



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN  
PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
UNIDAD SINALOA**



“Inducción de la tolerancia contra el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV) en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) micorrizadas con *Rhizophagus intraradices*”.

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRIA EN  
RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE

PRESENTA

JUAN JOSE MORALES AGUILAR

GUASAVE, SINALOA, MÉXICO DICIEMBRE DE 2011



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESIÓN DE DERECHOS**

En la Ciudad de Guasave, Sinaloa el día 08 del mes Diciembre del año 2011, el (la) que suscribe Juan José Morales Aguilar alumno (a) del Programa de Maestría en recursos naturales y medio ambiente con número de registro B091764, adscrito a CIIDIR-Sinaloa, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Jesús Méndez Lozano y Dr. Rafael F. Rivera Bustamante y cede los derechos del trabajo intitulado “Inducción de la tolerancia contra el Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) micorrizadas con *Rhizophagus intraradices*”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [moralesag@gmail.com](mailto:moralesag@gmail.com), [jmendezl@ipn.mx](mailto:jmendezl@ipn.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Juan José Morales Aguilar  
Nombre y firma



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARIA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS  
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS*

Guasave, Sinaloa. a 22 de Noviembre del 2011

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SIN en su sesión extraordinaria No. 18 celebrada el día 22 del mes de Noviembre conoció la solicitud presentada por el(la) alumno(a):

<u>Morales</u>	<u>Aguilar</u>	<u>Juan José</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre (s)							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>B</td><td>0</td><td>9</td><td>1</td><td>7</td><td>6</td><td>4</td> </tr> </table>			B	0	9	1	7	6	4
B	0	9	1	7	6	4			

Aspirante de:

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
"Inducción de la tolerancia contra el Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) micorrizadas con *Rhizophagus intraradices*"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
Determinar la tolerancia inducida por "*Rhizophagus intraradices*" en plantas de tomate infectadas con PepGMV, mediante técnicas moleculares PCR, Southern blot, y producción de flores

2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:  
Dr. Jesús Méndez Lozano y al Dr. Rafael F. Rivera Bustamante

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesina será elaborado por el alumno en:  
El CIIDIR-SIN y el CINVESTAV-IRAPUATO

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

  
Dr. Jesús Méndez Lozano  
Aspirante

  
Dr. Rafael F. Rivera Bustamante  
Presidente del Colegio

  
LN T. IBQ. Juan José Morales Aguilar

  
Dr. Jorge Montiel Montoya



CIT  
- IPN  
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**ACTA DE REVISIÓN DE TESIS**

En la Ciudad de Guasave siendo las 11 horas del día 6 del mes de Diciembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR-SIN para examinar la tesis titulada:

Inducción de la tolerancia contra el Virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en plantas de tomate (Solanum lycopersicum) micorrizadas con Rhizophagus intraradices

Presentada por el alumno:

<u>Morales</u>	<u>Aguilar</u>	<u>Juan José</u>							
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)							
Con registro: <table border="1" style="display: inline-table; vertical-align: middle;"> <tr> <td>B</td> <td>0</td> <td>9</td> <td>1</td> <td>7</td> <td>6</td> <td>4</td> </tr> </table>			B	0	9	1	7	6	4
B	0	9	1	7	6	4			

aspirante de:

Maestría en recursos naturales y medio ambiente

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

**LA COMISIÓN REVISORA**

Directores de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jesús Méndez Lozano  
Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Rafael F. Rivera Bustamante  
Director de tesis

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Norma E. Leyva López

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Melisa López Meyer

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sergio Medina Godoy

**PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES**

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Jorge Mondel Montoya



**CIIDIR - IPN**  
UNIVERSIDAD  
DIRECCIÓN

## **RECONOCIMIENTO A PROYECTOS Y BECAS**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biotecnología Agrícola, en el laboratorio de Virología del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Sinaloa del Instituto Politécnico Nacional (CIIDIR-IPN), bajo la dirección del Dr. Jesús Méndez Lozano y en el Laboratorio de Virología Vegetal del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato (CINVESTAV U. Irapuato) bajo la dirección del Dr. Rafael F. Rivera Bustamante. Para la realización de este proyecto se recibió financiamiento por parte del Consejo Estatal de Ciencia y Tecnología, del Proyecto SIP (IPN) 20101498, 20113633. El autor agradece al CIIDIR-IPN y al CINVESTAV-Irapuato por su apoyo e infraestructura prestados para la realización del presente trabajo de investigación. Al CONACYT y al IPN por las becas otorgadas (Beca Institucional y Beca PIFI).

## AGRADECIMIENTOS

Quiero Agradecer en primer lugar a mi Dios a mis padres que siempre estuvieron apoyándome, a mis hermanos por su apoyo, respeto y cariño que sin ellos no sería la persona que soy.

Agradezco a mi Esposa Erika Camacho Beltrán y a toda su familia que me apoyaron durante este paso de mi vida y mi carrera profesional, ella es la luz de mi vida que ilumina mi camino.

Agradezco a el Dr. Jesús Méndez Lozano, el Dr. Rafael F. Rivera Bustamante a la Dra. Norma E. Leyva López, a la Dra. Melina López Meyer al Dr. Sergio Medina Godoy por sus comentarios, correcciones enseñanzas y apoyo durante este proceso.

Agradezco a todos mis compañeros del CIIDIR Sinaloa, y a mis compañeros del CINVESTAV unidad Irapuato, por su ayuda en el desarrollo de esta tesis y la convivencia sana dentro y fuera del laboratorio

## **INDICE**

<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>3</b>
<b>1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. Origen del cultivo de tomate .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2. Importancia del tomate .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Factores bióticos que afectan negativamente al cultivo de tomate.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1. Enfermedades causadas por hongos .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2. Enfermedades causadas por bacterias .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.3. Enfermedades causadas por nematodos.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.4. Enfermedades causadas por fitoplasmas .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.5. Enfermedades causadas por virus .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Los Virus .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Los familia Geminiviridae y sus géneros .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.1. Mastrevirus .....</b>	<b>8</b>
<b>1.5.2. Curtovirus .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5.3. Topocovirus .....</b>	<b>9</b>
<b>1.5.4. Begomovirus.....</b>	<b>9</b>
<b>1.6. Organización molecular de los Begomovirus.....</b>	<b>10</b>
<b>1.6.1. Región intergénica .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6.2. Gen CP .....</b>	<b>10</b>
<b>1.6.3. Gen Rep.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6.4. Gen TrAP.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6.5. Gen REn .....</b>	<b>11</b>

<b>1.6.7. Gen AC4 .....</b>	<b>12</b>
<b>1.6.8. Gen NSP .....</b>	<b>12</b>
<b>1.6.9. Gen MP .....</b>	<b>12</b>
<b>1.8. Begomovirus en México .....</b>	<b>13</b>
<b>1.9. Virus del mosaico dorado del chile .....</b>	<b>17</b>
<b>1.10. Resistencia natural en plantas .....</b>	<b>17</b>
<b>1.11. Resistencia sistémica adquirida (RSA) .....</b>	<b>18</b>
<b>1.12. Resistencia sistémica inducida (RSI) .....</b>	<b>18</b>
<b>1.13. Preacondicionamiento (priming).....</b>	<b>18</b>
<b>1.14. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA) .....</b>	<b>19</b>
<b>1.15. Hongos y su relación contra patógenos de la parte aérea de la planta.</b>	<b>19</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>24</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>24</b>
<b>5. METODOLOGÍA .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1. Germinación de plantas de tomate .....</b>	<b>25</b>
<b>5.2. Preparación de Medio M para mantenimiento de raíces transformadas de zanahoria (Daucus carota). .....</b>	<b>25</b>
<b>5.3. Preparación de placas divididas para mantenimiento de Rhizophagus intraradices.....</b>	<b>25</b>
<b>5.4. Obtención de esporas de Rhizophagus intraradices .....</b>	<b>25</b>
<b>5.5. Purificación de esporas de Medio M.....</b>	<b>26</b>
<b>5.5. Cuantificación de esporas .....</b>	<b>26</b>
<b>5.6. Fijación y tinción de raíces colonizadas con Rhizophagus intraradices.</b>	<b>26</b>
<b>5.7. Determinación del porcentaje de colonización de raíces de tomate .....</b>	<b>26</b>

<b>5.8. Preparación de soluciones nutritivas .....</b>	<b>27</b>
<b>5.9. Obtención de DNA de PepGMV .....</b>	<b>27</b>
<b>5.10. Extracción de DNA plasmídico .....</b>	<b>28</b>
<b>5.11. Electroforesis en gel para la visualización del DNA .....</b>	<b>28</b>
<b>5.12. Limpieza de DNA. ....</b>	<b>28</b>
<b>5.13. Cuantificación por espectrofotometría .....</b>	<b>29</b>
<b>5.14. Preparación de partículas de Tungsteno .....</b>	<b>29</b>
<b>5.15. Impregnación de DNA a partículas de Tungsteno .....</b>	<b>29</b>
<b>5.16 Inoculación con pistola de baja presión .....</b>	<b>30</b>
<b>5.17. Extracción de DNA .....</b>	<b>31</b>
<b>5.18. Detección molecular de PepGMV en plantas de tomate .....</b>	<b>31</b>
<b>5.19. Hibridación tipo Southern Blot.....</b>	<b>32</b>
<b>5.20. Obtención de sonda de DNA .....</b>	<b>32</b>
<b>5.21. Marcaje de sonda .....</b>	<b>32</b>
<b>5.22. Hibridación.....</b>	<b>32</b>
<b>5.23. Lavado de membranas.....</b>	<b>32</b>
<b>5.24. Primer bioensayo .....</b>	<b>33</b>
<b>5.25. Segundo bioensayo .....</b>	<b>34</b>
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....</b>	<b>35</b>
<b>6.1. Determinación de la presencia de PepGMV en plantas de tomate colonizadas con Rhizophagus intrarradices. ....</b>	<b>35</b>
<b>6.1.1. Colonización de plantas de tomate con Rhizophagus intraradices.....</b>	<b>35</b>
<b>6.1.2. Inoculación de PepGMV en plantas de tomate micorrizadas. ....</b>	<b>37</b>
<b>6.1.3. Detección molecular de PepGMV por PCR .....</b>	<b>41</b>
<b>6.1.4. Análisis de la infección por hibridación tipo Southern Blot.....</b>	<b>45</b>

