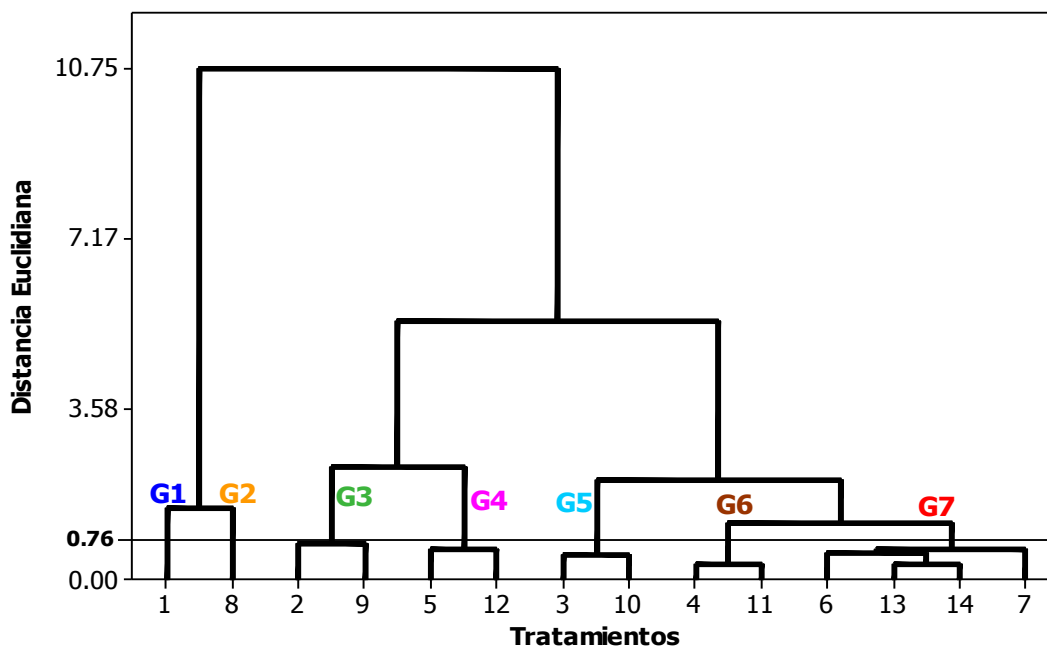


Figura 58. Dendrograma del análisis de conglomerados para la clasificación de 14 tratamientos derivado de 11 variables en dos genotipos de tomate.

T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En el análisis de varianza (Cuadro 34 a y b), se observaron diferencias altamente significativas ($P=0.001$) entre los grupos formados con bajos coeficientes de variación en un rango de 2.57 a 10.26 %.

En la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) (Cuadro 35 a y b) los grupos G1 y G2 fueron estadísticamente superiores a los demás grupos y estadísticamente iguales entre ellos en las variables NH, PFP, PSP, DF, LF, NL y NS; sin embargo, la variedad VILLA NARRO® (T1) agrupado en G1, fue estadísticamente superior en peso de fruto y Rendimiento con valores de 220.66 g y 5.22 Kg pl⁻¹, respectivamente, y la variedad SofiMely® (T8) agrupado en G2 fue estadísticamente superior en AP con 213.45 cm, estos resultados llenaron las expectativas orientadas a estos grupos, ya que los tratamientos incluidos en ellos fueron plantas no inoculadas y libres de TMV (T1 y T8).

Cuadro 35 a. Comparación de medias para los grupos del análisis de conglomerados para las variables vegetativas.

Grupos	TRAT	AP (cm)	NH	PFP (g)	PSP (g)	DO+
G1	1	191.50 b	47.5 a	895.00 a	402.75 ab	0.16 d
G2	8	213.45 a	48.50 a	902.50 a	408.25 a	0.16 d
G3	2, 9	122.63 d	34.63 c	435.13 e	186.75 e	1.66 a
G4	5, 12	123.13 d	35.25 c	612.88 d	295.00 d	1.65 a
G5	3, 10	163.13 c	40.88 b	772.75 b	377.63 b	0.99 c
G6	4, 11	156.63 c	38.25 b	705.00 c	337.00 c	1.07 b
G7	6, 7, 13, 14	132.06 d	39.19 b	692.06 c	317.38 cd	1.12 b
Tukey (0.05)		15.81	2.80	56.98	26.25	0.05

DO+ = densidad óptica Positivo a TMV ≥ 0.593 ; AP= Altura de planta; NH= Número de hojas; PFP= Peso fresco de planta; PSP= Peso seco de planta; T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely®

inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Cuadro 35 b. Comparación de medias para los grupos del análisis de conglomerados para las variables de fruto.

Grupos	Trat	PF (g)	DF (mm)	LF (mm)	NL	NS	REND Kg PI ⁻¹
G1	1	220.66 a	85.78 a	73.75 a	6.72 a	197.66 a	5.22 a
G2	8	199.06 b	78.16 a	69.81 a	6.22 a	177.59 a	4.53 b
G3	2, 9	60.89 e	41.93 c	40.82 d	3.65 d	62.52 d	1.19 e
G4	5, 12	70.78 de	43.84 c	43.28 cd	3.85 cd	67.63 cd	1.29 e
G5	3, 10	98.74 c	52.76 b	51.11 b	4.75 b	95.43 b	3.54 c
G6	4, 11	91.56 c	49.28 cb	48.48 cb	4.54 cb	91.18 cb	3.21 cd
G7	6, 7, 13, 14	88.86 cd	48.20 cb	47.14 cb	4.34 bcd	89.14 cb	2.94 d
Tukey (0.05)		18.79	7.87	5.25	0.87	26.33	0.56

PF= Peso de fruto; DF= Diámetro de fruto; LF= Longitud de fruto; NL= Número de lóculos; NS= Número de semillas; KgPI⁻¹= rendimiento kg por planta; T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Dichos tratamientos estuvieron protegidos y aislados con malla antiafidos, lo cual evitó la diseminación del virus, aspecto que concuerda con lo reportado por Hernández (2005) menciona que las cubiertas evitan la diseminación de virus y favorece el desarrollo de la planta. Esto se corrobora con los datos obtenidos en la prueba de ELISA, las lecturas de DO para ambos grupos fueron estadísticamente inferiores al control negativo (0.593) con un valor de 0.16

(Cuadro 35a), resultando negativo a TMV, por lo cual tuvieron un desarrollo fenológico normal de cada genotipo.

El G3 agrupó los tratamientos con inoculación de TMV en etapa vegetativa (T2 y T9) y G4 los tratamientos con inoculación en etapa de antesis (T5 y T12), ambos grupos fueron estadísticamente superiores en DO, indicando mayor cantidad del virus en G3 (1.66) que en G4 (1.65), esto como resultado de que no fueron tratados con 360°Agrocker. Fletcher y MacNeill (1971) mencionan que la reacción de la planta de tomate a la infección con TMV depende de la etapa fenológica de infección. Este efecto se pudo observar en la inoculación del virus en etapa vegetativa (G3) redujó más la acumulación de biomasa (435.13 g PFP y 186.75 g PSPS) que cuando se inoculó en etapa de antesis (G4) (612.88 g y 295.00 g), de la misma manera, afectó considerablemente el peso de fruto y el rendimiento en un 60.89 g PF y 1.19 kg PI⁻¹ en G3 y 70.78 g PF y 1.29 kg PI⁻¹ en G4. Estos resultados indican que inocular TMV a temprana edad en la planta, se afecta de manera considerable el peso fresco y seco de la planta, el peso de fruto y rendimiento por planta en estos genotipos utilizados.

Aunque 360°Agrocker no eliminó completamente la presencia de TMV, los resultados evidencian que los tratamientos inoculados con TMV en etapa vegetativa y con aplicación del producto cada tres días agrupados en G5, resultaron en menor cantidad del inóculo viral que cuando se aplicó 360°Agrocker cada siete días, agrupados en G6, con absorbancias de 0.99 y 1.07 DO, respectivamente. El efecto de la reducción de inóculo del TMV por biopesticidas que involucran extractos vegetales ha sido documentado en otras investigaciones, Renuka *et al.* (2004) demostraron que los extractos de *Mirabilis jalapa* y de *Harpulia cupanioides* fueron eficaces en inhibir de un 60 a 80% el virus *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) en tomate. Así mismo, Chen *et al.* (1991) reportaron que los extractos de *Phytolacca americana* inhibe en un 86%

la formación de lesiones causadas por TMV, los extractos protegieron a las plantas contra siete virus, cinco virus de RNA: *Tabacco mosaic virus* (TMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Alfalfa mosaic virus* (AMV) y *Potato virus X* (PVX) en plantas de *Chenopodium amaranticolor*; *Potato virus Y* (PVY) en plantas de *Gomphrena globosa*; y dos virus de DNA: *African cassava mosaic virus* (ACMV) en plantas de *Nicotiana benthamiana* y *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) en *Brassica campestris*. De la misma manera, Verma *et al.* (1979) reportaron que los extractos obtenidos de la raíz de *Boerhavia diffusa*, mostraron actividad inhibitoria en TMV del 85 y 93 % cuando se aplicaron 24 horas antes de la inoculación del virus en *Chenopodium amaranticolor* y *Nicotina tabacum* var. NP31, respectivamente, y del 95 y 70 % cuando se inocularon con el virus *Sunnhemp rosette virus* (SRV) en *Chenopodium amaranticolor* y *Crotalaria juncea*, respectivamente. Así mismo, G5 resultó con mayor acumulación de biomasa (77.75 g PFP y 377.63 g PSP) y un mayor peso de fruto (98.74 g) y rendimiento (3.54 kg PI⁻¹). Owolade *et al.* (2008) y Chen *et al.* (2014), mencionan que las nanopartículas de titanio (Ti) estimulan la producción de más carbohidratos, fomentando el crecimiento y la tasa de fotosíntesis en las plantas, los resultados de los autores citados concuerdan con los nuestros, dado que observamos que las plantas infectadas con TMV y tratadas con “nanopartículas de extractos vegetales, 360°Agrocker®” mostraron un crecimiento y desarrollo superior a las plantas sin el tratamiento.

En el G7 se agruparon los tratamientos inoculados con TMV en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada tres (T6, T13) y siete días (T7, T14), los cuales tuvieron un comportamiento similar en 11 variables evaluadas (Figura 58), esto demuestra que no existe diferencia en términos de crecimiento y desarrollo de la planta entre dos frecuencias de aplicación de 360°Agrocker en etapa de antesis. Por otra parte, dicho grupo resultó en mayor cantidad del virus, con una absorbancia de 1.12 DO, la absorbancia fue mayor que en los grupos inoculados en etapa vegetativa G5 (0.99) y G6 (1.07).

COMPONENTES PRINCIPALES

En el ACP los tres primeros componentes principales explicaron el 98% de la variación total de los datos (Cuadro 36). De acuerdo con los vectores propios, en el primer componente principal las variables de mayor peso son DO NL y LF. En el segundo componente principal las variables de más influencia fueron PSP, PFP y DF. En el tercer componente principal sobresalen las variables DO y AP.

Cuadro 36. Coeficientes y valores del análisis de componentes principales.

Análisis de valores	CP1	CP2	CP3
Valor propio	10.027	0.615	0.139
Proporción (%)	91.2	5.6	1.3
Acumulada (%)	91.2	96.7	98.0
Variables		Vectores propios	
DO	-0.311*	0.021	0.580*
PF	0.306*	0.299	-0.125
DIAM	0.305*	0.312*	-0.092
LONG	0.310*	0.218	-0.047
NL	0.311*	0.135	-0.076
NS	0.307*	0.271	-0.171
REND	0.299	-0.250	-0.192
AP	0.296	0.020	0.938*
NH	0.307*	0.006	-0.016
PFP	0.292	-0.464*	-0.136
PSP	0.271	-0.629*	-0.003

*cargas del vector propio > 0.300, indican las variables con mayor peso; CP= componente principal; DO= Densidad óptica; PF= peso de fruto; DIAM= diámetro de fruto; LONG= longitud de fruto; NL= número de lóculos; NS= número de semillas; REND= rendimiento kg PI⁻¹; AP= altura de planta; NH; número de hojas; PFP= peso fresco de planta; PSP= peso seco de planta.

La alta proporción de la varianza explicada con un bajo número de componentes permitió una mejor interpretación de esa variación con este tipo de análisis (Olivares, 2014).

En la Figura 59, en el primer componente se observó un contraste entre DO y el resto de las variables, teniendo mayor impacto sobre las variables NL y LF, correlacionándose negativamente y altamente significativa con valores de $r=0.959^{**}$ y $r=-0.956^{**}$, respectivamente (Cuadro 37, del apêndice). Estos resultados demuestran que el incremento de la cantidad viral en estos genotipos reduce significativamente las variables de fruto.