<b>6.3. Determinación de la inducción de tolerancia contra PepGMV en plantas de tomate colonizadas con Rhizophagus intraradices.....</b>	<b>48</b>
<b>6.3.1. Análisis temporal de sintomatología en plantas de tomate infectadas con PepGMV colonizadas con Rhizophagus intraradices. ....</b>	<b>48</b>
<b>6.3.2. Análisis del número de botones en plantas de tomate infectadas con PepGMV y colonizadas con Rhizophagus intraradices.....</b>	<b>54</b>
<b>6.3.3. Análisis del número de flores en plantas de tomate infectadas con PepGMV y colonizadas con Rhizophagus intraradices.....</b>	<b>58</b>
<b>6.3.4. Análisis del número de frutos en plantas de tomate infectadas con PepGMV y colonizadas con Rhizophagus intraradices.....</b>	<b>61</b>
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>8. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>66</b>
<b>9. SUGERENCIAS .....</b>	<b>67</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>68</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1. Representación gráfica del genoma de un Begomovirus bipartita (PepGMV).....</b>	<b>12</b>
<b>Figura 2. Síntomas causados por Begomovirus en tomate y chile .....</b>	<b>13</b>
<b>Figura 3. Distribución geográfica de Begomovirus en cultivos agrícolas y malezas reportados en México. ....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 4. Cinética de desarrollo de las lesiones en hojas de plantas de frijol. ....</b>	<b>20</b>
<b>Figura 5. Número de lesiones por foliolo causado por X. campestris pv. vesicatoria. ....</b>	<b>21</b>
<b>Figura 6. Modelos propuestos por Cervantes-Gómez.....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 7. Representación gráfica de los dímeros de PepGMV A y PepGMV B. (Carrillo-Tripp, 2006). ....</b>	<b>27</b>
<b>Figura 8. Inoculación de plantas de tomate mediante pistola portátil. ....</b>	<b>30</b>
<b>Figura 9. Microfotografías de raíces de tomate colonizadas con R. intraradices.....</b>	<b>36</b>
<b>Figura 10. Inoculación de planta de tomate por biobalística.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 11. Plantas de tomate inoculadas con PepGMV 2 horas ddi. ....</b>	<b>38</b>
<b>Figura 12. Plantas controles negativos sin inocular con PepGMV. ....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 13. Plantas de tomate inoculadas con PepGMV bioensayo 2 (2hr ddi). ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 14. Plantas de tomate sin inocular con PepGMV bioensayo 2 (2hr ddi). ....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 15. DNA total de plantas de tomate bioensayo 1. ....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 16. DNA total de plantas de tomate bioensayo 2. ....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 17. Detección molecular del factor de elongación de plantas de tomate bioensayo 1.....</b>	<b>43</b>

<b>Figura 18. Detección molecular del factor de elongación de plantas de tomate bioensayo 2.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 19. Detección molecular del factor de PepGMV en plantas de tomate bioensayo 1. ....</b>	<b>44</b>
<b>Figura 20. Detección molecular de PepGMV en plantas de tomate bioensayo 2.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 21. Southern blot de plantas de tomate correspondiente al bioensayo 1.....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 22. Southern blot de plantas de tomate correspondientes al bioensayo 2. ....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 23. Síntomas observados en plantas de tomate infectadas con PepGMV.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 24. Promedio de valores de la severidad de la infección con PepGMV en plantas de tomate del Bioensayo 1. ....</b>	<b>52</b>
<b>Figura 25. Síntomas observados en plantas de tomate del bioensayo 1 hasta la semana 14.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 26. Análisis temporal de botones en plantas micorrizadas y no micorrizadas con 20 y 200 <math>\mu</math>M de fosfato, sin infectar con PepGMV bioensayo 1. ....</b>	<b>55</b>
<b>Figura 27. Análisis temporal de botones plantas infectadas con PepGMV, bioensayo 1. ....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 28. Análisis estadísticos del número de botones de las plantas de tomate del bioensayo 1. ....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 29. Análisis temporal del desarrollo de frutos en plantas de tomate infectadas con PepGMV.....</b>	<b>59</b>
<b>Figura 30. Análisis estadísticos del número de botones de las plantas de tomate del bioensayo 1 por semana. ....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 31. Desarrollo de síntomas y frutos en plantas micorrizadas e</b>	

<i>infectadas con PepGMV.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura. 32. Frutos de plantas micorrizadas infectadas con PepGMV. ....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 33. Análisis de varianza del número de frutos en plantas infectadas con PepGMV semana 9.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 34. Plantas de tomate infectadas con PepGMV correspondiente a la semana 9.....</i>	<i>64</i>

## INDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de PepGMV .....</i>	<i>31</i>
<i>Cuadro 2. Características de cada grupo de plantas del bioensayo 1 .....</i>	<i>33</i>
<i>Cuadro 3. Porcentaje de colonización en plantas de tomate inoculadas con R. intrarradices e infectadas con PepGMV. ....</i>	<i>36</i>
<i>Cuadro 4. Tabla de severidad.....</i>	<i>49</i>
<i>Cuadro 5. Promedio de los síntomas presentados por las plantas infectadas con PepGMV de cada tratamiento a través del tiempo.....</i>	<i>51</i>
<i>Cuadro 6. Promedios de número de botones por tratamiento por semana... </i>	<i>55</i>
<i>Cuadro 7. Promedios de número de flores por tratamiento.....</i>	<i>58</i>

## GLOSARIO

**DNA.** Ácido desoxirribonucleico, material genético compuesto de 4 bases nitrogenadas un azúcar y un grupo fosfato.

**Ácido nucleico.** Una sustancia ácida que contiene pentosa, fosforo y bases pirimídicas y púricas, los ácidos nucleicos determinan genéticamente las propiedades del organismo al que componen.

**Arbúsculos.** Estructuras fúngicas nombradas así debido a que tienen forma de pequeños arbustos. Son haustorios formados dentro de las células de la corteza radicular. Se mantienen separados del citoplasma por invaginaciones de la membrana plasmática.

**Begomovirus.** Virus pertenecientes a la familia *Geminiviridae*, presentan genomas mono y bipartitas de DNA de cadena sencilla infectan plantas dicotiledóneas.

**Cápside.** Cubierta proteica de un virus.

**HMA.** Hongo micorrízico arbúscular, es un organismo simbiote de las plantas su estructura característica son arbúsculos que se forman dentro de algunas células de la raíz.

**Enfermedad.** Cualquier mal funcionamiento de las células hospederas y tejidos que resulten de una irritación continua por un agente patogénico o factor ambiental que conlleve al desarrollo de síntomas.

**Hospedero.** En biología, se llama huésped, hospedador, hospedante y hospedero a aquel organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, ya sea en una simbiosis de parásito, un comensal o un mutualista.

**Nematodo.** Gusanos que viven como saprofitos en agua y suelo o como paracitos en plantas y animales, generalmente son microscópicos.

**Parasito.** Es un organismo vivo viviendo en otro organismo vivo (hospedero) y obtiene su alimento del segundo.

**Parasito obligado.** Un parasito que en la naturaleza puede crecer y multiplicarse solo en o dentro de un organismo viviente.

**Patógenos.** Organismos que interaccionan con las plantas de manera negativa, existen patógenos biótrofos (aquellos que crecen sobre el tejido sin causar muerte

celular), necrótrofos (matan la células de la planta huésped mediante lisis) y hemibiótrofos (pueden actuar como necrótrofos o biótrofos facultativos).

**Plaga.** Se refiere a cualquier organismo que tiene un efecto negativo sobre la producción agrícola.

**Resistencia.** La habilidad de un organismo para excluir o sobrellevar completamente o en cierto grado el efecto de un patógeno o algún otro factor dañino.

**Rizosfera.** La rizosfera es una parte del suelo inmediata a las raíces donde tiene lugar una interacción dinámica con los microorganismos. Las características químicas y biológicas de la rizosfera se manifiestan en una porción de apenas 1 mm de espesor a partir de las raíces.

**Sistémico.** Que se difunde internamente por toda la planta.

**Tolerancia.** Capacidad que tiene una planta para soportar los efectos de una enfermedad sin que muera, sufra daños serios o se pierda la cosecha.

**Vesículas.** Aglomeraciones intercaladas o terminales formadas en las hifas internas dentro de la corteza de la raíz. Pueden ser inter- o intra celulares. Las vesículas acumulan lípidos y pueden desarrollar paredes de capas gruesas en las raíces más viejas. La producción y estructura de las vesículas varía entre los diferentes géneros de los Glomerales. En algunos HMAs pueden funcionar como esporas.

**Virus.** Conjunto de uno o más ácidos nucleicos, normalmente encapsidados en una o más cápsides, capaz de organizar su propia replicación solo en ciertas células de un hospedero y depende de la maquinaria sintetizadora de proteínas de esta para su replicación.

## RESUMEN

El tomate es una hortaliza de gran valor económico distribuida en todo el mundo, su demanda, producción y comercio ha aumentado en los últimos años. En el 2010, en México se produjeron dos millones toneladas, concentrándose el 32.9 % en el estado de Sinaloa. Este cultivo está expuesto a diferentes patógenos como bacterias, hongos, fitoplasmas y virus. Los *Begomovirus* son virus de DNA ampliamente distribuidos en el territorio nacional, algunos de los virus de este género que afectan al cultivo de tomate son TYLCV, ToCV, PHYVV y PepGMV. El *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV) es un virus bipartita, que afecta varios cultivos incluyendo al cultivo del tomate. Algunos de los síntomas que presentan las plantas infectadas con PepGMV son mosaicos, amarillamiento, abultamiento, deformación de folíolos y aborto de flores. Dentro de los microorganismos benéficos del suelo, los hongos micorrizicos arbusculares (HMA) confieren inducción de tolerancia contra patógenos de la parte aérea de la planta como *Sclerotinia sclerotiorum* y *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. El objetivo del presente trabajo fue determinar la tolerancia inducida por *Rhizophagus intraradices* en tomate contra el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV). Se analizó la infectividad y formas replicativas de PepGMV en plantas de tomate colonizadas con *Rhizophagus intrarradices* y se evaluó la producción de botones, flores y frutos en plantas de tomate. Se observaron valores de colonización de 100% en plantas de tomate inoculadas con *R. intraradices*. La inducción de tolerancia se reflejó en la producción de botones, flores y frutos, fue mayor en las plantas micorrizadas e inoculadas con PepGMV. En la presente trabajo, se presentan evidencias experimentales que apoyan la idea de que la micorrización en tomate induce mecanismos de defensa en la parte aérea de la planta, contra enfermedades causadas por PepGMV un *Begomovirus* bipartita.

## ABSTRACT

The tomato is a crop spread worldwide with huge economic value, the production and commerce have been grow up in the last years. In Mexico 2010, this crop had a 2,277,791.43 tons production focus 32.9% in Sinaloa state. This crop is affected by bacteria, fungi, phytoplasms and virus. The genus *Begomovirus* is widespread in Mexico affecting horticultural crops. Thus viruses like *Pepper golden mosaic virus* (PepGMV) affect tomato crops. PepGMV has a bipartite genome and induce symptoms in tomato plants such: yellowing, distortion, flower abortion, etc. The arbuscular mycorrhiza fungi (AMF), has proved recently to induce tolerance to several pathogens. In this study, has been performed experiments to test whether mycorrhiza colonized tomato plants, show tolerance to *Pepper golden mosaic virus* compared to non-colonized plants. The data shows 100% colonization tomato plant's with *R. intraradices* AM fungus. The infectivity of PepGMV in those plants was tested by biolistic procedure as a source to delivery viral DNA into the plant. The observed symptoms and plant production where statistical evaluated. The symptoms, where not different between treatments the replicative forms variety between and within mycorrhiza and not-mycorrhiza tomato plants. The buttons flowers and fruits where larger in mycorrhiza tomato plants than the rest of the treatments. Our findings suggest that AMF colonization of tomato plants induce tolerance against the bipartite begomovirus PepGMV.

## INTRODUCCIÓN

El tomate es una hortaliza de gran valor económico distribuida en todo el mundo, su demanda, producción y comercio ha aumentado en los últimos años. En el 2010, en México se produjeron dos millones toneladas, concentrándose el 32.9 % en el estado de Sinaloa (Siap, 2011). Este cultivo está expuesto a diferentes patógenos como bacterias, hongos, fitoplasmas y virus (Agris, 2005). Los *Begomovirus* están distribuidos ampliamente en México, afectan cultivos de importancia económica como tomate, chile, soya, tabaco (Brow, 1990; Garrido-Ramírez y Gilbertson, 1998; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2000; Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2002, Holguín-Peña *et al.*, 2004; Méndez-Lozano *et al.*, 2006). El *Virus del mosaico dorado del chile* se reportó desde 1990 infectando chile y tomate en el estado de Sinaloa (Brown y Poulos, 1990). En el 2004 se encontró a PepGMV infectando cultivos de tomate, chile y malezas en Baja California Sur (Holguín-Peña *et al.*, 2004).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) se ha utilizado para conferir tolerancia contra patógenos de la parte aérea de la planta como fitoplasmas (Lingua *et al.*, 2002, García-Chapa, 2004, Kaminska *et al.*, 2010), hongos (Cordier *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2006; de la Noval *et al.*, 2007; Mora-Romero, 2008; Gallou *et al.*, 2011; Khalaf *et al.*, 2011) y bacterias (Galindo-Flores, 2008). El uso de HMA contra enfermedades causadas por *Begomovirus* no ha sido reportado hasta el momento.

El objetivo principal de este trabajo, es determinar la tolerancia inducida por "*Rhizophagus intraradices*" en tomate (*Solanum lycopersicum*) contra el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV). Se ha reportado que, la simbiosis micorrízica arbuscular disminuyó los síntomas de enfermedades foliares en tomate (Cordier *et al.*, 1998; Lingua *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2006), sin embargo en las infecciones Begomovirales a pesar que los síntomas no presentaron diferencias significativas

con respecto a los demás tratamientos, la inducción de tolerancia en plantas de tomate infectadas con PepGMV micorrizadas se reflejó en el desarrollo de frutos, este efecto no se ha reportado hasta la fecha.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1. Origen del cultivo de tomate**

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es originario de la región de los Andes la cual comprende los países de Chile, Bolivia, Ecuador, Colombia y Perú (Bai *et al.*, 2007) considerando a México centro de domesticación por los aztecas, quienes le llamaron “xitomatl”, que significa fruto con ombligo (Smith 2001). Sin embargo, a la llegada de los españoles esta fruta se cambió de nombre, llamándole “tomate” y fueron ellos quienes lo distribuyeron a lo largo de sus colonias en el Caribe después de la conquista de Sudamérica. También lo llevaron a Filipinas y por ahí entró al continente asiático y se distribuyó a todo el mundo. En la actualidad la comercialización y difusión lograda a través del tiempo han hecho que pase a formar parte de la dieta alimentaria de diversas culturas en el mundo (Berreiro, 1998).

### **1.2. Importancia del tomate**

El tomate es una hortaliza distribuida en todo el mundo con un gran valor económico. Su demanda, producción y comercio ha aumentado del 2005 a la fecha (Faostat.fao.org, 2011). La producción de esta hortaliza ha mantenido un promedio mundial de 138 millones de toneladas por año, encontrándose dentro de los 10 principales productores a China, Estados Unidos de América, La india, Egipto, Turquía, Italia, Irán, España, Brasil y México (Faostat.fao.org, 2011). México ocupó el décimo lugar en el 2010 con una producción de 2,277,791.43 toneladas, un valor de 14 millones de pesos, concentrándose la producción en los estado de Sinaloa (32.69%), Baja California (8.8%), Michoacán (6.85%), San Luis Potosí (5.48%), Baja California Sur (5.02%), Zacatecas (4.65%), los demás estados productores con menos del 4.0%, según datos de producción nacional de tomate del 2009 (SIAP, 2011).

### **1.3. Factores bióticos que afectan negativamente al cultivo de tomate**

El cultivo de tomate desafortunadamente como todos los cultivos está expuesto a diversas plagas y enfermedades, no todas con consecuencias graves; sin

embargo, hay algunas que afectan de manera drástica la producción y calidad del fruto. Dentro de las principales plagas se encuentran la araña roja (*Tetranychus urticae*), la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), pulgón (*Aphis gossypii*), trips (*Frankliniella occidentales*), minador de la hoja (*Liriomyza trifolii*), orugas (*Spodoptera exigua*) (Agrios, 2005). Estas plagas se pueden presentar en cualquier etapa de desarrollo del cultivo de tomate y su daño varía según la etapa fenológica del cultivo. Así mismo, las enfermedades a las que está expuesto este cultivo pueden ser causadas por diferentes patógenos como son hongos, bacterias, nematodos, fitoplasmas y virus.

### **1.3.1. Enfermedades causadas por hongos**

Dentro de las enfermedades fungosas, tenemos a *Phytium*, generalmente se asocia con el daño pre-emergente, *Rhizoctonia solani* se asocia con el daño post-emergente, *Phytophthora infestans* relacionado con la enfermedad conocida como tizón tardío y *Altermaria solani* que provoca tizón temprano (Agrios, 2005; Gallou *et al.*, 2011; Jones, 1991; Khalaf, 2011; Montealegre *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2011).

### **1.3.2. Enfermedades causadas por bacterias**

Entre las bacterias que generan enfermedades en el cultivo del tomate destaca *Clavibacter michiganensis* Subs. *Michiganennnsis*, que produce el cáncer bacteriano. Las plantas infectadas con esta bacteria expresan síntomas en tallo, hojas y frutos. Otra bacteria, *Xanthomonas campestris* p.v. vesicatoria, agente causal de la mancha bacteriana y también conocida como sarna o roña, se presenta anualmente en regiones húmedas y con temperaturas altas (Espinoza-Mancillas, 2008; Galindo-Flores, 2008). *Pseudomonas syringae* p.v. *tomato*, agente causal de la peca bacteriana, esta bacteria causa pequeños puntos negros rodeados de un delgado halo amarillo en hojas, tallos y frutos (Pohronezny *et al.*, 1986; Gitaitis *et al.*, 1992; Cruz *et al.*, 2010).

### **1.3.3. Enfermedades causadas por nematodos**

Los nematodos causan daños en prácticamente todos los cultivos hortícolas, en México el género *Meloidogyne* se ha reportado afectando berenjena, café, chile, estropajo, gardenia, guayaba, okra, papaya, piña, plátano, sandía y tomate, en los municipios de Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala, Tabasco, Veracruz, Zacatecas (Talavera *et al.*, 2001; Cid del Prado-Vera *et al.*, 2001).