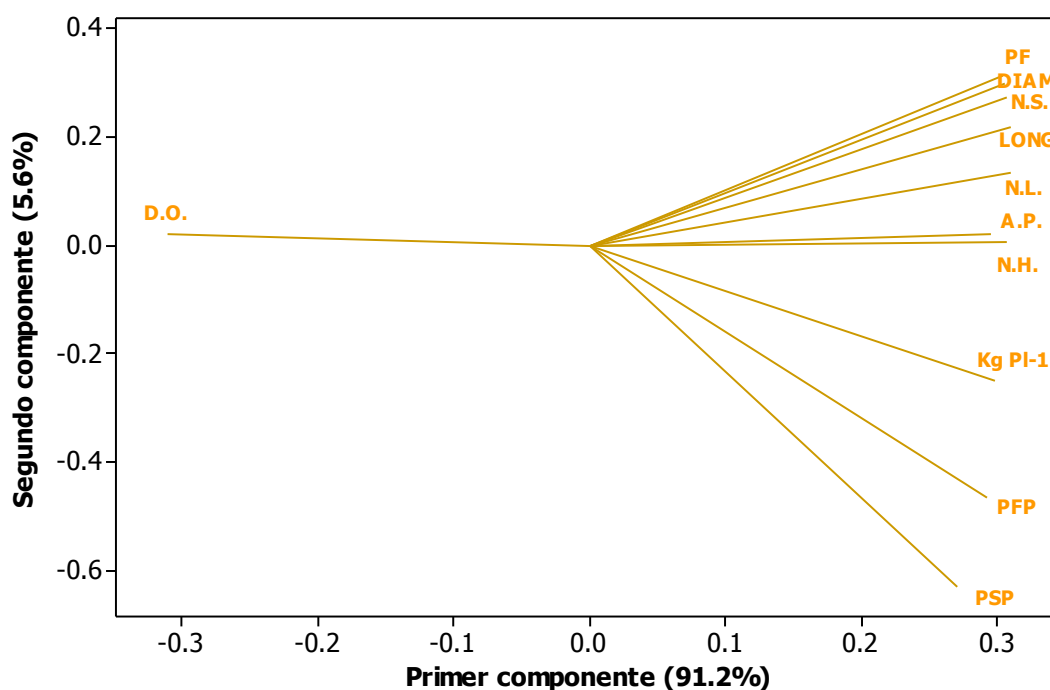


Figura 59. Distribución de los vectores de 11 variables en dos componentes principales, de dos genotipos de tomate.

En el segundo componente se observó una separación entre las variables de PFP, PSP y rendimiento kg PI^{-1} situadas en el lado negativo del segundo componente e indicando una correlación positiva y altamente significativa de

rendimiento con PFP y PSP con valores de $r=0.928^{**}$ y $r=0.878^{**}$, respectivamente, esto indica que un incremento en el peso fresco o seco de planta produce un mayor rendimiento de fruto. Por otro lado las variables situadas en el lado positivo del componente dos, las variables NL, NS, influyeron positivamente en la expresión de un mayor diámetro de fruto con correlaciones positivas y altamente significativas de $r=0.979^{**}$ y $r=0.995^{**}$, respectivamente.

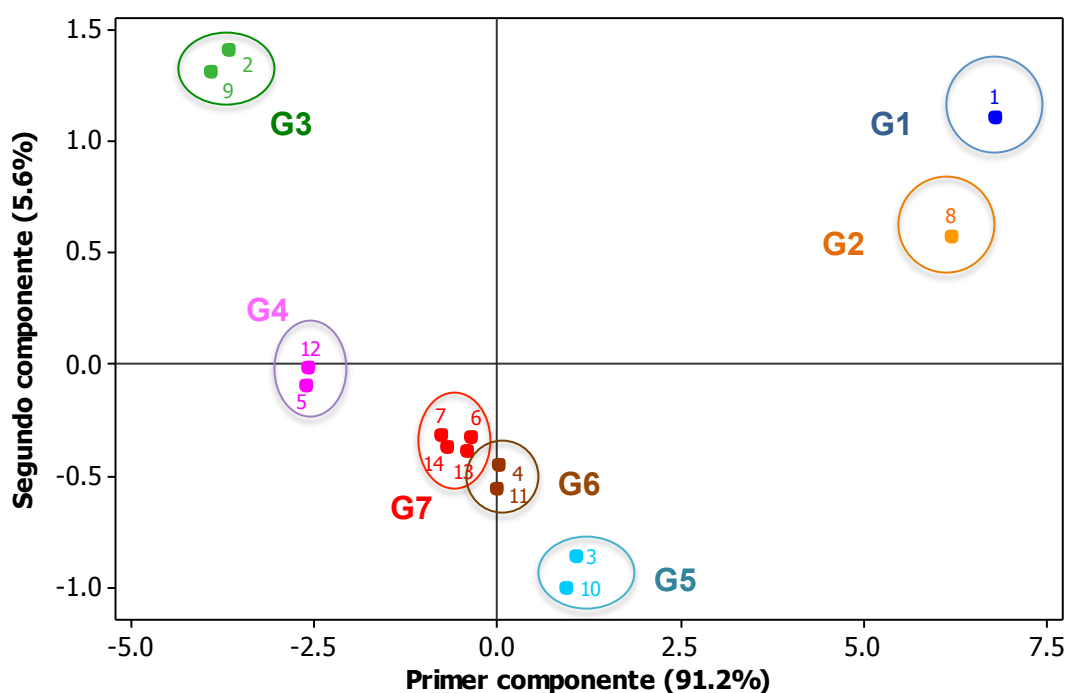


Figura 60. Distribución del agrupamiento de 14 tratamientos en base a 11 variables en dos componentes principales.

En la Figura 60, se observa la distribución de los grupos en los dos componentes principales, en donde en el primer componente principal del lado negativo de la gráfica aparecen los grupos G3, G4 y G7; los grupos G3 y G4 presentaron mayor cantidad del inóculo lo cual repercutió mayormente en un

bajo rendimiento por planta (1.19 y 1.29 kg PI⁻¹, respectivamente), el G7 el cual fue inoculado con TMV en etapa de anthesis aunque se aplicó 360°Agrocker en frecuencias de tres y siete días no hubo una respuesta positiva para el desarrollo del cultivo, repercutiendo en un bajo rendimiento del mismo (2.94 kg PI⁻¹), lo cual indica que las frecuencias de aplicación de 360°Agrocker en esta etapa fenológica tienen el mismo comportamiento aplicándolo cada 3 o 7 días. Las diferencias entre las frecuencias de aplicación de 360°Agrocker se observaron en la inoculación de TMV en etapa vegetativa, lo cual indicó que los tratamientos con aplicación de producto cada tres días agrupados en G5 fue el de mejor comportamiento, notándose un incremento en el rendimiento (3.54 kg PI⁻¹).

Finalmente, los grupos G1 y G2 contrastaron con todos los grupos (Gn), fueron los que expresaron un mejor comportamiento en las variables evaluadas en estos genotipos de tomate, notándose un mayor rendimiento por planta en el genotipo VILLA NARRO[®] (G1) (5.22 kg PI⁻¹) y una mayor altura de planta en el genotipo SofiMely[®] (G2) (213.45 cm).

En el segundo componente principal nuevamente nos separó los grupos G1 y G2 estos fueron testigos libres de TMV, y G3 y G4 los cuales involucran inoculación del TMV sin aplicación de 360°Agrocker, separándolos del resto de los grupos que fueron inoculados con TMV y tratados con el producto 360°Agrocker G7, G6 y G5.

Determinar el potencial de transmisión del TMV de planta a semilla y de semilla a planta.

Transmisión de TMV de planta a semilla

En la prueba de transmisión de TMV de planta a semilla, se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre tratamientos para la lectura

de ELISA en semilla (Cuadro 38). El coeficiente de variación fue bajo con un valor de 10.99 %.

Las semillas obtenidas de los frutos de plantas inoculadas con TMV, independientemente si se trataron con 360°Agrocker, resultaron positivo al virus en la prueba de ELISA, ya que se obtuvieron absorbancias mayores a 0.292, el cual corresponde al control negativo. Las semillas obtenidas de plantas libres de TMV en los tratamientos T1 y T8, resultaron negativo al virus en la prueba ELISA, con absorbancias de 0.099 y 0.115, respectivamente (Cuadro 39).

Cuadro 39. Comparación de medias para lecturas de densidad óptica de la prueba ELISA en semillas de dos genotipos de tomate.

VILLA NARRO®		SofiMely®	
Tratamiento	Densidad óptica	Tratamiento	Densidad óptica
T2	0.730 ⁺ ab	T9	0.762 ⁺ a
T5	0.705 ⁺ abc	T12	0.751 ⁺ a
T4	0.663 ⁺ abc	T14	0.673 ⁺ abc
T7	0.617 ⁺ abc	T11	0.636 ⁺ abc
T6	0.604 ⁺ abc	T13	0.605 ⁺ abc
T3	0.583 ⁺ bc	T10	0.567 ⁺ c
T1	0.099 d	T8	0.115 d
Tukey (0.05)	0.16	Tukey (0.05)	0.16

⁺=Positivo a TMV \geq 0.292; T1= VILLA NARRO® libre de TMV; T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días. T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Los tratamientos con inoculación de TMV y no tratados con 360°Agrocker fueron los que mostraron mayores densidades ópticas en la semilla, sin embargo, la inoculación de TMV en etapa vegetativa en ambos genotipos T9 y T2, fueron los que mostraron mayor absorbancia en la semilla (0.762 y 0.730, respectivamente) esto significó un incremento del 60 y 61.68% respectivamente, de cantidad viral en la semilla (Cuadro 40).

Cuadro 40. Cantidad viral de TMV en semilla, expresado en porcentaje en dos genotipos de tomate.

VILLA NARRO®		SofiMely®	
Tratamiento	(%) de cantidad de TMV	Tratamiento	(%) de cantidad de TVM
T2	60.00	T9	61.68
T5	58.58	T12	61.12
T4	55.96	T14	56.61
T7	52.67	T11	54.09
T6	51.66	T13	51.74
T3	49.91	T10	48.50

T2= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En los tratamientos inoculados con TMV en etapa vegetativa y con aplicación del producto nanoparticulado cada tres días, T3 y T10 resultaron en menores absorbancias 0.583 y 0.567, respectivamente, lo que significó 49.91 y 48.5 %

respectivamente, de cantidad viral en semilla (Cuadro 40). Esto indica que cuando se realizó la inoculación de TMV en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada tres días, se redujo la cantidad viral en semilla de 10.09% en VILLA NARRO® (T3) y 13.18% en SofiMely® (T10), con respecto a los tratamientos sin aplicación de 360°Agrocker T2 y T9, respectivamente (Cuadro 40).

Los resultados obtenidos indican que el TMV se mantuvo en la semilla a pesar de la desinfección con hipoclorito de sodio al 10%. Pudiera el virus estar infestando la semilla a través del endospermo. Jones *et al.* (2014) y Subramanya (2013), mencionan que TMV puede permanecer en el endospermo de la semilla de tomate hasta por 9 años.

Hay una gran cantidad de artículos de investigación, que respaldan la visión de que la transmisión de TMV se transporta como semilla transmitida externamente, principalmente en tomate y chile en varios países y ha sido confirmada por una extensa prueba serológica. Sin embargo, Hutting y Rast (1995) informaron que el TMV en la semilla de tomate se localiza en la cubierta de la semilla y en el endospermo. Algunos virus como BSMV y TMV infectan el endospermo (Carroll, 1972).

Las conexiones citoplasmáticas entre la planta madre infectada, la flor y la semilla en desarrollo, pueden influir en la infección de la semilla. Cuanto mayor sea la infección de la semilla embrionaria, mayor será el tamaño o el número de conexiones citoplasmáticas. Dado que las hortalizas desarrollan conexiones citoplasmáticas con mayor frecuencia que los cereales, el porcentaje de transmisión de semillas de virus en las hortalizas es mayor que en los cereales (Subramanya, 2013).

En el proceso de desarrollo de la semilla, las cantidades de carbohidratos se transfieren a la semilla como reserva de alimentos. Como existe evidencia de que el movimiento del virus en el floema está correlacionado con el transporte

de carbohidratos (Hull, 2002; Agrios, 2008), se esperaría que los virus que ocurren en altas concentraciones en el floema como TMV, se muevan en cantidades considerables hacia las semillas que tienen una conexión vascular con la planta madre, donde se acumularían a medida que aumentaran las reservas de alimentos (Bennett, 1969). Se ha demostrado que el virus *Beet curly top virus* se encuentra en concentraciones relativamente altas en el perispermo de semillas de plantas de remolacha azucarera infectas (Bennett y Esau, 1936). Taylor *et al.*, (1961) y Broadbent (1965) informaron que el *Tobacco mosaic virus* se encuentra en un pequeño porcentaje en el endosperma de semillas de plantas de tomate infectadas, pero no en los embriones.