### **1.3.4. Enfermedades causadas por fitoplasmas**

Los fitoplasmas son patógenos que afectan el cultivo de tomate, presentan síntomas como clorosis general, enrojecimiento precoz de las hojas, esterilidad de las flores, virescencia de flores, filodia, proliferación de yemas adventicias, enanismo generalizado, enrollamiento de las hojas, necrosis del floema y decaimiento general. En México han sido reportados infectando el cultivo de tomate, papa y palma, en los Estados de Baja California, Campeche, Guanajuato y Sinaloa (Córdova *et al.*, 2000; Coronado-Fierro, 2008; Holguín-Peña *et al.*, 2007; Santos-Cervantes *et al.*, 2008).

### **1.3.5. Enfermedades causadas por virus**

Existe una diversidad de virus que afectan plantas ocasionando pérdidas importantes en la agricultura (Jones, 1991). La enfermedad del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate, está distribuida ampliamente y es causada por un complejo de virus, se ha asociado a esta enfermedad al *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* (TYLCV) y al *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate de Sardinia* (TYLCSV) (Salvatore *et al.*, 2009), los síntomas característicos de esta enfermedad son amarillamiento, acucharamiento de hojas, enanismo y aborto de flores. (Czonsnek y Laterrot, 1997). La enfermedad conocida como “chino” del tomate se considera como una de las enfermedades más devastadoras de esta especie debido a que puede provocar la pérdida total del cultivo de tomate, se han asociado a esta enfermedad al menos dos *Begomovirus*, el *Virus de la vena amarilla del chile* (PHYYV) y el *Virus del mosaico*

*dorado del chile* (PepGMV) y cinco virus con genomas de RNA el *Virus de la marchitez manchada del tomate* (TSWV), el *Virus del mosaico del tabaco* (TMV), el *Virus del mosaico de pepino* (CMV) el *Virus del jaspeado del tabaco* (TEV) y el *Virus del mosaico de la alfalfa* (AMV) (Bautista-Martínez *et al.*, 2010).

#### **1.4. Los Virus**

Un virus es un conjunto de una o más moléculas de ácidos nucleicos, normalmente envueltos en una o más cápsides de proteína o lipoproteínas, son capaces de organizar su propia replicación dentro de las células de su hospedero (Agrios, 2005). Desde la caracterización del primer virus que afectaba las plantas de tabaco (*Virus del mosaico del tabaco*\_TMV) hasta la actualidad se han descrito cerca de 1000 virus afectan a las plantas (Gergerich *et al.*, 2006).

#### **1.5. Los familia *Geminiviridae* y sus géneros**

Los geminivirus son patógenos de plantas que infectan a una gran variedad de especies vegetales, nombrados así por su morfología única geminada. El genoma consiste en una o dos moléculas pequeñas de DNA de cadena sencilla (DNACs) con tamaños de 2.6 a 3.0 Kb (Gutiérrez 2000; Gallou *et al.*, 2011), el genoma esta encapsidado dentro de las partículas geminadas. De acuerdo a su organización genómica, rango de hospederos y su insecto vector, los geminivirus pertenecen a la familia, *Geminiviridae* y se divide en 4 géneros: *Mastrevirus*, *Curtovirus*, *Topocovirus* y *Begomovirus* (Fauquet y Stanley, 2005)

##### **1.5.1. *Mastrevirus***

El género *Mastrevirus* (especie tipo: *Maize streak virus*\_MSV) podemos encontrar virus en los que su genoma está organizado en una sola molécula y son llamados monopartitas y su tamaño varía de 2.6 a 2.8 kb, codifica para 3 ó 4 posibles proteínas (ORF: V1, V2 y C1, C2), son transmitidos por chicharritas (Hemiptera: *Cicadellidae*) de manera persistente circulativa no propagativa e infectan plantas monocotiledóneas. Se tienen reportadas 11 especies bien definidas del género *Mastrevirus* con alrededor de 61 variantes y 6 especies

tentativas (Fauquet y Stanley, 2005; Agrios, 2005; Fauquet *et al.*, 2008).

### **1.5.2. Curtovirus**

El género *Curtovirus* (especie tipo: *Beet curly top virus*\_BCTV) incluye especies con genomas monopartitas que miden alrededor de 2.9 a 3 kb, codifican de 6 a 7 proteínas dependiendo la especie. Estos virus se limitan al floema de la planta, son transmitidos por chicharritas (Hemiptera: *Cicadellidae*) de manera circulativa no propagativa e infectan plantas dicotiledóneas. Este género tiene 5 especies definidas de las cuales tres se encuentran infectando betabel, una rábano y la otra espinacas, también tiene una especie tentativa relacionada con enfermedades de tomate (*Tomato leaf roll virus*, TLRV) (Fauquet y Stanley, 2005; Agrios, 2005; Fauquet *et al.*, 2008).

### **1.5.3. Topocovirus**

El género *Topocovirus*, (especie tipo: *Tomato pseudo-curly top virus*, TPCTV) fue cambiado del género *Curtovirus* y puesto como un género aparte, tiene una organización genómica similar a los *Curtovirus* pero estos son transmitidos por insectos de la familia *Membracidae* (*Micrutalis malleifera*). El componente único del genoma del TPCTV tiene propiedades tanto de los *Mastrevirus* y de los *Begomovirus* (Briddon, *et al.*, 1996; Fauquet *et al.*, 2008).

### **1.5.4. Begomovirus**

El género *Begomovirus* (especie tipo: *Bean golden yellow mosaic virus*\_BGMV) es el único de la familia en el que podemos encontrar virus con genomas monopartitas y bipartitas, es el más numeroso con 181 especies descritas y 87 especies tentativas, son virus transmitidos por mosca blanca (*Bemisia tabaci*) de manera circulativa e infecta plantas dicotiledóneas. A este grupo pertenecen virus de gran importancia económica que causan pérdidas cuantiosas a los productores agrícolas de muchos países, como el *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* (TYLCV) (Fauquet *et al.*, 2003, Agrios, 2005; Fauquet *et al.*, 2008).

## **1.6. Organización molecular de los Begomovirus**

Los *Geminivirus* del género *Begomovirus*, en su mayoría poseen genomas biparitas con pocos ejemplos monopartitas. En lo referente a los *Begomovirus* bipartitas, su genoma está compuesto de dos moléculas de DNA llamadas componentes A (DNA-A) y B (DNA-B), cada una de las cuales miden entre 2.6 y 2.8 kb (Lazarowitz, 1992, Agrios, 2005), la secuencia nucleotídica de estos dos componentes es bastante distinta, excepto por aproximadamente 200 a 250 nucleótidos de una región no codificante, también llamada región común, que como su nombre lo dice es común en los 2 componentes del virus, estos virus solo infectan plantas dicotiledóneas (Agrios, 2005). En el DNA-A se encuentran cuatro genes, uno en sentido y 3 en sentido complementario que codifican proteínas necesarias para la replicación, transcripción y encapsidación del virus. En el DNA-B se encuentran dos genes uno en sentido y otro en antisentido, estos codifican las proteínas necesarias para el movimiento célula – célula y sistémico (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000) (Figura 1).

### **1.6.1. Región intergénica**

En la RI se localiza una secuencia denominada región común (RC) de aproximadamente 200 a 250 nucleótidos (nt), idéntica para el DNA A y DNA B de un mismo geminivirus pero diferente entre las distintas especies de la familia *Geminiviridae*. Esta RC contiene un elemento de 30 nt con el potencial termodinámico de formar una estructura en horquilla, rica en G-C en el tallo y una secuencia conservada rica en A-T en el asa, la cual contiene el sitio de reinicio de la replicación. Además, en la RC se encuentran dos promotores para la transcripción del gen en sentido (CP) y en sentido complementario para los genes Rep y AC4, los genes REn y TrAP que están en sentido complementario son transcritos desde un promotor que se encuentra ubicado en el gen Rep. (Hanley-Bowdoin *et al.*, 2000).

### **1.6.2. Gen CP**

El Gen CP codifica para la proteína de la cápside, es la proteína más

abundante durante una infección, protege al virión durante su paso por el vector y parece estar relacionada con la especificidad del mismo (Ascencio-Ibañez *et al.*, 2000), en TYLCV es esencial para su infectividad, la CP se une y envuelve al genoma de TYLCV, esta se localiza en el núcleo de las células infectadas y se ha encontrado en el nucléolo. Se han hecho experimentos en donde se demuestra la capacidad de exportar tanto ssDNA como DNA de cadena doble (sdDNA) (Gronenborn, 2007).

### **1.6.3. Gen Rep**

Rep es una proteína que se encuentra en todos los geminivirus. Es una proteína de 40kDa requerida para la replicación, que contiene una secuencia de unión específica a DNA (Fontes *et al.*, 1992; Lazarowitz, 1992; Sanz-Burgos y Gutiérrez, 1998., Castellano *et al.*, 1999) y actividad endonucleolítica sitio específica (Heyraud-Nitschke *et al.*, 1995). Rep también tiene la capacidad de interactuar con ella misma, formando oligómeros en solución o cuando se une a DNA (Orozco *et al.*, 1997; Horvath *et al.*, 1998; Sanz-Burgos y Gutiérrez, 1998; Castellano *et al.*, 1999).

### **1.6.4. Gen TrAP**

El gen TrAP codifica para una proteína que transactiva la expresión del gen de la proteína de la cápside y de la proteína de movimiento (MP)(Gronenborn, 2007). Dicha transactivación parece ser mediada por elementos de secuencia discretos que actúan en *cis* y que son específicos para la acción de *TrAP* (Sunter y Bisaro, 1992).