Los intentos de tratar la semilla de maneras que deberían inactivar el virus externo no han reducido el porcentaje que contiene virus demostrable (Harrison, 1935b y Bancroft, 1959). Las partículas de TMV son extremadamente estables y retienen la infectividad durante décadas (Hwang *et al.*, 1994). El TMV puede permanecer activo en la semillas durante períodos que van desde unos pocos días hasta unos pocos años. John y Sova (1955) afirman que las semillas de tomate cosechadas de plantas enfermas con TMV en 1950, 1951 y 1952, y almacenadas en bolsas en almacenamiento común, retuvieron el virus en 1953 sin evidencia de una gran pérdida de virus en el almacenamiento. Alexander (1960) descubrió que, aunque la cantidad de virus de TMV asociada con la semilla de tomate disminuyó rápidamente después de 1 año de almacenamiento, podría recuperarse después de 3 años.

Transmisión de TMV semilla a plántula

Se observaron síntomas de TMV en algunas plántulas obtenidas de semilla infectada con el virus; la sintomatología del virus en plántulas de tomate fueron un ennegrecimiento en las venas de los folíolos, elongación y reducción del tamaño de las hojas y clorosis general en la plántula (Figura 61 y 62). La

sintomatología de TMV observada en las plántulas fue corroborada con una prueba de ELISA, la cual resultó positivo a TMV.



Figura 61. Plántulas de tomate variedad SofiMely[®]. A la izquierda se observa una plántula sana libre de TMV y a la derecha una plántula infectada con TMV.



Figura 62. Plántulas de tomate variedad VILLA NARRO[®]. A la izquierda se observa una plántula sana libre de TMV y a la derecha una plántula infectada con TMV.

En el genotipo VILLA NARRO[®], solo la inoculación en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker (T2) resultó en un 45% de transmisión de TMV semilla-plántula (Cuadro 41). La inoculación en etapa de antesis no resultó en transmisión de TMV, de la misma manera los tratamientos con aplicación de 360°Agrocker resultaron en 0% de transmisión de TMV.

Cuadro 41. Porcentaje de transmisión de TMV semilla-plántula en el genotipo VILLA NARRO[®].

Tratamiento	No. De Plántulas	No. De plántulas sintomáticas	Densidad óptica	Resultado (+ / -)	(%) de plántulas infectadas
T1	20	1	0.211	-	0
T2	20	9	0.365	+	45
T3	20	7	0.289	-	0
T4	20	6	0.293	-	0
T5	20	8	0.319	-	0
T6	20	4	0.291	-	0
T7	20	4	0.272	-	0

(+)=Positivo a TMV ≥ 0.360 ; (-) Negativo a TMV < 0.359 T1= VILLA NARRO[®] libre de TMV; T2= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T3= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T4= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T5= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T6= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T7= VILLA NARRO[®] inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

En el genotipo SofiMely[®], la inoculación de TMV en etapa vegetativa (T9) y antesis (T12) y sin aplicación de 360°Agrocker, resultaron en transmisión de TMV semilla-plántula, en un 55 y 40% respectivamente (Cuadro 42). Los tratamientos con aplicación de 360°Agrocker resultaron en 0% de transmisión de TMV.

Cuadro 42. Porcentaje de transmisión de TMV semilla-plántula en el genotipo SofiMely®.

Tratamiento	No. De Plántulas	No. De plántulas sintomáticas	Densidad óptica	Resultado (+ / -)	(%) de plántulas infectadas
T8	20	1	0.294	-	0
T9	20	11	0.377	+	55
T10	20	5	0.233	-	0
T11	20	6	0.283	-	0
T12	20	8	0.383	+	40
T13	20	6	0.265	-	0
T14	20	4	0.243	-	0

(+)=Positivo a TMV ≥ 0.360 ; (-) Negativo a TMV < 0.359 T8= SofiMely® libre de TMV; T9= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa sin aplicación de 360°Agrocker; T10= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días; T11= SofiMely® inoculado en etapa vegetativa y aplicación de 360°Agrocker cada 7 días; T12= SofiMely® inoculado en etapa de antesis sin aplicación de 360°Agrocker; T13= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación de 360°Agrocker cada 3 días. T14= SofiMely® inoculado en etapa de antesis y aplicación cada 7 días.

Los resultados obtenidos en la prueba de ELISA en semillas, indican que todos los tratamientos excepto los tratamientos absolutos libres de TMV portaron el virus, sin embargo, no en todos los tratamientos se transmitió el virus TMV a la plántula. La presencia de virus en una semilla (ya sea en la cubierta de la semilla, cotiledones, embrión) no siempre conduce a la infección de las plántulas (Subramanya, 2013).

Los virus transmitidos por semillas se encuentran en diferentes tejidos de semillas y pueden ubicarse en el embrión, los tejidos del endospermo (embrionario) o, en algunos casos, solo en las capas de semillas (no embrionarias) (Neergaard 1979). La capacidad de invadir embriones y transmitirse a través de la semilla está determinada no solo por el virus o el huésped. La resistencia de los gametos a la infección por virus también se ha implicado como uno de los factores. Medina y Grogan (1961) informaron de tales resistencias en los cultivares de frijoles Red Mexican y Idaho

Refugee, que eran resistentes al BCMV no se estableció la transmisión de semillas cuando se polinizaron de cultivares susceptibles infectados. En los embriones resistentes, aunque el virus se introdujo en los óvulos, no pudo infectar pero tuvo éxito en los susceptibles (Neergaard 1977).

En ambos genotipos VILLA NARRO[®] y SofiMely[®] se presentó mayor porcentaje de transmisión de TMV cuando fueron inoculados con el virus en etapa vegetativa. La variación en la tasa de transmisión de semillas también puede deberse a la etapa en que la planta se infectó. Se ha informado de un alto porcentaje de transmisión resultante de una infección temprana de *Barley stripe mosaic virus* en cebada (Singh *et al.*, 1960), y del virus *Tobacco ringspot virus* en la soja (Athow y Bancroft, 1959).

La infección de las plantas antes de la floración conduce a una infección embrionaria que resulta en la transmisión máxima de semillas (Schippers 1963). Por ejemplo, en Columbia, la transmisión de semillas de BCMV en el cultivar de frijol Similac fue 40, 9 y 0% y 41.8, 2.8 y 10.1% en el cultivar Pubbele Witte, cuando se inoculó a los 10, 20 y 30 días después de la siembra, respectivamente (Morales y Castano 1987). De manera similar, se registró una transmisión de SMV del 18 al 19% en semillas de soja cuando se inoculó a las 3-4 semanas y solo del 3-4% al inocular a las 9-10 semanas después de la siembra (Bowers y Goodman, 1979; Irwin *et al.*, 2000). En el mismo cultivo, TRSV se transmitió hasta el 100% a través de semillas de plantas infectadas antes de la floración, pero el porcentaje disminuyó cuando se infectó antes o inmediatamente después de la floración (Athow y Bancroft, 1959).

En la India, la transmisión de la infección por ULCV en semillas de frijol negro (*Vigna mungo*) fue del 68% cuando se inoculó plantas de 10 días de edad. Posteriormente, la tasa de transmisión de semillas disminuyó a 46, 22 y 10% en plantas inoculadas de 20, 30 y 40 días, respectivamente. El virus no pudo transmitirse en semilla cuando se inocularon plantas de 50 días (Dubey y

Sharma 1985). Se notó una tendencia similar con *Cowpea banding mosaic virus* (CpBMV) y *Cowpea chlorotic spot viruses* (CpCSV) cuando se inoculó en plantas de frijol chino de 10 días de edad en condiciones de campo, con una transmisión de semillas del 18-25% y del 15-20%, respectivamente.

Por otro parte, la cantidad de transmisión de TMV varía mucho entre genotipos, el genotipo SofiMely[®] fue el que presentó mayor transmisión de TMV que el genotipo VILLA NARRO[®]. Cuando se han comparado las tasas de transmisión de semillas de plantas individuales, se han encontrado diferencias bastante amplias. Las diferencias en las tasas de transmisión del virus *Barley stripe mosaic virus* en cebada se asociaron con diferentes variedades (McNeal y Afanasiev, 1955; Singh et al., 1960). Los factores de resistencia varietal pueden estar involucrados en esta variación. Clinch y Loughnane (1948), encontraron semillas amarillas de remolacha azucarera transmitidas en 47.5% de la semilla de una línea de remolacha, pero no en otras líneas. Sin embargo, Nikolic et al. (1973) informó una baja incidencia de transmisión de semillas de este virus en las variedades de remolacha azucarera. Grogan y Bardin (1950) encontraron que el virus del mosaico de la lechuga se transmitía constantemente a través de la semilla en porcentajes más altos en algunas variedades que en otras.

El *Tomato black ring virus* (TBRV) se transmitió al 5% en *Rubus idaeus* pero llegó hasta el 100% en *Cerastium vulgatum*, *Fumaria officinalis*, *Myostis arvensis* y *Polygonum persicaria* (Lister y Murrant 1967). Las tasas de transmisión de semillas de *Broad bean stain virus* (BBSV) variaron entre 0.2 y 32% en 19 genotipos de lentejas (Makkouk y Kumari 1990; Kumari et al. 1996). Incluso, Al-Khalaf et al. (2002) informaron la variación en la transmisión de semillas de BBSV en lentejas según la variabilidad del genotipo y el tamaño de las semillas.

Una variación similar en la transmisión de semillas entre diferentes cultivares fueron reportados para otros virus como SMV (Kendrick y Gardner, 1924; Ross,

1961; Kennedy y Cooper, 1967), LMV (Fegla *et al.*, 1983), BCMV (Agarwal *et al.* 1979), CpAMV (Ladipo, 1977; Ata *et al.* 1982), PSbMV (Musil *et al.*, 1983), *Brome mosaic virus* (BMV) (Von Wechmar *et al.*, 1984), CMV (Davis y Hampton, 1986), AMV (Frosheiser, 1974), *White clover cryptic virus* (Boccardo *et al.*, 1985; Natsuaki *et al.*, 1986), *Alfalfa cryptic virus M* (Boccardo *et al.*, 1983; Natsuaki *et al.*, 1984), BgMV (Varma *et al.*, 1992), TYMV (De Assis Filho y Sherwood, 2000) y CMV (Gillaspie *et al.*, 1998a, b). El efecto de la planta huésped sobre la transmisión del virus a las semillas está relacionado principalmente con su susceptibilidad o resistencia específicas virus / cepa (Subramanya, 2013).

La infección de plántulas de tomate por TMV transportado con la semilla ocurre durante y después de la germinación (Taylor *et al.*, 1961), y puede ocurrir, al menos en parte, porque el virus de la cubierta de la semilla se transfiere mecánicamente a la plántula cuando se manipula.

De acuerdo a Dombrovsky y Smith (2017) el comercio mundial de semillas ha contribuido a la transmisión y diseminación de brotes de nuevas enfermedades en diferentes países, particularmente de virus pertenecientes al género Tobamovirus, entre ellos el TMV.

CONCLUSIONES

De los resultados antes descritos se concluye lo siguiente:

- En el análisis fitosanitario de la semilla a utilizar, el genotipo VILLA NARRO® fue el que presentó la mayor incidencia de hongos 6.33%.
- Se detectaron 5 géneros de hongos, *Fusarium* y *Alternaria* spp fueron los de mayor porcentaje de incidencia 15.83 y 7.5 %, respectivamente.
- Se identificaron los géneros *Xanthomonas* y *Clavibacter* spp. De los cuales *Xanthomonas* spp presentó mayor porcentaje de incidencia 1%.
- El medio de cultivo PDA mostró mayor proliferación de patógenos, 9.33% de incidencia.
- No se detectó en la semilla utilizada los virus que constituyen el grupo Tobamovirus con los anticuerpos utilizados.
- Considerando que los patógenos detectados no se transmitieron en la prueba de germinación, la semilla analizada de las variedades SofiMely® y VILLA NARRO®, se consideraron potencialmente sanas y aptas para la siembra.
- La mayor altura de planta se presentó en el genotipo SofiMely® con una altura de 213.5 cm. El genotipo VILLA NARRO® presentó el mayor peso por fruto, diámetro de fruto, longitud de fruto, número de lóculos por fruto, rendimiento por planta y número de semillas 220.66 g, 85.78 mm, 73.75 mm, 6.72, 5.22 kg planta⁻¹ y 197.66, respectivamente.
- La inoculación del TMV en etapa vegetativa afectó drásticamente la altura de planta en los dos genotipos, 34.6 % en el genotipo VILLA NARRO® y 43.8% en el genotipo SofiMely® y, así como el número de hojas 29.95 y 26.08 %, el peso fresco de planta en 51.31 y 51.86 %, el peso seco de planta en 52.82 y 55.05 %, el peso de fruto en 70.40 y

71.63 %, el rendimiento por planta en 76.25 % y 74.83 % y el número de semillas por fruto en 67.46 y 65.81 % respectivamente.