### **1.6.5. Gen REn**

El gen REn codifica para la proteína potenciadora de la replicación (REn) la cual interactúa con la proteína *Rep* para hacer más eficiente la replicación (su ausencia reduce más de 50 veces la tasa replicativa del virus) (Hanley *et al.*, 2000), también interactúa consigo misma y con otras proteínas del mismo virus (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Settlege *et al.*, 2005).

### 1.6.7. Gen AC4

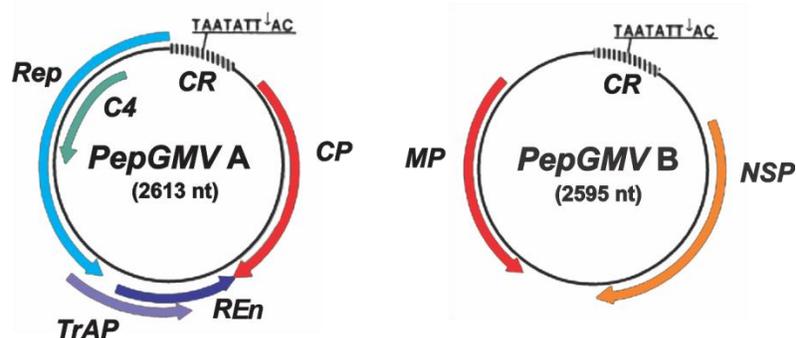
En TYLCV se ha identificado que el gen C4 codifica una proteína de movimiento específica para su hospedante y que a su vez está involucrada en la severidad de síntomas de la enfermedad. En los Begomovirus bipartitas se desconoce su función, recientemente se ha sugerido que la función de esta proteína del *Virus del mosaico de la cassava de Africa* (ACMV) junto con la Rep inducen la necrosis en *N. benthamiana* (Van Wezel et al., 2002).

### 1.6.8. Gen NSP

El gen NSP codifica para la proteína de transporte nuclear (Nuclear Shuttle Protein\_NSP), la cual facilita el movimiento del DNA viral del núcleo hacia el citoplasma (Sanderfoot y Lazarowits, 1996).

### 1.6.9. Gen MP

El gen MP codifica para una proteína involucrada en el movimiento célula a célula, llamada proteína de movimiento, a esta proteína se ha localizado entre la pared celular y la membrana plasmática. También existe evidencia de que la MP estaría involucrada en el desarrollo de síntomas, al menos en el *Virus del enrollamiento de la hoja del squasch* (SqLCV) (Lazarowitz, 1992).

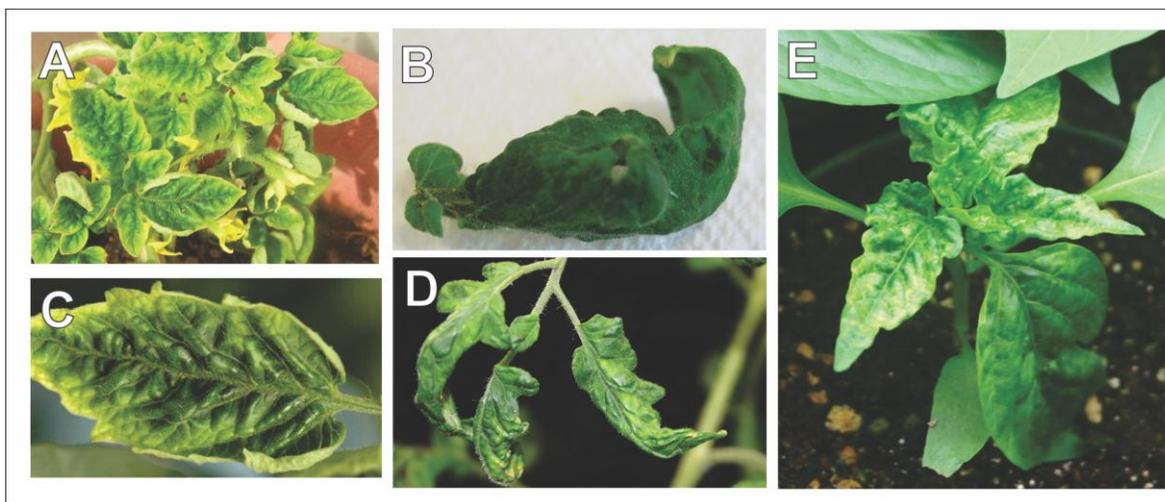


**Figura 1. Representación gráfica del genoma de un Begomovirus bipartita (PepGMV).** En el componente A en antisentido se encuentra el gen Rep codifica para la proteína iniciadora de la replicación; TrAP, codifica para la proteína activadora de la

replicación; REn amplifica para la proteína potenciadora de la replicación y el gen AC4; en sentido del componente A encontramos el gen CP que amplifica para la proteína de la cápside. En el componente B en antisentido encontramos el gen MP que codifica para la proteína de movimiento y en sentido al gen NSP que codifica para la proteína de movimiento del núcleo.

### 1.7. Síntomas de las enfermedades causadas por *Begomovirus*

Entre los síntomas que presentan estos virus son deformación de hojas, mosaicos amarillos, dorados, arrugamiento de hojas, acucharamiento, clorosis, enanismo, deformación de frutos, puntas moradas (Agrios, 2005) (Figura 2).



**Figura 2. Síntomas causados por *Begomovirus* en tomate y chile.** A: enanismo y amarillamiento; B: arrugamiento, deformación de folíolos; C: amarillamiento; D: hoja de tomate presentando mosaicos; E: planta de chile con mosaico amarillo, ampollamiento. B), D), E) síntomas provocados por PepGMV.

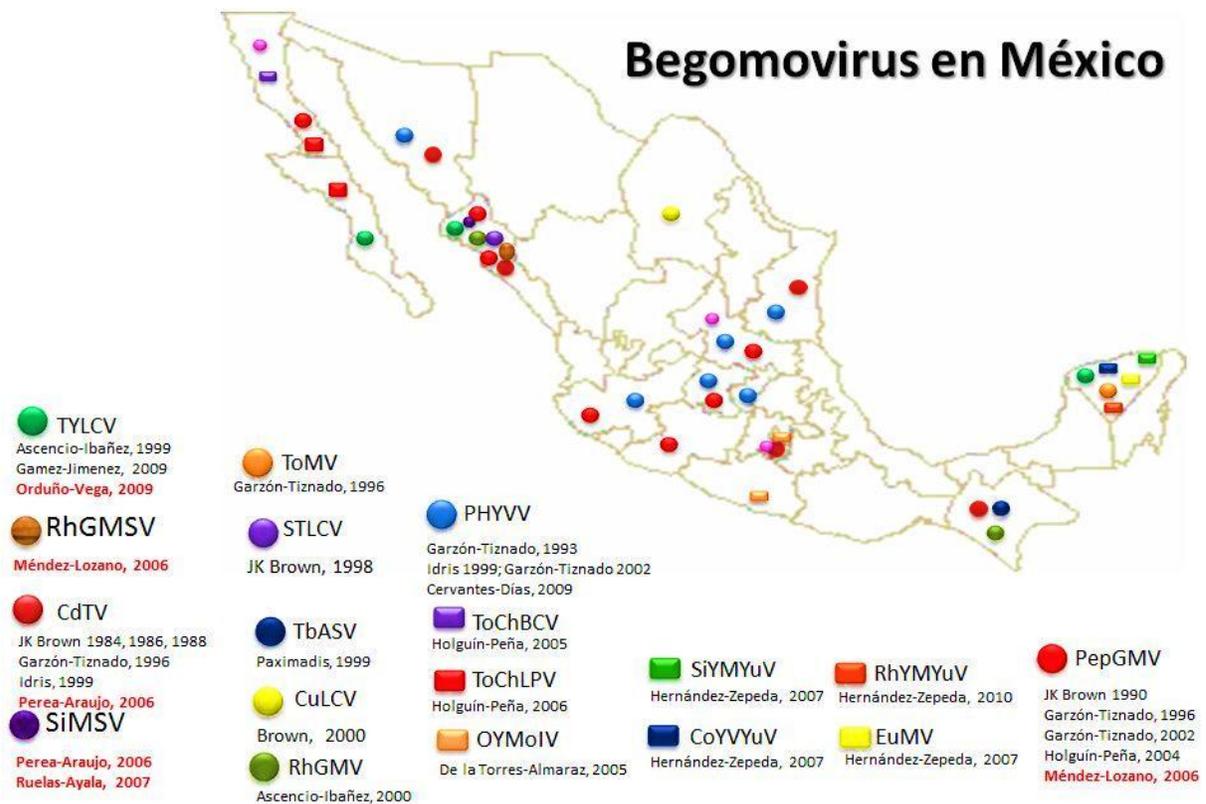
### 1.8. *Begomovirus* en México

En México, se han observado enfermedades como las provocadas por *Begomovirus* desde finales de los 70's (Gallegos, 1978), sin embargo el primer reporte de *Begomovirus* se realizó en 1984, al encontrarse una enfermedad en tomate llamada enfermedad chino del tomate, en el norte de Sinaloa, se aislaron partículas virales y observadas al microscopio de apariencia geminada (Brown et

al., 1984), se caracterizó en 1986, nombrándose como *Virus del chino del tomate* (*Chino del tomate virus*, CdTV) (Brown et al., 1988). En 1990 se identificó un nuevo *Begomovirus* presentando una enfermedad de mosaico dorado en chile y tomate aislado en campos de cultivo del norte de Sinaloa, nombrándolo como *Virus del mosaico dorado del serrano* (*Serrano golden mosaic virus*, SGMV) conocido en la actualidad como *Virus del mosaico dorado del chile* (*Pepper golden mosaic virus*, PepGMV) (Brown et al., 1990; Fauquet et al., 2008). En 1993, se reportó por primera el *Virus huasteco del chile* (*Pepper huasteco virus*, PHV) conocido actualmente como *Virus huasteco de la vena amarilla del chile* (*Pepper huasteco yellow vein virus*, PHYVV) aislado de chiles colectados del estado de Tamaulipas (Garzón-Tiznado, 1993; Torres-Pacheco et al., 1993; Torres-Pacheco et al., 1996). En 1996 se reportó la presencia de CdTV en el Estado de Chiapas, Morelos, Tamaulipas y se encontró un nuevo virus llamado *Virus del chile jalapeño* (*Pepper jalapeño virus*, PJV), infectando tomate y chiles en Sinaloa y Michoacán, actualmente *PJV* es considerado una especie de PepGMV (Pacheco et al., 1996; Fauquet et al., 2008). En 1998, se reportó por primera vez el *Virus del moteado del tomate* (*Tomato Mottle Virus*, ToMV), infectando tomates en el estado de Yucatán y al *Virus de la hoja enrollada del tomate de Sinaloa* (*Sinaloa tomato leaf curl virus*, STLCV) infectando tomate y chile en la región (Garrido-Ramírez y Gilbertson, 1998; Idris y Brown, 1998). En 1999, se reportó la presencia de los virus CdTV y PHYVV infectando tomates en invernadero en el estado de Sonora, se detectó por primera vez la presencia del *Virus del enrollamiento de la hoja amarilla del tomate* (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) un *Begomovirus* monopartita, infectando tomate en el estado de Yucatán. En Chiapas se reportó un nuevo *Begomovirus* provisionalmente nombrado como *Virus del enanismo apical del tabaco* (*Tobacco apical stunt virus*, TbASV) y PepGMV infectando tabaco (Idris et al., 1999; Ascencio-Ibáñez et al., 1999; Paximadis et al., 1999). En el 2000 se describió un nuevo *Begomovirus* infectando calabaza, melón amarillo y muskmelon, en el estado de Coahuila, conociéndolo como el *Virus del enrollamiento de la hoja de las cucurbitáceas* (*Cucurbit leaf curl virus*, CuLCV) (Brown et al., 2000). En el 2002 en el estado de Chiapas se reportó el *Virus del mosaico dorado de la rhinchosia*

(*Rhynchosia golden mosaic virus*, RhGMV) infectando tabaco, este fue la primera vez que este virus se encuentra asociado a un cultivo de importancia económica y se reportó la presencia de PHYV y PepGMV infectando chile y tomate en los estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí y se detectó un virus relacionado con PHYV infectando *Heliantus sp* y *Carica papaya* y a PepGMV infectando diversas plantas como: *Cucurbita spp*, *Phaseolus vulgaris*, *Citrulus vulgaris* y *Gossyium hirsutum*, la especie *Solanum rostratum*, hospedó tanto a PHYV como a PePGMV (Ascencio-Ibáñez *et al.*, 2002; Garzón-Tiznado *et al.*, 2002). En el 2003 se reportó por primera vez en México a un virus asociado con el enrollamiento de la hoja de tomate, en Baja California, con un 93% de identidad con el *Virus de enrollamiento severo de la hoja del tomate (Tomato sever leaf curl virus*, ToSLCV) (Holguín-Peña *et al.*, 2003). En el 2004, se reportó a PePGMV infectando tomate en cultivos de Baja California y se analizó su rango de hospedantes pudiendo infectar solo a plantas de la familia *Solanaceae* como tomate, chile y toloache (Holguín-Peña *et al.*, 2004). En el 2005, se identificó un nuevo *Begomovirus* causando enchinamiento en hojas de tomate en el estado de Baja California llamado tentativamente como *Virus chino del tomate de Baja California (Tomato chino Baja California virus*, ToChBCV) ( Holguín-Peña *et al.*, 2005). En el 2006 se reportaron una diversidad de *Begomovirus* en diferentes estados del país, en los estados de Guerrero y Morelos se reportó un nuevo *Begomovirus* induciendo amarillamiento y moteado en los cultivos de okra, se le propuso el nombre de *Virus del moteado amarillo de la okra de Iguala (Okra yellow mottle Iguala virus*, OYMoIV); en Baja California se identificó una nueva variante del *Virus del chino del tomate (Tomato chino la paz Virus*, ToChLPV); en Sinaloa una variante de RhGMV infectando plantas de soya y girasol, así como PepGMV infectando el cultivo de soya sugiriendo ser una variante distinta adaptada a leguminosas y se reportó a TYLCV en tomate; en San Luis Potosí y Morelos se reportó ToSLCV (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2006; Gámez-Jiménez, *et al.*, 2006; Holguín-Peña *et al.*, 2006; Méndez-Lozano *et al.*, 2006; Mauricio-Castillo *et al.*, 2006). En el 2007 se reportaron dos nuevos *Begomovirus* bipartitas infectando plantas *Malváceas* en Yucatán llamados como *Virus del mosaico amarillo de la*

sida de Yucatán (*Sida yellow mosaic Yucatán Virus*, SiYMYuV) y el *Virus de la vena amarilla del corchorus de Yucatán* (*Corchorus yellow vein Yucatán Virus*, CoYVYuV) (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). En ese mismo año se reportó una nueva especie tentativa el *Virus del mosaico de la euphorbia* (*Eyphorbia mosaic virus*, EuMV) aislado de plantas de *Euphorbia heterophylla*, en el Estado de Yucatán (Hernández-Zepeda *et al.*, 2007). En 2009, se reportó a TYLCV infectando tomatillo en el estado de Sinaloa, considerando a este cultivo como un nuevo hospedante de TYLCV; en el estado de México se reportó la presencia de PHYVV en plantas de *Alstroemeria* (*Alstroemeria* sp), (Gámez-Jiménez *et al.*, 2009; Cervantes-Díaz, 2009). En el 2010 en el estado de Yucatán se caracterizó un nuevo *Begomovirus* recombinante asociado a dos malezas *Fabáceas* llamado como el *Virus del mosaico amarillo de la Rhynconsia de Yucatán* (*Rhynchosia yellow mosaic Yucatán virus*, RhYMYuV); en el estado de Baja California Sur se reportó por primera vez a TYLCV y ToChLPV coinfectando plantas de chile (Hernández-Zepeda *et al.*, 2010; Cárdenas-Conejo *et al.*, 2010) (Figura 3).



**Figura 3. Distribución geográfica de *Begomovirus* en cultivos agrícolas y malezas reportados en México.**

### **1.9. *Virus del mosaico dorado del chile***

El *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV) fue reportado por primera vez en Texas en 1987 por Stenger, conocido hasta en ese momento como un geminivirus infectando chile en campos de Texas (*Texas pepper geminivirus*, TPGV) encontrándolo en plantas de chiles jalapeños, así como en otras plantas como *Datura stramonium*, *Solanum lycopersicum*, *Lycopersicum peruvianum*, *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana clevelandii*, y *physalis wrightii*. En 1990, Brown y col., describieron otro *Begomovirus* conocido en ese momento como *Virus del mosaico dorado del serrano* (*Serrano golden mosaic virus*, SGMV), encontrando infectando a chile y tomate en el estado de Sinaloa (Brown y Poulos, 1990). En 1996, se encontró que el *Virus del chile jalapeño* (PJV) estaba involucrado con la enfermedad llamada rizado amarillo (Torres-Pacheco *et al.*, 1996). En 2000, Lotrakul y col., reportaron al *Texas pepper virus* en chile tabasco y habanero en Costa Rica (Lotrakul *et al.*, 2000). Todos estos virus son considerados como variantes del PePGMV (McLaughlin *et al.*, 2008). Este virus también se ha encontrado infectando tomatillo en el estado de Sinaloa (Méndez-Lozano *et al.*, 2001 y 2006). En el 2004 se encontró a PepGMV infectando cultivos de tomate, chile y malezas en Baja California Sur (Holguín-Peña *et al.*, 2004). Recientemente se ha encontrado infectando este mismo virus a cultivos de chile y tomate en Belice (McLaughlin *et al.*, 2008).

### **1.10. Resistencia natural en plantas**

Las plantas durante su evolución han desarrollado mecanismos de defensa que le permiten sobrevivir en condiciones de estrés abiótico como condiciones de sequía y salinidad, y bióticos como la respuesta de defensa ante el ataque por algún patógeno. Dentro de estos mecanismos podemos mencionar la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y la Resistencia Sistémica Inducida (RSI).

### **1.11. Resistencia sistémica adquirida (RSA)**

La RSA se refiere al desarrollo de resistencia contra un patógeno virulento en una zona distal y posterior a la interacción inicial planta-patógeno. Dicha interacción inicial generalmente se manifiesta de manera local a través de una respuesta hipersensible (RH) (Walters y Heil, 2007; Vlot *et al.*, 2008).

### **1.12. Resistencia sistémica inducida (RSI)**

Es aquella observada en plantas que se manifiesta como respuesta a la interacción planta-microorganismo benéfico en tejidos distantes a la interacción (Pieterse *et al.*, 2001; Pozo y Azcón-Aguilar, 2007; Van Loon, 2007; Vlot *et al.*, 2008). A esta resistencia se le denomina Resistencia Sistémica Inducida (Walters y Heil, 2007) y es capaz de permitir a la planta disminuir las afecciones por diversos patógenos (Pieterse *et al.*, 2002). Este tipo de resistencia se encuentra asociada a la colonización del sistema radicular de las plantas por rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) logrando inducir esta respuesta a larga distancia, fenotípicamente similar a la RSA (Van Loon, 1997; Pieterse *et al.*, 2001; Choudhary *et al.*, 2007; Van *et al.*, 2008).