- La aplicación de 360°Agrocker cada tres días a una dosis de 3.33 mL L⁻¹ en los dos genotipos de tomate VILLA NARRO® y SofiMely®, inoculados en etapa vegetativa, registró resultados potenciales, considerando que evitó hasta un 82.8 y 78.6 % la disminución de la altura de plantas, 85.68 y 84.5 % el número de hojas, 85.55 y 86.39 el peso fresco de planta, 93.62 y 92.65 % el peso seco de planta, 45.79 y 48.45 % el peso de fruto, 70.5 y 75.06 % el rendimiento por planta y el 49.03 y 52.89 % el número de semillas respectivamente.
- En los tratamientos inoculados en etapa vegetativa y sin aplicación de 360°Agrocker, durante el desarrollo del cultivo hasta los 130 días después del trasplante, el inóculo se incrementó 30.14 % en el genotipo VILLA NARRO® y 25.43% en SofiMely®, cuando se inoculó en etapa de antesis el inóculo incremento 29.43 y 23.41%, respectivamente.
- En los tratamientos inoculados en etapa vegetativa y con aplicación de 360°Agrocker cada tres días a una dosis de 3.33 mL L⁻¹, se observó una reducción máxima del inóculo en 26.73 y 19.38% en los genotipos VILLA NARRO® y SofiMely®, respectivamente.
- En este estudio, 360°Agrocker constituido por extractos vegetales nanoparticulados, tuvo la capacidad de disminuir la cantidad de partículas virales activas pero no las redujo a niveles no detectables.
- La presencia de TMV en la semilla de todos los tratamientos, resultaron positivos al virus en la prueba de ELISA, exceptuando los testigos libres de TMV, resultaron negativo a TMV en semilla.
- En la transmisión de semilla-plántula, el genotipo VILLA NARRO® presentó una transmisión del 45% de TMV sólo cuando se inoculó el virus en etapa vegetativa y en el genotipo SofiMely se transmitió TMV

cuando se inoculó en etapa vegetativa y en antesis, con un porcentaje de transmisión del 55 y 40%, respectivamente.

- Los tratamientos con aplicación de 360°Agrocker® en ambos genotipos VILLA NARRO® y SofiMely®, resultaron en 0% de transmisión de TMV.

LITERATURA CITADA

- Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT and Beachy RN. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743. DOI: 10.1126/science.3457472
- Adams DB, Kuhn CW. 1977. Seed transmission of peanut mottle virus. *Phytopathology* 67:1126– 1129
- Adams P and Ho LC. 1993. Effects of environment on the uptake and distribution of calcium in tomato and on the incidence of blossom-end rot. *Plant and Soil*. 154: 127-132.
- Agrios GN. 2008. *Fitopatología* 5ª ed Elsevier Academic Press. 948p.
- Agrios G N. 2004. *Fitopatología*. Segunda edición. Ed. Limusa México. 838 p.
- Agrios G. 1998. *Fitopatología*; 3ª edición; Editorial Limusa, México.
- Alexander LJ. 1960. Inactivation of tobacco mosaic virus from tomato seed. *Phytopathology* 50:627.
- Al-Khalaf M, Makkouk KM, Kasem AH. 2002. Seed transmission of broad bean stain virus in lentil with respect to genotype variability and seed size. *Arab J Plant Protect* 20:106–110
- Agarwal VK, Nene YL, Beniwal SPS, Verma HS. 1979. Transmission of bean common mosaic virus through urdbean (*Phaseolus mungo* L.) seeds. *Seed Sci Tech- nol* 7:103–108
- Aguado AMM, Cavada LSF, Cambra AM, Escriu PF y Artiaga LMS. 2014. El virus del mosaico del tomate Tomato mosaic virus (ToMV). *Centro de Sanidad y Certificación Vegetal*. Aragon, España. 4 p.
- Ahoonmanesh A and Shalla TA. 1981. Feasibility of crossprotection for control of *tomato mosaic virus* in fresh market field-grown tomatoes. *Plant Dis*. 65: 56-58.
- Akamatsu H, Itoh Y, Kodama M, Otani H and Khomoto K. 1997. AAL-Toxin-Deficient Mutants of *Alternaria alternata* Tomato Pathotype by

Restriction Enzyme-Mediated Integration. The American Phytopathological Society. 8(9): 967- 972

Ali A y Kobayashi M. 2010. Seed transmission of Cucumber mosaic virus in pepper. J Virol Methods. 163(2): 234-7 doi: 10.1016/j.jviromet.2009.09.026. Epub 2009 Oct 9

Alghuthaymi M, Almoammar H, Rai M, Said-Galiev E, & Abd-Elsalam K. 2015. Myconanoparticles: synthesis and their role in phytopathogens management. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 29(2): 221-236.

Ata AEA, Allen DJ, Thottappilly G, Rossel HW. 1982. Variation in the rate of seed transmission of cow- pea aphid borne mosaic virus in cowpea. Trop Grain Legume Bull 25:2-7

Athow KL, Bancroft JB. 1959. Development and trans- mission of tobacco ring- spot virus in soybean. Phy- topathology 49:697-701

Aparicio V, Belda J, Casadp E, García M, Gomez V, Lastres J, Mirasol E, Roldan E, Saez E, Sanchez A and Torres A. 1998. Plagas y enfermedades en cultivos hortícolas de la provincia de almeria. Junta de Andalucía. Sevilla. 356p.

Apodaca SM, Carrillo AJ y Cruz OE. 1998. Peca bacteriana *In* In. Cruz JO, García RE, Carrillo FA. (eds) Enfermedades de las hortalizas. Universidad Autónoma de Sinaloa. Sinaloa, México.

Agarwal VK, Nene YL, Beniwal SPS. 1976. Influence of bean common mosaic virus infection on the flower organelles, seed characters and yield of urdbean. Indian Phytopathol. 29:444-46. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2005.01197.x

Aranmbu J y Galipienso L. 2005. First report in Spain of a variant of Tomato mosaic virus (ToMV) overcoming the Tm-2² resistance gene in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Pathology. 54, 566

Arteaga L P R, Albarrán M L, León G S and León G G. 2016. Effects of NBeylax functionalized TiO₂ nanoparticle administration on the DNA of cancer cells. ECORFAN Journal-Republic of Guatemala 2-2: 24-28.

ASERCA. 1998. Revista Claridades Agropecuarias. Revista mensual publicada por La Dirección General de Operaciones Financiaras de ASERCA. Vol. 62. 1-28.

- Aysan Y, Yildiz N and Yücel F. 2004. Identification of *Pseudomonas viridiflava* on tomato by traditional methods and enzyme-linked immunosorbent assay. *Phytoparasitica*. 32:146-153.
- Auffan M, Rose J, Bottero JY, Lowry GV, Jolivet JP, Wiesner MR. 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective, *Nat. Nanotechnol.* 4: 634–664. DOI: 10.1038/nnano.2009.242.
- Bautista MN y Alvarado LJ. 2006. Producción de Jitomate en Invernadero. Colegio de Postgraduados. Texcoco, edo México. 265 p.
- Barik TK, Sahu B, Swain V. 2008. Nano silica from medicine to pest control. *Parasitol Res* 103:253–258.
- Barnett HL y Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect Fungi. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Bawden FC and Kassanis B. 1950. Some effects of host nutrition on the susceptibility of plants to infection by certain viruses. *Ann. Appl. Biol.* 37, 46-57.
- Blancard D. 1992. Enfermedades del tomate. Madrid: Mundiprensa. 212p.
- Blancard D. 2012. Tomato Diseases. Second Edition. Academic Press.
- Brierley P, Smith FF, and Doolittle S P. 1955. Some hosts and vectors of tomato aspermy virus. *Plant Disease Repr.* 39, 152-156.
- Bradbent L. 1961. The epidemiology of tomato mosaic: A review of the literature. Rep. Glasshouse Crops Res. Inst. 96p.
- Broadbent L. 1964. The epidemiology of *tomato mosaic virus*. The effect of *TMV* on tomato fruit yield and quality under glass. *Ann. Appl. Biol.* 54: 209-224.
- Broadbent L. 1965. The epidemiology of tomato mosaic. VIII. Virus infection through tomato roots. *Ann. appl. Biol.* 55, 57.
- Broadbent L. 1976. Epidemiology and control of *Tomato mosaic virus*. *Annum. Rev. Phytopathol* 14: 75-97.

- Broadbent and Cooper J. 1964. The epidemiology of tomato mosaic. 6. The influence of tomato mosaic virus on root growth and the annual pattern of fruit production. *Ann. appl. Biol.* 54, 31.
- Broadbent L y Winsor GW. 1964. The epidemiology of tomato mosaic. V. The effect on TMV-infected plants of nutrient foliar sprays and of steaming the soil. *Ann. Appl. Biol.* (54): 23-30.
- Bellows TS, Perring TM, Gill RJ, Headrick DH. 1994. Description of a species of Bemisia (Homoptera: Aleyrodidae). *Annals of the Entomological Society of America* 87: 195-206.
- Bennett CW. 1969. Seed Transmission of Plant Viruses. Volume 14, 221-261.
- Barnett HL and Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect Fungi. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society
- Bennett CW, and Esau K. 1936. Further studies on the relation of the curly top virus to plant tissues. *J. Agr. Res.* 53, 595.
- Beniwal SPS, Chaubey SN. 1984. Internal seed borne nature of Urdbean leaf crinkle virus in urdbean seed. *Seed Res* 12(2):8–10
- Beniwal SPS, Chaubey SN, Bharatan N. 1980. Presence of urdbean leaf crinkle virus in seeds of mungbean germplasm. *Indian Phytopathol* 33:360–361
- Bernabe A. y Solis V. 1999. Evaluación del rendimiento, calidad y precocidad y vida de anaquel de 21 genotipos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mil.) en invernadero en Chapingo (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma de Chapingo México
- Betancourt R, Reyes P, Puente B, Ávila C, Rodríguez O, Cadenas G, Lira R, & García L. 2014. Synthesis of copper nanoparticles by thermal decomposition and their antimicrobial properties. *Journal of Nanomaterials*, 1-5.
- Berenguer JJ. 2006. Material didáctico del primer Diplomado Internacional sobre Horticultura Protegida. Intagri, México.
- Bernal L, Pesca L, Rodríguez D, Cantor F and Cure JR. 2008. Plan de muestreo directo para *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Hemiptera: Aleyrodidae) en cultivos comerciales de tomate. *Agron. Colombiana.* 26: 266-276.

- Bharatan N, Reddy DVR, Rajeswari R, Murthy VK, Rao VR. 1984. Screening of peanut germplasm lines by enzyme linked immunosorbent assay for seed transmission of peanut mottle virus. *Plant Dis* 68:757–758
- Boccardo G, Lisa V, Milne RG. 1983. Cryptic virus in plants. In: Company RW, Bishop DHL (eds) *Double- stranded RNA 'viruses'*. Elsevier, Amsterdam, pp 425–430
- Boccardo G, Milne RG, Luisoni E, Lisa V, Accotto GP. 1985. Three seedborne cryptic viruses containing double stranded RNA isolated from white clover. *Virology* 147:29–40
- Boyle JS. 1994, "Abnormal ripening of tomato fruit", *Plant Disease*, 78 (10): 936-944.
- Bowers GR Jr y Goodman RM. 1979. Soybean mosaic virus: infection of soybean seed parts and seed transmission. *Phytopathology* 69:569–572
- Bowen P, Menzies J, Ehret D, Samuel L, and Glass DM. 1992. Soluble silicon sprays inhibit powdery development in grape leaves. *Journal of American society of Horticultural Science*. 117: 906-912.
- Borboa J, Rueda, E, Acedo E, Ponce, J, Cruz M, Juárez O & García A. 2009. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in Tomato of the state of Sonora, México. *Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 319-326.
- Brunt AA. 1986. Tomato mosaic virus. Pages 181- 204 in: *The Plant Viruses*, Vol 2. M. H. V. Van Regenmortel and H. Fraenkel-Conrat, eds. Plenum Press, New York.
- Carlton W M, Braun E J, and Gleason M L. 1998. Ingress of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* into tomato leaves through hydathodes. *Phytopathology* 88:525-529.
- Cabrera D, Sosa R, Portal O, Alburquerque Y, González JE, Hernández R. 2009. Alterations Induced by Papaya Ringspot Potyvirus on Chlorophyll Content in Papaya (*Carica papaya* L.) Leaves. *Fitosanidad*. 2009;13:125-126
- Castellanos J Z. 2011. Manual de producción de tomate en invernadero. Celaya, Guanajuato, México: Intagri, S. C. 456 p.

- Castresana L. 1986. *Encarsia tricolor* Foerster (*Hymenoptera, Aphelinidae*) en la lucha biológica contra la “mosca blanca” de los invernaderos (*Trialeurodes vaporariorum*, Westwood). (Doctoral dissertation, Tesis Doctoral, Escuela Técnica Superior. de Ingenieros Agrónomos de Madrid (ETSI), Universidad Politécnica de Madrid, Madrid
- Cadenas JF, Gonzáles VJ, Hernández JM. 2003. El cultivo protegido del tomate. Pp 481-537. In Técnicas de producción en cultivos protegidos. Ediciones Agrotécnicas. España. 776 p.
- Caldwell J. 1959. Persistence of tomato aucuba mosaic virus in dried leaf tissue. *Xature, Lond.*, 183, 1142.
- Caldwell I. 1952. Some effects of a plant virus on nuclear division. *Ann. Appl. Bioi.* 39:98-103
- CABI. 1997. Quarantine Pest for Europe. 2nd edition. Edited by Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Holderness M. CABI International, Wallingford, UK.
- Carroll TW. 1972. Seed transmissibility of two strains of barley stripe mosaic virus. *Virology* 48:323-36
- Carrillo J, Meléndez H, Puente B, Padrón G, Ledezma A, & Betancourt R. 2016. Composite based on poly (acrylic acid co itaconic acid) hydrogel with antibacterial performance. *Polymer Composites.* 39(1): 171-180.
- Chao SHL and Choi H-s. 2005: Method for providing enhanced photosynthesis. Korea Research Institute of Chemical Technology, Jeonju, South Korea. Bulletin 10pp
- Chen H, Seiber JN, Hotze M. 2014. ACS Select on Nanotechnology in Food and Agriculture: A Perspective on Implications and Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 62(6): 1209–1212. DOI: 10.1021/jf5002588.
- Chen ZC, Antoniow RF y Lin JF. 1991. Effect of pokeweed antiviral protein (PAP) on the plant viruses. *Plant Pathology.* 40 (4): 612-620 p. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02426.x>

- Chessin M. 1958. Light quality and photoreactivation of plants and viruses. *Ann. Appl. Biol.* 46, 388-392.
- Cioffi N, Torsi L, Ditaranto N, Tantillo G, Ghibelli L, Sabbatini L, Bleve-Zacheo T, D'Alessio M, Zamborin PG and Traversa E. 2005. Copper Nanoparticle/Polymer Composites with Antifungal and Bacteriostatic Properties. *American Chemical Society.* 17(21): 5255-5262 <https://doi.org/10.1021/cm0505244>
- Clinch PEM, and Loughnane JB. 1948. Transmission of a disease resembling virus yellows through the seed of sugar beet. *Nature.* 161: 28-29
- Clark MF, Flegg LC, Bar-Joseph M y Rottem S. 1977. The Detection of *Spiroplasma citri* by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Phytopath. Z.*, (92), 332-337.
- Cerkauskas R. 2005. Tomato Diseases: Bacterial Spot: *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* [en línea]. *Shanhua: AVRDC.* 2p. Consultado 1 julio 2013. Disponible
- Cranshaw WS. 2002. Manejo del psílido de la papa–tomate el cultivo de la papa. *Memorias del XI Congreso Nacional de Productores de Papa.* Septiembre 26–28, 2002. León, Guanajuato, México. p. 46–51.
- Crill P, Burgis DS, Jones JP and Strobel JW. 1973. Effect of tobacco mosaic virus on yield of fresh-market, machine-harvest type tomatoes. *Plant Dis. Rep.* 57: 78-81.
- Cornejo L. 2015. Nanociencia y Nanotecnología. Disponible: <http://nuevatecnologiasymateriales.com/metodos-de-sintesis-de-las-nano-particulas/> (Consulta, Julio 2018).
- Crowley NO. 1957. Studies on the seed transmission of plant virus diseases. *Aust. J. Biol. Sci.* 10: 449-64.
- Cruz, B. L. 2007. Calidad de semilla de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) por efecto de potenciales osmóticos, calcio y podas bajo condiciones de invernadero. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados “Campus Montecillo”, Texcoco, Estado de México, 195 p.
- Cordero GO. 2015. Caracterización de Líneas Avanzadas Extra Firmes de Larga Vida de Anaquel de Tomate (*Solanum lycopersicum* L) tipo Beef. Tesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 79p.

- Conti M, Gallitelli D, Lisa V, Iovisolo O, Martelli GP, Ragozzino A, Rana GL y Vovlas C. 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Mundi Prensa. Madrid.
- Cuppls DA, Louws FJ and Ainsworth T. 2006. Development and evaluation of PCR-based diagnostic assays for the bacterial spot and bacterial speck pathogens of tomato. *Plant Dis.* 90:451-458.
- Davidson EW, Segura BJ, Steele T y Hendrix DL. 1994. Microorganisms influence the composition of honeydew produced by the silverleaf whitefly, *Bemisia argentifolii*. *J. Insect. Physiol.* 40: 1069-1076.
- Davis RF, Hampton RO. 1986. Cucumber mosaic virus isolates seed-borne in *Phaseolus vulgaris*: serology, host pathogen relationships and seed transmission. *Phytopathology* 76:999–1004
- Davis M, Graves A, Vidaver A, y Harris R. 1984. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34, 107-117.
- Datta Gupta M, Summanwar AS (1980) The location of two mosaic viruses in cowpea seeds. *Seed Sci Technol* 8(2):203–206
- De León L, Silverio F, López MM, Rodríguez A. 2011. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a Seedborne Tomato Pathogen: Healthy Seeds Are Still the Goal. *Plant Disease* 95(11): 1328-1338.
- De Assis Filho FM, Sherwood JL. 2000. Evaluation of seed transmission of Turnip yellow mosaic virus and Tobacco mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Phytopathology* 90:1233–1238
- De Blas C. 1992. Estudios sobre técnicas de detección de virus y patógenos subvirales vegetales y búsqueda de resistencia al virus del mosaico del pepino (CMV) en germoplasma de pimiento. Tesis Doctoral. Universidad Complutense, Madrid.
- Desai, B. Kotecho, M. y Salunkhe, D. 1997. *Seeds handbook. Biology, production, processing and storage.* Ed Marcel Dekker. New York, U.S.A. the composition of nutrient solutions for hydroponic cropping: practical use. *Acta Hort.* 627 p.

- Denby LG y Wilks JM. 1963. The Effect of Tobacco mosaic virus on the yield of field Tomatoes as influenced by sprays of Milk and Dos. Canadian Journal of Plant Science. (43): 457- 461.
- DPVweb. 2012. Description of plant virus. <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno =17>. (Revisado agosto de 2018).
- Dombrovsky A and Smith E. 2017. Seed Transmission of Tobamoviruses: Aspects of Global Disease Distribution. Pp:234-260. In: Jose C. Jimenez-Lopez (ed.). Seed Biology. IntechOpen. 338p. DOI: 10.5772/intechopen.70244
- Dodson JB, Garbor P, Himmel P, Kao J, Stravato V, Watterson J y Wiebe W. 1997. Enfermedades del jitomate: guía práctica para agricultores, productores y comercializadores de semillas y asesores agrícolas. B. Garbor y Wiebe W. (eds). Seminis Vegetable Seeds. USA.
- Dubey GS, Sharma I (1985) Seed transmission of urdbean leaf crinkle virus. Seed Sci Technol 13(1):149–153
- Esquinas-Alcázar J, Nuez F. (1995). Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. El cultivo del tomate. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 13–42.
- EFSA. 2014. Scientific opinion on the pest categorisation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis et al. EFSA Journal, 12(6), 1-26
- EPPO/CABI (1997a) Materials of the EPPO/CABI Workshop on Safety and efficacy of biological control in Europe. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 27, 1–204.
- EPPO/CABI (1997b) Recommendations of the EPPO/CABI Workshop on Safety and Efficacy of biological control in Europe. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 27, 1–3.
- Economic Research Service (ERS) USDA. 2017. Vegetables and Pulses Yearbook Data. April 2017.
- Ekpo EJA, Saettler AW. 1974. Distribution pattern of bean common mosaic virus in developing bean seed. Phytopathology 64:269–270
- Erkan S. 1998. Tohum patolojisi – Ankara, Turkey, 275 p (In Turkish)

- FAS. USDA. 2016. GAIN Report Number MX6021. "Mexican Continues to Expand Greenhouse Tomato Production". Global Agricultural Information Network, 6/1/2016.
- FAO. 2017. FAOSTAT. Editado por FIRA "Panorama Agroalimentario. Tomate Rojo 2017. file:///Users/omar/Downloads/Panorama%20Agroalimentario%20Tomate%20Rojo%202017%20(1).pdf (Consulta, Diciembre 2017).
- Fegla GI, Shawkat ALB, Ramadan NAS (1983) Effect of infection date of lettuce mosaic virus on seed transmission, vegetative growth and certain contents of lettuce plants. Iraqi J Agric Sci 1:91–101
- Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura (FIRA). 2017. Panorama agroalimentario. Tomate Rojo 2017. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200635/Panorama_Agroalimentario_Tomate_Rojo_2016.pdf. (Consulta, Septiembre 2018).
- Fujishima A, Hashimoto K, and Watanabe T. 1999. TiO₂ photocatalysis: fundamentals and applications. BKC, Inc., Tokyo. Bulletin 16pp
- Flagg J and Fletcher JT. 1987. Studies of the epidemiology and control of tomato steam rot caused by *Didymella lycopersici*. Plant Pathol. 36: 361-366.
- Fletcher JT, MacNeill BH. 1971. Influence of environment, cultivar and virus strain on the expression of tobacco mosaic virus symptoms in tomato. Canadian Journal of Plant Science. 51(2):101-107. DOI: 10.4141/cjps71-022
- Fletcher JT. 1984. Diseases of greenhouse plants. London, UK, Longman. 351p.
- Francki RIB, Mossop DW and Hatta T. 1979. Cucumber mosaic virus. AAB. Online: <http://www.dpvweb.net/dpv/showadpv.php?dpvno=213>
- Frazer L. 2001. Titanium dioxide: Environmental white knight. Environmental Health Perspectives 109(4):174-177.
- Frazer JT. 2002. Two species of *Alternaria* causes early blight of potato (*Solanum tuberosum*) and tomato (*Lycopersium esculentum*), MS. Thesis. Cornell University, Ithaca, NY.

- Frosheiser FI. 1974. Alfalfa mosaic virus transmission to seed through alfalfa gametes and longevity in alfalfa seed. *Phytopathology* 64, 102-105.
- Fromme FD, Wingard SA y Priode CN. 1927. Ringspot of Tobacco: an infectious disease of unknown cause. *Phytopathology*. 17: 321-328
- Fakruddin Md, Hossain Z and Afroz H. 2012. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *Journal of Nanobiotechnology* 10:31.
- Garza L. 1985. Las hortalizas cultivadas en México, características botánicas. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 4 p.
- Garzón JA. 2003. Asociación de Paratrypanosoma cockerelli Sulc. con enfermedades en papa (*Solanum tuberosum*) y Tomate (*Lycopersicon lycopersicum* Mil. Ex Fawnl) en México. In: Avilés, G. M. A., Gálvez R. J. B. y Garzón T. J. A. (Eds). Memoria del Taller sobre Paratrypanosoma cockerelli Sulc. Culiacán, Sin., México. Primera Edición.
- Gajbhiye M, Kesharwani J, Ingle A, Gade A, Rai M. 2009. Fungus mediated synthesis of silver nanoparticles and its activity against pathogenic fungi in combination of fluconazole. *Nanomedicine* 5(4):282–286
- Galindo JA, Monreal C y Hernández C. 1980. Excreción de partículas del virus enanismo arbustivo del jitomate (Tomato bushy stunt virus). p 1. In: Resúmenes del IX Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Uruapan, Michoacán.
- George R. 1999. Vegetable seed production. 2nd edition; CABI Publishing. UK at the at the University Press, Cambridge. 328 p.
- Goswami A, Roy I, Sengupta S, Debnath N. 2010. Novel applications of solid and liquid formulations of nanoparticles against insect pests and pathogens. *Thin Solid Films* 519:1252–1257.
- González A. 2004. Instalaciones de Cultivo Protegido y Manejo Climático para Condiciones Tropicales. La Habana. Cuba.
- Godoy HH. 2002. Evaluación del equipo portátil HI 93706 DE Hanna Instruments Inc. para monitorear la nutrición de fósforo en planta y suelo. Memoria de residencia profesional. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 33. Roque, Celaya, Gto. México.