### **1.13. Preacondicionamiento (priming)**

Recientemente, se ha descrito una condición fisiológica en las plantas que les permite desarrollar una respuesta de defensa más eficiente o más rápida ante estreses bióticos o abióticos, a la cual se le ha denominado “priming state”, refiriéndose a un estado de preacondicionamiento o sensibilización asociada a un organismo benéfico y desarrollada previo al ataque de un patógeno (Conrath *et al.*, 2006). Se cree que los genes que se expresan en la parte aérea de la planta bajo condiciones de micorrización tiene una función en el preacondicionamiento, lo cual trae como consecuencia una disminución en el daño causado por patógenos de parte aérea en plantas micorrizadas con respecto a las no micorrizadas (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). No se ha definido si este proceso de preacondicionamiento pudiera ser parte de un mecanismo de resistencia sistémica inducida.

#### **1.14. Hongos micorrízicos arbusculares (HMA)**

Estos microorganismos, son simbioses obligados del phylum Glomeromycota, el término micorriza (mykos= Hongo, riza= raíz) fue acuñado por primera vez por Frank (1885) para describir la simbiosis que existe entre un hongo del suelo y las raíces de las plantas, la MA es el tipo de asociación micorrízica más común y se ha estimado que se da en 80% de todas las plantas terrestres. Varias asociaciones micorrízicas han sido identificadas basándose en el tipo de hongo involucrado y las estructuras producidas por la combinación raíz-hongo, algunos ejemplos son: las micorrizas arbusculares, ectomicorrizas, ectoendomicorrizas, ericoides, arbutoides, orquídeales y monotropoides, son bastante antiguas (>450 millones de años), con un gran periodo de coevolución con las plantas e indican una ventaja considerable para ambas partes de la simbiosis, estos simbioses son biotrofos y usualmente mutualistas basados en la transferencia de compuestos de carbono por parte de la planta y varios nutrientes del suelo por parte del hongo hacia la planta, principalmente fósforo, pero también nitrógeno y zinc, (Smith *et al.*, 2011), el establecimiento de esta asociación, le permite a la planta adquirir nutrientes más allá de la zona de depleción que rodea a las raíces e incrementar el área de absorción en relación con las raíces no colonizadas.

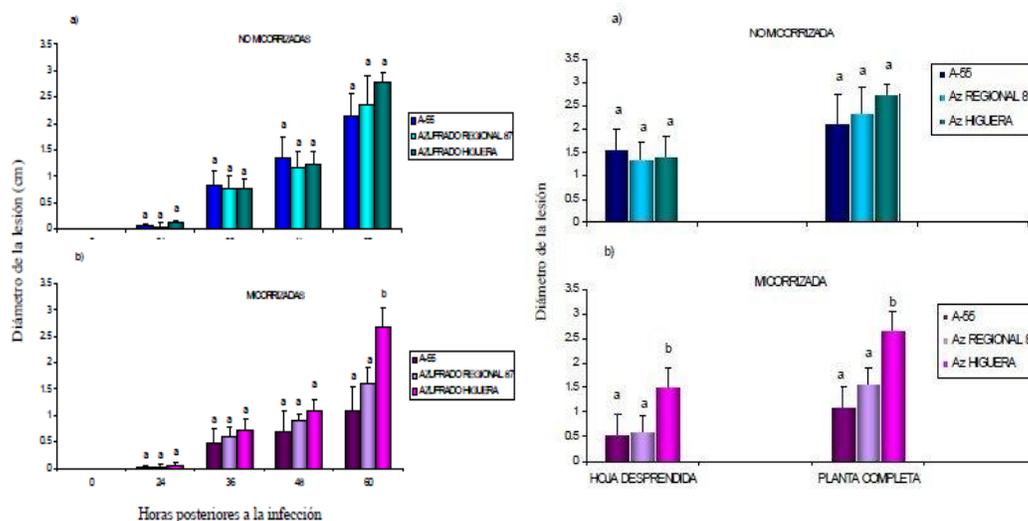
#### **1.15. Hongos y su relación contra patógenos de la parte aérea de la planta.**

Por otro lado, se ha demostrado que además de la captación de nutrientes, esta asociación simbiótica es útil para permitir a la planta tolerar de mejor manera ciertas afecciones por patógenos de parte aérea en enfermedades causadas por fitoplasmas (Lingua *et al.*, 2002; García-Chapa, 2004; Kaminska *et al.*, 2010), por *Alternaria solani* (Fritz *et al.*, 2006; de la Noval *et al.*, 2007; Khalaf *et al.*, 2011) contra *Phytophthora parasítica* (Cordier *et al.*, 1998) y *Phytophthora infestans* en papa (Gallou *et al.*, 2011).

En el laboratorio de interacción Microorganismo-Planta, del CIIDIR Sinaloa dirigido por la Dra. Melina López Meyer, se han realizado varios trabajos acerca de

la tolerancia brindada por micorrización de plantas contra patógenos de la parte aérea.

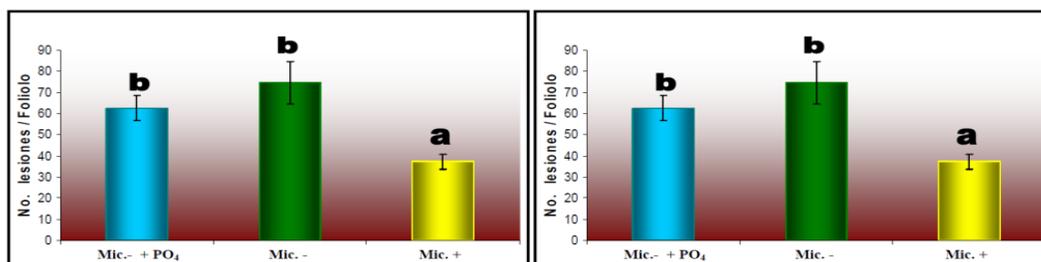
En el 2008, Mora-Romero, trabajo con variedades de frijol A 55, Azufrado regional 87 y Azufrado Higuera, describió y comparó las lesiones causadas por el hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, en plantas micorrizadas y no micorrizadas, el efecto de este patógeno en plantas no micorrizadas de las diferentes variedades no presentó diferencias estadísticas. Sin embargo, las respuestas hacia el patógeno en las variedades de frijol (A55 y Azufrado) micorrizadas, las lesiones causadas por *Sclerotinia sclerotiorum* disminuyeron en las plantas micorrizadas. En este trabajo se demuestra que la tolerancia hacia *Sclerotinia sclerotiorum* inducida por micorrización es factible (figura 4), sin embargo se requiere más estudios para la determinación de la expresión de genes involucrados en la tolerancia inducida por micorrización (Mora-Romero, 2008).



**Figura 4. Cinética de desarrollo de las lesiones en hojas de plantas de frijol.** Variedades A-55, azufrado Regional 87 y Azufrado Higuera en plantas a) no micorrizadas y b) en plantas micorrizadas en el experimento definitivo de planta completa. Los diferentes tratamientos representados por barras, con la misma letra no difieren al nivel del 5% de acuerdo al procedimiento de Tuckey. (Extraído de Mora-Romero, 2008).

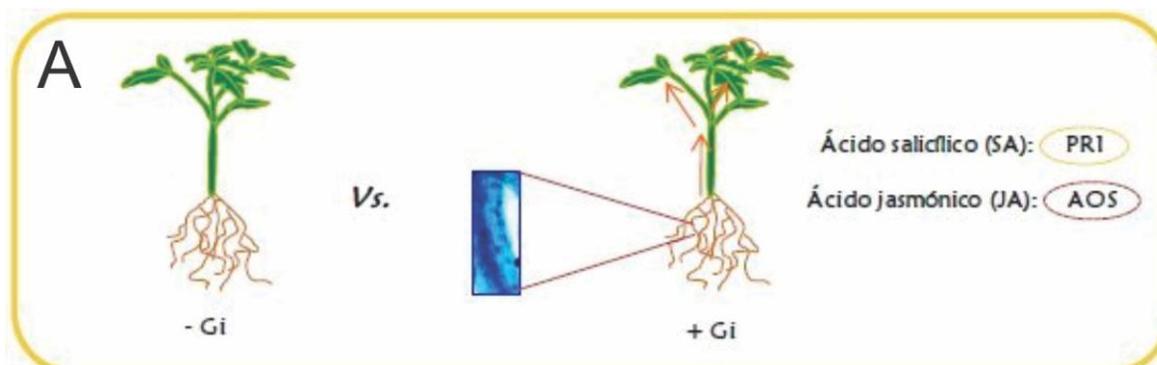
Galindo Flores en el 2008, analizó la tolerancia inducida por micorrización en plantas de tomate contra el patógeno *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria.

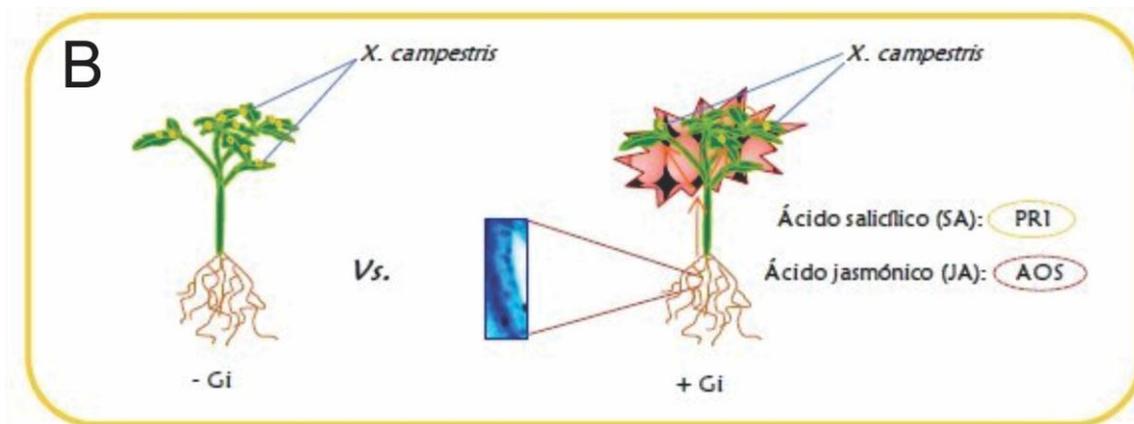
Observando que el número de lesiones causada por este patógeno fue significativamente menor en plantas de tomate micorrizadas a comparación de aquellas que no estaban micorrizadas (Figura 5), (Galindo Flores, 2008).