- Gibbs, A. y Harris, B. 1979. Plant virology. The principles. Edward Arnold. Great Britain. 292p.
- Gitaitis R, and Walcott R. 2007. The epidemiology and management of seedborne bacterial diseases. Annual Review of Phytopathology 45: 371-397.
- Ghormade V, Deshpande MV and Paknikar KM. 2011. Perspectives for nanobiotechnology enabled protection and nutrition of plants, Biotechnol. Adv. 29: 792–803.
- Gitaitis R, McCarter S, Jones JB. 1992. Disease control in tomato transplants produced in Georgia and Florida. Plant Disease, v.76, n.7, Pp: 651-656.
- Gillaspie AG Jr, Hajimorad MR, Ghabrial SA (1998a) Characterization of a severe strain of cucumber mosaic cucumovirus seed borne in cowpea. Plant Dis 82: 419–422
- Gillaspie AG Jr, Pappu HR, Jain RK, Rey MEC, Hopkins MS, Pinnow DL, Morris JB (1998b) Characteristics of a latent poty seed-borne in guar and of Guar green- sterile virus. Plant Dis 82:765–770
- Ghanekar AM, Schwenk FW. 1974. Seed transmission and distribution of tobacco streak virus in six cultivars of soybeans. Phytopathology 64:1 12-14
- Granval de Millán N. 1989. Elementos de mejoramiento genético de lechuga, aplicados a la producción de semillas. In: Curso Internacional en investigaciones y producción de semillas de hortalizas. 12-16 de diciembre de 1998. Santiago de Chile.
- Grogan RG, Bardin R. 1950. Some aspects concerning seed transmission of lettuce mosaic virus. Phytopathology 40:965
- Harrison AL.1935. NewYork (Geneva) Agr.Ezpt.Sta.Tech.Bull.236,3-19.
- Hausbeck MK, Bell J, Medina-Mora C, Podolsky R and Fulbright DW. 2000. Effect of Bactericides on Population Sizes and Spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on Tomatoes in the Greenhouse and on Disease Development and Crop Yield in the Field. The American Phythopathological Society. 90(1): 38-44.

- Hernández FA. 2005. Uso de las cubiertas flotantes para el control de virosis en la producción hortícola. Caso de estudio. Especialización en química aplicada. Centro de investigación en química aplicada (CIQA). Saltillo, Coah. 46 p.
<https://ciqa.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/548/1/Adalberto%20Hernandez%20Florentino.pdf>
- Hirai A y Wildman SG. 1969. Effect of TMV multiplication on RNA and protein synthesis in tobacco chloroplasts. *Virology*. 38(1): 73-82.
[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(69\)90129-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(69)90129-9)
- Ho LC. 1995 Environmental effects on the diurnal accumulation of ^{45}Ca by young fruit and leaves of tomato plants. *Ann. Bot.* 63, 281–288.
- Hoch HC, Provvidenti R. 1978. Ultrastructural location of bean common mosaic virus in dormant and germinating seeds of *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology* 68:327–330
- Huttinga H, Rast ATB. 1995. Tomato mosaic tobamovirus. In: Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L (eds) *Viruses of plants*. CAB International, Wallingford, pp 1302–1310
- Hull R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. Fourth Edition. Academic Press. London NW1 7BY, UK.
- Huerres P, Caraballo N. 1988. *Horticultura*. Ed. Pueblo y educación. La Habana, Cuba. 4-16 pp.
- Holden M y Tracey MV. 1948. The effect of infection with *Tobacco mosaic virus* on the levels of nitrogen, phosphorus protease and pectase in Tobacco leaves and on their response to fertilizers. *Biochem.* 43, 151-156.
- Hollings M, and Huttinga H. 1975. Tomato mosaic virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 156.
- Harrison BD, Wilson TM. 1999. Milestones in the research on tobacco mosaic virus. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 354:521–29.
- Hwang DJ, Roberts IM and Wilson MA. 1994. Assembly of tobacco mosaic virus and TMV-like pseudovirus particles in *Escherichia coli*. *Archives of Virology*. 9:543-558.

- International Committee on Taxonomy of viruses ICTV. 2018. Genus: Tobamovirus. On line: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus (Consulta, agosto, 2019).
- Irwin ME, Ruesink WG, Isard SA, Kampmeier GE. 2000. Mitigating epidemics caused by non-persistently transmitted aphid-borne viruses: the role of the pliant environment. *Virus Res* 71:185–211
- Ishibashi K and Ishikawa M. 2016. Replication of Tobamovirus RNA. *Annual Review of Phytopathology*. 54: 55-78. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080615-100217>
- Jaspars EMJ and Bos L. 1980. Alfalfa Mosaic Virus. *Descriptions of Plant Viruses*, vol. III, Cambrian News, Wales.
- Johansen E, Edwards MC, Hampton RO. 1994. Seed transmission of viruses - current perspectives. *Annual Review of Phytopathology*. 32:363-386
- Jones JB, Zitter TA, Momol TM, Miller SA. 2014. *Compendium of Tomato Diseases and Pest*. Second Edition. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 168 p.
- Jones JB Jr. 2008. *Tomato Plant Culture: In the Field, Greenhouse, and Home Garden*. Second Edition, CRC Press, Boca Raton, FL. 399 p.
- Jones JB, Lacy GH, Bouzar H, Stall RE and Schaad NW, 2004. Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper. *Systematic Applied Microbiology*, 27, 755–762.
- Jones JB, Stall RE, Zitter TA. 1991. *Compendium of tomato diseases*. Minnesota: APS press. 73p.
- Jones JB. 1997. Bacterial sport In: Jones JB, Jones JP, Stall RE, Zitter TA (Ed). *Compendium of tomato diseases*. St. Paul: America Phytopatological Society Press. 27 p.
- John CA y Sova C. 1955. *Phytopathology* 45,636.
- Juárez MA, De Alba RK, Zermeño GA, Ramírez H y Benavides MA. 2015. Análisis de crecimiento del cultivo de tomate en el invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 5: 943-954. <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n5/v6n5a3.pdf>

- Kalb T. 2005. Tobacco Etch Virus (TEV). Shanhua, Tainan, AVRDC - The World Vegetable Center. AVRDC Publication 05-640.
- Kalb T. 2004a. Tomato diseases: tomato mosaic virus (ToMV). Shanhua, Taina, AVRDC - The World Vegetable Center. AVRDC Publication 04-609.
- Klug A. 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 354(1383): 531–535. doi:10.1098/rstb.1999.0404
- Knapp S. 2002. Solanum section Geminata. *Fl Neotrop* 84:1–405
- Kendrick JB, Gardner MW. 1924. Soybean mosaic: seed transmission and effect on yield. *J Agric Res* 27:91–98
- Kennedy BW, Cooper RL. 1967. Association of virus infection with mottling of soybean seed coats. *Phytopathology* 57:35–37
- Kole C, Kole P, Randunu KM, Choudhary P, Podila R, Ke PC, Rao AM and Marcus RK. 2013. Nanobiotechnology can boost crop production and quality: first evidence from increased plant biomass, fruit yield and phytomedicine content in bitter melon (*Momordica charantia*) *BMC Biotechnol.* 13, 37.
- Koike ST, Gladders P y Paulus AO. 2007. *Vegetables Diseases*. Academic Press, USA. 448p.
- Kumari SG, Makkouk KM, Ismail ID. 1996. Variation among isolates of two viruses affecting lentils: their effect on yield and seed transmissibility. *Arab J Plant Protect* 14:81–85
- Lacasa A, Contreras J. 1998. En la sanidad del cultivo del tomate. Ediciones. Phytoma. Valencia. 127 p.
- Ladipo JL. 1977. Seed transmission of cowpea aphid- borne virus in some cowpea cultivars. *Niger J Plant Protect* 3:3–10
- Ley FJH y García RS. Virus que afectan el cultivo del tomate. In: enfermedades de las hortalizas. Pp. 79-83.
- Le TS. 1970. Tomato spotted wilt virus. No. 39. *Descriptions of Plant Viruses*. Commonw. Mycol. Inst/Assoc. Appl. Biol. Kew. Surrey. England. 4pp.

- Leyns FM, De Cleene JG, Swings and De Ley J. 1984. The host range of the genus *Xanthomonas*. *Bot Rev.* 50: 308-356.
- Ling KS. 2007. Molecular characterization of two Pepino mosaic virus variants from imported tomato seed reveals high levels of sequence identity between Chilean and US isolates. *Virus Genes.* 34: 1–8.
- Ling KS and Carpenter L. 2005. Pepino mosaic virus, an emerging disease in greenhouse tomato production worldwide: is seed responsible? *Acta Horticulturae.* 695: 43–50. doi:10.17660/actahortic.2005.695.3
- Lister RM, Murrant AF. 1967. Seed-transmission of nematode-borne viruses. *Ann Appl Biol* 59:49–62
- Lira HR, Méndez AB, De los Santos VG y Vera RI. 2018. Potencial de la nanotecnología en la agricultura. *Sustainable nanotechnology potential in sustainable agriculture.* 28(2). DOI: <https://doi.org/10.15174/au.2017.1575>
- Lira S, Esparza R, Hernández S, Vera R, Moreno L, Betancourt G, & García C. 2015. Antifungal and antibacterial effect of metallic nanoparticles against plant pathogens. 5to Seminario Internacional de Nanociencias y Nanotecnologías. La Habana, Cuba.
- López AB. 1986. Especies de mosquita blanca en el Valle del Fuerte, Sin. pp: 30-31. In: Pacheco M., F. y J. J. Pacheco C. (Eds.). *Mosquita blanca en el Noroeste de Mexico 1994.* INIFAP. Centro de Investigación Regional del Noroeste. Cd. Obregón, Sonora. México.
- Manuel PV. 2016. Estudio de evaluación de la efectividad biológica del fungicida 360Agrocker para el control de la roya del café *Hemileia vastatrix* Berk. y *Broom* en el cultivo de cafeto. UACH. 12 p.
- Mandahar CL. 1981. Virus transmission through seed and pollen. In: Harris HF, Maramorsch K (eds) *Plant diseases and vectors.* Academic, New York, pp 241– 292, pp 368
- Mandahar CL, Gill PS. 1984. The epidemiological role of pollen transmission of viruses. I. *Plant Dis. Prot.* 91 :246-49
- Makkouk KM, Kumari SG (1990) Variability among 19 lentil genotypes in seed transmission rates and yield loss induced by Broad bean stain virus infection. *LENS Newsl* 17(2):31–33

- Markham R, Hitchborn JH, Hills GJ and Frey S. 1964. The anatomy of the tobacco mosaic virus. *Virology*. 22(3): 342-359.
- Marreo LO. 1986. Influencia de algunos factores ecologicos sobre el crecimiento y desarrollo del tomate. Ed. SICA. La Habana. Cuba. Pp 13-31.
- McCubbin, WA. 1954. The plant Quarantine Problem. Munksgaard, Copenhagen.
- McNeal FH, Afanasiev MM (1955) Transmission of Barley stripe mosaic through seed in 11 varieties of spring wheat. *Plant Dis Rep* 39:460–462
- McRitchi JL and Alexander LJ. 1957. Effect of strains of tobacco mosaic virus on yields of certain tomato varieties. *Phytopathology* 47: 24.
- Maness P C, Smolinski DM, Blake Z. Huang E J. Wolfrum and Jacoby WA. 1999. Bactericidal activity of photocatalytic TiO₂ reaction: toward an understanding of its killing mechanism. *Applied Environmental Microbiology* 65(9):4094-4098.
- Maramorosch K. 1957. Reversal of Virus-caused stunting in plants by giberellic acid. *Science* 126. 651-652.
- Márquez AC, Lara OF, Esquivel RB y Mata ER. 1999. Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- Martínez AJ. 1974. Estudio sobre la enfermedad del “pinto” del jitomate *Lycopersicum esculentum* Mill. En la region de Actopan, Hidalgo. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Martínez RJL. 1990. Manejo integrado de virosis en jitomate. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 8(2): 132-134.
- Mattews REF. 1970. *Plant Virology*. Academic press. New York. 751 p.
- Medina AC, Grogan RG. 1961. Seed transmission of bean common mosaic viruses. *Phytopathology* 51:452–456
- Medina-Mora C M, Hausbeck M K, and Fulbright D W. 2001. Bird’eye lesions of tomato fruit produced by aerosol and direct application of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Dis*. 85:88-91.

- Menzies JG and Jarvis WR. 1994. The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. *Plant Pathology*. 43(2): 378-386. doi:10.1111/j.1365-3059.1994.tb02699.x
- Méndez-natera JF. 2002. Relación entre el peso seco total y los caracteres vegetativos y la nodulación de plantas de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Revista Científica UDO Agrícola*, 2 (1): 46-53.
- Minitab, Inc. 2009. Minitab Statistical Software, Versión 16 para Windows, State College, Pennsylvania. Minitab® es una marca comercial registrada de Minitab, Inc.
- Molina N. 2001. Uso de extractos botánicos en el control de plagas y enfermedades. pp. 56-59. En: Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos. Manejo integrado de plagas. CATIE, Costa Rica.
- Morales FJ, Castano M. 1987. Seed transmission characteristics of selected bean common mosaic virus strains in differential bean cultivars. *Plant Dis* 71:51–53
- Montes R, Sandoval G y Orozco C. 1990. Extractos vegetales inhibidores de la germinación de urediosporas de *Uromyces phaseoli* var. *Typica* arth y su espectro de acción antiesporulante. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8:64.
- Montes BR y Figueroa BR. 1995. Biocontrol de hongos en granos almacenados. En plantas: Biotecnología, Agronomía, Nutrición. Bermúdez T., K. y Jiménez P.(eds.). COFAA-IPN. México. Pág. 26-30.
- Mosti M and Benuzzi M. 1992. *Encarsia formosa*, *Informatore Fitopatologico*. 42 (9): 25-31.
- Musil M, Leskova O, Rapi J (1983) Difference in the transmission of pea seed borne mosaic virus by seeds of different pea varieties. *Sbornik UVTIZ Ochrana Rostlin* 19:183–186
- Muñoz JJ y Medina G. 2004. Condiciones agroclimáticas de México y la horticultura protegida. pp 40-60.
- Navarrete MR, Aranda OS, Rodríguez M ML, Moya H SL y Gonzalez O MG. 2014. Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. *Revista Mexicana de Fitopatología* 32: 75-88.

- Natsuaki KT, Natsuaki T, Okuda S, Teranaka M, Yamashita S, Doi Y. 1984. Two seed-borne viruses from leguminous plants, alfalfa temperate virus (ATV) and white clover temperate virus (WCTV). *J Agric Sci, Tokyo Nogyo Daigaku* 29:49–55
- Natsuaki T, Natsuaki KT, Okuda S, Teranaka M, Milne RG, Boccardo G, Luisoni E. 1986. Relationships between the cryptic and temperate viruses of alfalfa, beet and white clover. *Intervirology* 25:69–75
- National Agricultural Statistics Service (NASS). USDA. 2017. *Vegetables 2016 Summary*. February 2017.
- Nano-Plant Technology (NPL). 2002. Method of accelerating metabolism and growth of plant using the corpuscular of Titanium Dioxide. Sun plus Corp. A handbook 1-31pp.
- Neegaard P. 1977. Survey of seed-borne viruses. In: *Seed Pathology*. John Wiley & Sons, New York, pp. 80–116.
- Neergaard P. 1979. Introduction to methods of seed-health testing. *Seed Sci Technol* 7:601–635
- Nikolic V, Stacic D, Jasnic S, 1973. *Digitaria sanguinalis* Scop. and *Setaria verticillata* P.B. as new natural hosts of maize mosaic virus in Yugoslavia. *Zastita Bilja*, 24(126):375-380
- Nuez Fernando et al. 1999 *El Cultivo del Tomate*. Editorial Mundi-Prensa, Bilbao, España.
- Nuez, 2001. *El cultivo de tomate. Anatomía y fisiología de la planta*. Mundi prensa. México. Pp 15-85.
- Núñez CCA y Escobedo LD. 2011. Uso correcto del análisis clúster en la caracterización de germoplasma vegetal. *Agronomía Mesoamericana* 22(2): 415-427. http://www.mag.go.cr/rev_meso/v22n2_415.pdf
- Nuñez CRD. 1998. Cáncer bacteriano p. 73-78. In: Cruz JO, García RE, Carrillo FA. (eds) *Enfermedades de las hortalizas*. Universidad Autónoma de Sinaloa. Sinaloa, México.

- Ocegueda AL. 2004. Evaluación de 9 variedades de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) tipo saladette en campo abierto. Universidad Autónoma de Chapingo. Departamento de Fitotecnia, Chapingo México. Pp 49.
- Owolade OF, Ogunletí DO, Adenekan MO. 2008. Titanium dioxide affects disease development and yield of edible cowpea. *Elect J Environ Agri Food Chem* 7(50):2942–2947
- Olivares B. 2014. Aplicación del Análisis de Componentes Principales (ACP) en el diagnóstico socioambiental. Caso: sector Campo Alegre, municipio Simón Rodríguez de Anzoátegui. *Multiciencia*. 14: 364-374 p. <https://www.redalyc.org/pdf/904/90433839011.pdf>
- Patil MD, Gupta BM. 1992. The location of two mosaic viruses in cowpea seeds. *J Turkish Phytopathol* 21: 21–23
- Parker R and Gerson U. 1994. Dispersal of the broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Banks) (Heterostigmata: Tarsonemidae), by the greenhouse whitefly, *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). *Experimental and Applied Acarology*. 18: 581-585.
- Peet MM. 1992. Radial fruit cracking in tomato. *HortTechnology*. 2: 216-223.
- Pelham J. 1996. Resistance in tomato to tobacco mosaic virus. *Euphytica*. 15: 258-267.
- Peralta IE, Spooner DM. (2000). Clasificación de wild tomatoes: a review. *Kurtziana* 28: 45–54.
- Peralta IE, Knapp S. y Spooner, DM. 2006. Nomenclature for wild and cultivated tomatoes. *Tomato Genet. Coop.* (56); pp. 6-12.
- Peralta IE, Knapp S, Spooner DM. 2005. New Species of Wild Tomatoes (*Solanum* Section *Lycopersicon*: Solanaceae) from Northern Peru. *Syst Bot* 30: 424–434.
- Pernezny K, Roberts PD, Murphy JF, and Goldberg NP. 2003. Compendium of Pepper Diseases. The American Phytopathological Society. USA. 63 p
- Pérez P R, Ruiz VJ, Flores AG, Rodríguez AI. 1995. Mezcla de extractos vegetales, una alternativa para reducir el daño ocasionado por el enchinamiento en Jitomate y Chile. XXII Congreso Nacional de la

Sociedad Mexicana de Fitopatología A. C. Guadalajara, Jalisco, México. Resumen 50.

- Perea EI, Rojas E y Villalobos A. 2003. Diagnostico de *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) en tabaco y frijol de García Rovira (Santander). *Revista Colombiana de Entomología* 29(1), 7-10.
- Persley D, Martin H and Sharman M. 2010. *Capsicum* (pepper). p. 87-98. In Persley et al (ed.) *Diseases of vegetable crops in Australia*. CSIRO Publishing.
- Pohronezny K, Waddill VH, Schuster DJ and Sonoda RM. 1986. Integrated pest management for Florida tomatoes. *Plant Dis.* 70:92-102.
- Prasad R, Kumar V, Prasad KS. 2014. Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *African Journal of Biotechnology*. 13: 705-713.
- Rai M y Ingle A. 2012. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 94(2):287-93 DOI: 10.1007/s00253-012-3969-4
- Raliya R, Biswas P and Tarafdar JC. 2015. TiO₂ nanoparticle biosynthesis and its physiological effect on mung bean (*Vigna radiata* L.), *Biotechnol. Reports*. 5: 22–26.
- Rao GP, Baghel AKS, Singh RK y Chattersji KS. 1984 Antiviral activity of coralloid of *Cycas revolute* extract against some viruses of tomato plant. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 40(11): 1257-1258. DOI:10.1007/BF01946661
- Ramirez VJ y Ley JHF. 1998. Marchitez manchada. Pp84-86. In: enfermedades de las hortalizas, Cruz EOJ, García ERS y Carrilla FJA. (eds). Universidad Autónoma de Sinaloa, Sinaloa, Mexico.
- Rameshaiah G, y Pallavi J. 2015. Nano fertilizers and nano sensors—an attempt for developing smart agriculture. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(1): 314-320. <http://pnrsolution.org/Datacenter/Vol3/Issue1/40.pdf>
- Ras AThB. Variability of Tobacco mosaic virus in relation to control of tomato mosaic in glasshouse tomato crops by resistances breeding and cross protection. *Agric. Res. Rep.* 834. Pudoc, Wageningen. Pp 76.

- Requena AM, Requena ME, Gilabert CE, Ezziyyanil, Candela ME. 2010. Virosis en los principales cultivos horticolas de la Región de Murcia. Departamento de Biología Vegetal. Facultad de Biología, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Espinardo (Murcia) España. 19 p.
- Reid MS y Matthews REF. 1966. On the origin of the mosaic induced by turnip yellow mosaic virus. *Virology*. 28: 563-570. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(66\)90241-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(66)90241-8)
- Renuka PD, Sabhita D, Nakkeeran S, Ribindran R, Ganapathy T, Ramiah M y Mathiyazhagan S. 2004. Antiviral action of *Harpulia cupanioides* and *Mirabilis jalapa* against Tomato spotted wilt virus (TSWV) infecting tomato. *Archives of Phytopathology and Protection*, Department of plant pathology, center for plant protection studies Tamil Nedu. Agricultural University Coimbatore. India. <https://doi.org/10.1080/03235400412331273313>
- Rotem, J. 1994. The genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. American Phytopathological Society. Michigan, Estados Unidos. 326 p.
- Rendón R, Cardona C, Bueno JM. 2001. Pérdidas causadas por *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) y *Thrips palmi* (Thysanoptera: Thripidae) en habichuela en el Valle del Cauca. *Revista Colombiana de Entomología* 27 (1-2): 39- 43.
- Roberts IM, Wang D, Thomas CL, Maule AJ. 2003. Pea seed-borne mosaic virus seed transmission exploits novel symplastic pathways to infect the pea embryo and is, in part, dependent upon chance. *Protoplasma* 222:31–43
- Roberts PD, Adkins S, Pernezny K and Jones JB. 2004. Diseases of pepper and their management. pp. 333-387. In: Naqvi, S.A.M.H. (ed.). *Diseases of fruits and vegetables*. Volume II. Kluwer Academic Publishers. U.S.A.
- Rodriguez MML. 2000. Enfermedades bacterianas más comunes en hortalizas. p.128-133.
- Rodríguez R, Tavares R, y Medina J. 2001. Cultivo moderno del tomate. 2ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. 255 p.
- Rodríguez R, Tavares R, y Medina J. 1984. Cultivo moderno del tomate. Ediciones Mundi Prensa. Madrid, España. 206 p.

- Rodríguez, M. D. 1996. Colonización de las plantaciones de calabacín (*Cucurbita pepo* L. var. Condesa Bailey) por *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) y de pimiento por *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homóptera, Aleyrodidae) en los invernaderos de Almería: Características tipológicas y evolutivas. Universidad de Almería. Almería. Trabajo Fin de Carrera, Universidad de Almería, Escuela Politécnica Superior. pp. 203
- Ross AF (1961) Systemic acquired resistance induced by localised virus infections in plants. *Virology* 14: 340–358
- Rick CM. 1999. Genetic-relationships between self-incompatibility and floral traits in the tomato species. *Biol Zbl* 101:185–198.
- Rick CM. 1978. The tomato. *Sci. Amer.*, 239: 67-76 pp.
- Rico CM, Lee SC, Rubenecia R, Mukherjee A, Hong J, Peralta-Videa JR and Gardea-Torresdey JL. 2014. Cerium Oxide Nanoparticles Impact Yield and Modify Nutritional Parameters in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 62: 9669–9675. <https://doi.org/10.1021/jf503526r>
- Rubio CR. 2001. Análisis espacio temporal de enfermedades virales en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) en la Vega de Metztlán, Hidalgo. Tesis de Maestría en Ciencias, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Saure MC. 2001. Blossom-end rot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) a calcium or a stress related disorder?. 90: 193-208.
- Salazar LF. 1995. Los virus de la papa y su control. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú.
- Salome A and Roggero P. 2002. Host range, seed transmission and detection by ELISA and lateral flow of an Italian isolate of Pepino mosaic virus. *Journal of Plant Pathology.* 84(1), 65-68. <http://www.sipav.org/main/jpp/index.php/jpp/article/view/1088/871>
- Sandoval BC (2004) Manual Técnico. Manejo Integrado de Enfermedades en Cultivos Hidropónicos Agricultura y la Alimentación. FAO, Oficina Regional Para América Latina y el Caribe. 53 p.
- Sánchez LA. 2018a. Registro de la Variedad VILLA NARRO®. Extra firme de larga vida de anaquel de tomate *Solanum lycopersicum* L. tipo Beef. Catálogo Nacional de Variedades Vegetales. (SNICS).

<https://datastudio.google.com/reporting/1V8u-ihQjcXW76CQQSgcvJIGRAaP-5Lz/page/MOvw?s=ushQvYcyBDE>

- Sánchez LA. 2018b. Registro de la Variedad SofiMely®. Extrafirme de larga vida de anaquel de tomate *Solanum lycopersicum* L. tipo Beef. Catálogo Nacional de Variedades vegetales. (SNICS). <https://datastudio.google.com/reporting/1V8u-ihQjcXW76CQQSgcvJIGRAaP-5Lz/page/MOvw?s=ushQvYcyBDE>
- Sánchez CF. 2002. Descripción general del proceso técnico de producción de jitomate basado en despuntes tempranos y altas densidades p. B1- B17.
- Sánchez D, Scotta R y Arregui C. 2005. Población de mosca blanca en tomate cultivado a campo con pantallas de sombreamiento. *Pesq. Agropec. Bras.* 40 (2), 183-185.
- Santiago J. 1998. Evaluation of tomato in greenhouse conditions; phonological and physiological criteria. *Agronomía- Mesoamericana.* 9:1.
- Stace-Smith. 1970. Purification and Composition of Potato Virus Y. *Phytopathology.* Canada department of agricultura, Research station, 6660 NW. British Columbia, Canada. 60: 1758-1789.
- Saettler A. W., Schaad N. W., and Roth D.A. 1989. Detection of Bacteria in Seed and Other Planting Material. St. Paul, Minnesota, USA: The American Phytopathological Society.
- Sarлак N, Taherifar A y Salehu F. 204. Synthesis of nanopesticides by encapsulating pesticide nanoparticles using functionalized carbon nanotubes and application of new nanocomposite for plant disease treatment. *J Agric Food Chem.* 28;62(21):4833-8. doi: 10.1021/jf404720d.
- SAS (Statistical Analysis System). 2004. SAS/STAT 9.1 User's Guide Cary, NC: SAS Institute Inc. USA. 5121 p.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (SAGARPA). 2017. Aumenta 35 por ciento producciones de jitomate "hecho en México http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/Paginas/JAC_0055_10.aspx# (consulta, agosto 2018).
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2019. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Primera Edición. Secretaría de Agricultura,

Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Ciudad de México, México

- Schippers B. 1963. Transmission of bean common mosaic virus by seeds of *Phaseolus vulgaris* L. cultivar Beka. *Acta Bot Neerl* 12:433–497
- Scholthof K-BG. 2006. Tobacco mosaic virus. *The Plant Health Instructor*. APS Press. St. Paul, MN.
- Scholthof, K-BG. 2004. Tobacco mosaic virus: A model system for plant biology. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42:13-34.
- Scholthof, K-BG. 2000. Tobacco mosaic virus. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2000-1010-01
- Singh RP, Boucher A, Singh A. 1991. High incidence of transmission and occurrence of a viroid in commercial seeds of coleus in Canada. *Plant Dis* 75:184–187
- Singh GP, Army DC, Pounds GS. 1960. Studies on the stripe mosaic of barley, including effects of temperature and age of host on disease development and seed infection. *Phytopathology* 50:290–296
- Shepherd RJ y Purcifull DE. 1982. Tobacco etch virus. Commonwealth Mycological Institute and the Association of Applied Biologists. *Descriptions of Plant Viruses No. 258 (No.55 revised)*.
- Shende S, Ingle A, Gade A. & Rai M. 2015. Green synthesis of copper nanoparticles by *Citrus medica* Linn. (Idilimbu) juice and its antimicrobial activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 31(6): 865-873.
- Subramanya SK. 2013. *Seed-borne Plant Virus Diseases*. Springer. India. 317p. DOI: 10.1007/978-81-322-0813-6
- Taylor R H, Grogan R G, Kimble K A. 1961: Transmission of *tobacco mosaic virus* in tomato seed. *Phytopathology* 51: 837-42.
- Tortosa G. 2012. La nanotecnología aplicada a la agricultura. <https://www.hablandodeciencia.com/articulos/2012/11/22/lananotecnologia-aplicada-a-la-agricultura/> (consulta Octubre, 2018).
- Uyemoto JK, Grogan RG. 1977. Southern bean mosaic virus: evidence for seed transmission in bean embryos. *Phytopathology* 67:1190–1196

- Valdez L. 1990. Producción de hortalizas. Ed. Limusa. México. 248 p.
- Varma A, Krishna Reddy M, Malathi VG. 1992. Influence of the amount of the blackgram mottle virus in different tissues on transmission through the seeds of *Vigna mungo*. *Plant Pathol* 41:274–281
- Vázquez E. y Torres S. 2006. Fisiología Vegetal, 2da parte. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de La Habana, Cuba, 207 p.
- Vauterin L, Hoste B, Kersters K and Swings J, 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30, 472–489
- Verma HN, Awasthi LP, y Mukerjee K. 1979. Prevention of virus infection and multiplication by extracts from medicinal plants. *Journal of Phytopathology*. 96(1): 71-76. DOI: 10.1111/j.1439-0434.1979.tb01622.x
- Von Wechmar MBD, Kaufmann A, Desmarais F, Rybicki EP. 1984. Detection of seed transmitted brome mosaic virus by ELISA, radial immunodiffusion and immunoelectroblotting tests. *Pytopathologische Zeitschrift* 109(4):341–352
- Vivanco JM, Querci M y Salazar LF. 1999. Antiviral activity of Proteína Antiviral de *Mirabilis* (MAP)- Containing extracts from *Mirabilis jalapa* Roots.
- VIDE. 2012. Plant Viruses Online. <http://www.agls.uidaho.edu/ebi/vdie/refs.htm>. (Revisado julio de 2017).
- Wang H, Kou X, Pei Z, Xiao JQ, Shan X, Xing B. 2011. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium Perenne* L.) and pumpkin plants. *Nanotoxicology*. 5(1), 30-42.
- Wang LY, Lin SS, Hung TH, Li TK, Lin NC, Shen TL. 2012. Multiple domains of the Tobacco mosaic virus p126 protein can independently suppress local and systemic RNA silencing. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 25:648–57
- Wang D, Macfarlane SA, Maule AJ. 1997. Viral determinants of pea early browning virus seed transmission in pea. *Virology*. 234(1):112-117
- Warham, J.E., Butter, L.D., And Sutton, B.C. 1994. Ensayos para la semilla de maíz y trigo. CYMMYT, México. 84 p.

Wien H. 1997. The physiology of vegetable crops. CAB International, London, UK. 651 p.

Yang Y, Kim KS, Anderson EJ. 1997. Seed transmission of cucumber mosaic virus in spinach. *Phytopathology* 87:924–931

Apéndice

Cuadro 6. Análisis de varianza de incidencia de infección de hongos fitopatógenos en semilla de dos genotipos de tomate.

F.V.	g.l.	C.M.	F	P>F
Genotipos (A)	1	1.66	0.0111	0.91
Medios de cultivo (B)	1	481.66	3.2111	0.07
Géneros de hongos (C)	4	380.83*	2.5389	0.05
A x B	1	135.00	0.9000	0.64
A x C	4	280.83	1.8722	0.13
B x C	4	285.83	1.9056	0.12
A x B x C	4	239.17	1.5944	0.19
Error	40	149.99		
Total	59			
C.V. (%) ¹	82.5			

¹C.V. (%) = transformado usando raíz de x + 1; *Significativo al 0.05.

Cuadro 10. Análisis de varianza para altura de planta en dos genotipos de tomate durante 12 fechas de muestreo.

F. v.	g.l.	CM 20ddt	CM 32ddt	CM 40ddt	CM 49ddt	CM 57ddt	CM 64ddt
Tratamiento	13	9.35**	83.9**	104.34* *	71.3**	256.2**	523.7**
Error	42	2.67	24.9	6.35	13.9	20.2	34.8
Total	55						
C.V. (%)		8.63	13.04	5.27	5.42	5.82	6.85

F. v.	g.l.	CM 71ddt	CM 79ddt	CM 85ddt	CM 94ddt	CM 99ddt	CM 130ddt
Tratamiento	13	907.1**	1528.4**	2223.1**	3049.1**	4097.6**	3195.2**
Error	42	51.9	57.7	60.2	51.5	47.7	73.2
Total	55						
C.V. (%)		7.75	7.81	7.36	6.42	5.85	5.80

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01.

Cuadro 14. Análisis de varianza para número de hojas en dos genotipos de tomate durante 8 fechas de muestreo.

F.V.	gl	57 ddt	64 ddt	71 ddt	79 ddt	85 ddt	94 ddt	99 ddt	130 ddt
Trat.	13	1.13*	2.50**	3.83**	15.72**	30.62**	43.68**	50.64**	74.67**
Error	42	0.55	0.67	1.32	1.35	1.32	1.72	1.70	2.42
Total	55								
C.V (%)		4.50	4.57	6.02	5.49	5.16	5.22	4.58	3.95

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Cuadro 18. Análisis de varianza para peso fresco y seco de planta en dos genotipos de tomate.

F.V.	g.l.	CM Peso fresco de planta	CM Peso seco de planta
Tratamiento	13	74933.62**	18103.82**
Error	42	1708.94	266.38
Total	55		
C.V.		6.01	5.10

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Cuadro 21. Análisis de varianza para las variables de fruto en genotipos de tomate.

F.v.	g.l.	CM Peso de fruto (g)	CM Diámetro de fruto (mm)	CM Longitud de fruto (mm)	CM Número de lóculos
Tratamiento	13	9175.67**	688.52**	387.33**	3.26**
Error	42	62.28	21.38	10.52	0.21
Total	55				
C.V. (%)		7.78	8.84	6.49	9.96

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Continuación de tabla21....

F.v.	g.l.	CM Rendimiento (kg planta ⁻¹)	CM Número de semillas
Tratamiento	13	6.19**	6488.80**
Error	42	0.05	167.93
Total	55		
C.V. (%)		8.40	13.28

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Cuadro 29. Análisis de varianza para lecturas de densidad óptica de la prueba ELISA de planta, en dos genotipos de tomate.

F.V.	g.l.	Después de Inoculación	Lectura 1	Lectura 2	Lectura 3	Lectura 4
Tratamiento	13	0.61**	0.73**	0.74**	0.78**	0.93**
Error	42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Total	55					
C.V. (%)		1.98	2.07	2.90	3.49	2.89

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Cuadro 34a. Cuadros medios del análisis de varianza para grupos formados en el análisis de conglomerados para variables vegetativas en dos genotipos de tomate.

F.v	g.l.	A.P. (cm)	N.H.	PFP (g)	PSP (g)	D.O.
Tratamiento	6	4909.18**	121.29**	106841.18**	23737.75**	1.51**
Error	21	47.35	1.49	614.50	130.41	0.00
Total	27					
C.V. (%)		4.36	3.00	3.45	3.43	2.57

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Cuadro 34b. Cuadros medios del análisis de varianza para grupos formados en el análisis de conglomerados para variables de fruto en dos genotipos de tomate.

F.v	g.l.	PF (g)	DF (mm)	LF (mm)	NL	NS	REND Kg PI ⁻¹
Tratamiento	6	16344.93**	1220.92**	675.39**	5.46**	11524.23**	9.12**
Error	21	66.84	11.75	5.21	0.14	131.24	0.06
Total	27						
C.V. (%)		6.89	5.99	4.27	7.84	10.26	7.83

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Cuadro 34a. Cuadros medios del análisis de varianza para grupos formados en el análisis de conglomerados para variables vegetativas en dos genotipos de tomate.

F.v	g.l.	A.P. (cm)	N.H.	PFP (g)	PSP (g)	D.O.
Tratamiento	6	4909.18**	121.29**	106841.18**	23737.75**	1.51**
Error	21	47.35	1.49	614.50	130.41	0.00
Total	27					
C.V. (%)		4.36	3.00	3.45	3.43	2.57

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Cuadro 34b. Cuadros medios del análisis de varianza para grupos formados en el análisis de conglomerados para variables de fruto en dos genotipos de tomate.

F.v	g.l	PF (g)	DF (mm)	LF (mm)	NL	NS	REND Kg PI ₁
Tratamiento	6	16344.93**	1220.92**	675.39**	5.46**	11524.23**	9.12**
Error	21	66.84	11.75	5.21	0.14	131.24	0.06
Total	27						
C.V. (%)		6.89	5.99	4.27	7.84	10.26	7.83

**Diferencias altamente significativas al nivel de 0.01

Cuadro 36. Valores de distancia euclidiana para 14 tratamientos de dos genotipos de tomate, método de enlace completo.

Paso	Numero de conglomerado	Nivel de distancia	Conglomerados incorporados		Poblaciones en el conglomerado
1	13	0.316	4	11	2
2	12	0.328	13	14	2
3	11	0.520	3	10	2
4	10	0.561	6	13	3
5	9	0.614	6	7	4
6	8	0.636	5	12	2
7	7	0.760	2	9	2
8	6	1.171	4	6	6
9	5	1.493	1	8	2
10	4	2.074	3	4	8
11	3	2.368	2	5	4
12	2	5.458	2	3	12
13	1	10.753	1	2	14

Cuadro 37. Correlaciones fenotípicas entre las variable evaluadas.

	D.O.	P.F.	DIAM	LONG	N.L.	N.S.	REND
P.F.	-0.940**						
DIAM	-0.935**	0.998**					
LONG	-0.956**	0.996**	0.996**				
N.L.	-0.959**	0.980**	0.979**	0.986**			
N.S.	-0.953**	0.998**	0.995**	0.995**	0.983**		
REND	-0.965**	0.856**	0.853**	0.885**	0.918**	0.879**	
A.P.	-0.916**	0.892**	0.894**	0.915**	0.915**	0.892**	0.864**
N.H.	-0.978**	0.932**	0.933**	0.935**	0.935**	0.939**	0.916**
PFP	-0.910**	0.818**	0.810**	0.871**	0.871**	0.828**	0.928**
PSP	-0.829**	0.725**	0.718**	0.797**	0.797**	0.734**	0.878**

Continuació..

	A.P.	N.H.	PFP
N.H.	0.904**		
PFP	0.840**	0.898**	
PSP	0.792**	0.813**	0.982**