**Figura 5. Número de lesiones por foliolo causado por *X. campestris* pv. *vesicatoria*.** (a) Primer bioensayo y (b) Segundo bioensayo. Mic-PO<sub>4</sub>+, (No micorrizado, con fosfato completo), Mic-, (no micorrizado, con bajo fosfato), Mic+ (micorrizado, con bajo fosfato). Superíndices (a y b) distintos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Barras de error= promedio  $\pm$  DE. (Extraído de Galindo-Flores, 2008).

Cervantes Gámez en el 2010 estudió el mecanismo de resistencia sistémica presente en las interacciones descritas por Mora-Romero y Galindo-Flores en el 2008, sugiriendo que la tolerancia inducida por *G. intrarradices* en la parte aérea de tomate variedad Missouri es del tipo de la RSA, asociada a la ruta del ácido salicílico (AS) y proponen un modelo de la resistencia inducida y preacondicionamiento de las plantas de frijol y de tomate colonizadas con *G. intrarradices* (actualmente *R. intraradices*) cuando se encuentran infectadas con *X. campestris*. (Figura. 6, Cervantes-Gámez, 2010)





**Figura 6. Modelos propuestos por Cervantes-Gómez.** A) preconditionamiento inducido por *G. intrarradices* en tomate; b) tolerancia inducida por *G. intrarradices* en plantas de tomate. -Gi: tomate sin colonizar, +Gi tomate colonizado.

## 2. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades causadas por *Begomovirus* están ampliamente distribuidas en todo el territorio nacional desde la península de Yucatán hasta la península de Baja California. En el estado de Sinaloa, el impacto que han tenido los begomovirus en el cultivo del tomate ha sido históricamente uno de los problemas más importantes, desde los 80's con la enfermedad conocida como el chino del tomate hasta la actualidad con efectos devastadores en el 2005 con la aparición del TYLCV ocasionando daños hasta del 100%. Su persistencia y transmisión crean un escenario difícil de tratar ya que no existe tratamiento químico contra las infecciones virales. Por lo que consideramos necesario buscar estrategias que permitan el control de las enfermedades virales. Se ha reportado que las plantas de tomate tienen la capacidad de establecer asociaciones simbióticas con hongos micorrízicos arbusculares como *R. intraradices*, lo que les confiere un aumento en su capacidad de absorción de nutrientes y minerales. Recientemente se ha observado que esta asociación induce un efecto protector inespecífico contra patógenos de la parte aérea como *X. campestris* en tomate y *S. sclerotiorum* en frijol. Con el afán de encontrar alternativas para el manejo integrado en la agricultura, se propone utilizar hongos micorrízicos arbusculares por sus antecedentes de conferir tolerancia hacia patógenos de la parte aérea de tal manera de inducir tolerancia contra enfermedades provocadas por virus del género *Begomovirus*.

### **3. HIPÓTESIS**

La colonización del hongo micorrízico arbuscular "*Rhizophagus intraradices*" en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) induce tolerancia contra el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV).

### **4. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la tolerancia inducida por "*Rhizophagus intraradices*" en tomate (*Solanum lycopersicum*) contra el *Virus del mosaico dorado del chile* (PepGMV).

#### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Analizar la infectividad de PepGMV en plantas de tomate colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.

Determinar la producción de botones, flores y frutos en plantas de tomate micorrizadas con *Rhizophagus intraradices* e infectadas con PepGMV.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1. Germinación de plantas de tomate**

Semillas de tomate variedad Missouri, fueron lavadas por 2 minutos con etanol al 70%, posteriormente con cloro al 30% por 15 minutos con agitación y finalmente se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. Se colocaron las semillas sobre sustrato de arena y vermiculita (1:3) para su germinación en una cámara bioclimática a 24°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

### **5.2. Preparación de Medio M para mantenimiento de raíces transformadas de zanahoria (*Daucus carota*).**

El medio M se preparó con MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 731 mg; KNO<sub>3</sub>, 80 mg; KCL, 65 mg; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.8 mg; Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 288 mg; Na-FeEDTA, 8 mg; KI, 0.75 mg; MnCl<sub>2</sub> 4H<sub>2</sub>O, 6 mg; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, 2.658 mg; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 1.5 mg; CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O, 0.13 mg; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 4H<sub>2</sub>O, 0.0024 mg; glicina, 3 mg; tiamina HCL, 0.1 mg; piridoxina HCL, 0.1 mg; ácido nicotínico, 0.5 mg; mioinositol, 50 mg; sacarosa, 10 g en un litro ajustado a pH 5.5 con KOH, descrita por Chabot *et al.*, 1992. Una vez que se midió el pH se le adiciono gel-rite para solidificación del medio 3g/L. Preparado el medio se esterilizó en autoclave con una presión de 20 psi por 15 minutos, se dejó enfriar en campana de flujo laminar y se vertió en placas petri normales, hasta llenar la placa, se dejó secar y se guardaron a 4°C, hasta su uso.

### **5.3. Preparación de placas divididas para mantenimiento de *Rhizophagus intraradices***

Para las placas divididas se utilizó medio M preparado como se indicó en la sección 5.2, con la diferencia de que en una sección de la placa se le agregó medio M sin sacarosa y en la otra sección con sacarosa.

### **5.4. Obtención de esporas de *Rhizophagus intraradices***

Las esporas para este trabajo fueron proporcionadas por el Dr. Ignacio E. Maldonado Mendoza, a cargo del laboratorio Ecología Molecular de la Rizosfera del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, las cuales se mantienen en medio M con raíces

transformadas de zanahoria, como lo describen Mora-Romero y Galindo Flores (Mora-Romero., 2008; Galindo-Flores., 2008).

### **5.5. Purificación de esporas de Medio M**

Para la purificación de esporas se utilizó la placa completa de raíces transformadas de zanahoria con *Rhizophagus intraradices*, se colocó en un vaso de precipitado de 1 L al cual se le añadió 200 ml de una solución de citrato de sodio 10 mM pH 6.8 y se trituro utilizando una licuadora marca Blender, para liberar las esporas al medio con agar. Después se separó por filtración utilizando una malla de 250 micras para quitar trozos grandes de raíces y posteriormente con una malla de 50 micras se eliminó el exceso de citrato de sodio y se resuspendió en un tubo falcon, como lo describe Mora-Romero (2008) y Galindo Flores (2008).

### **5.5. Cuantificación de esporas**

Una vez purificadas, se tomaron, tres alícuotas de 50  $\mu$ l y se cuantificó las esporas mediante un estereoscopio.

### **5.6. Fijación y tinción de raíces colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.**

Se sacrificaron plantas micorrizadas de los diferentes bioensayos, se cortaron las raíces de la parte aérea de la planta de tomate, luego se sumergieron en una solución de etanol al 50% durante dos horas y se colocaron en KOH al 20%. Se incubaron por dos días y posteriormente se transfirieron a una solución de HCL 0.05% por una hora y se tiñeron con una solución de azul de tripano y lactoglicerol por dos días y se almacenaron en lactoglicerol (agua:ácido láctico:glicerol 1:1:1).

### **5.7. Determinación del porcentaje de colonización de raíces de tomate**

El porcentaje de colonización se realizó mediante el método de intersección a la línea (Brundrett *et al.*, 1996) colocándose trozos de 5 cm de longitud aproximadamente sobre una caja Petri, posteriormente se distribuyó uniformemente en una cuadrícula de 100 cm<sup>2</sup> cubriendo toda la caja Petri. Se cuantificaron el número de estructuras fúngicas (micelio, vesículas, arbusculos) que se cruzaban sobre las líneas verticales y horizontales de las cajas Petri

contenidas en las estructuras de la raíz. El porcentaje de colonización se obtuvo al dividir la sumatoria de las estructuras fúngicas totales sobre las estructuras de raíces totales y se multiplicó por 100.

### 5.8. Preparación de soluciones nutritivas

Para la realización de estas soluciones se tomó como base la solución Hoagland's. La solución consistió en:  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  [2.5 mM],  $\text{KNO}_3$  [2.5 mM],  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [1mM],  $\text{NaFeEDTA}$  [50 $\mu\text{M}$ ],  $\text{H}_2\text{BO}_3$  [10 $\mu\text{M}$ ],  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  [0.2 $\mu\text{M}$ ],  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  [1 $\mu\text{M}$ ],  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  [2 $\mu\text{M}$ ],  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  [0.5 $\mu\text{M}$ ],  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  [0.2 $\mu\text{M}$ ],  $\text{HCL}$  [25  $\mu\text{M}$ ],  $\text{MES buffer}$  [0.5 mM]. La solución nutritiva para las plantas micorrizadas (Myc+) y no micorrizadas (Myc-) se adicionó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [20  $\mu\text{M}$ ] mientras que la solución nutritiva para las plantas no micorrizadas con fosfato normal (Myc-Pho+) se adicionó [200  $\mu\text{M}$ ].

### 5.9. Obtención de DNA de PepGMV

Las clonas utilizadas para bombardear correspondieron a dímeros de PepGMV contruidos y descritos por Carrillo-Tripp (2007) y proporcionados por el Dr. Rafael Rivera Bustamante, Laboratorio de Virología Vegetal del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato (Figura 7).

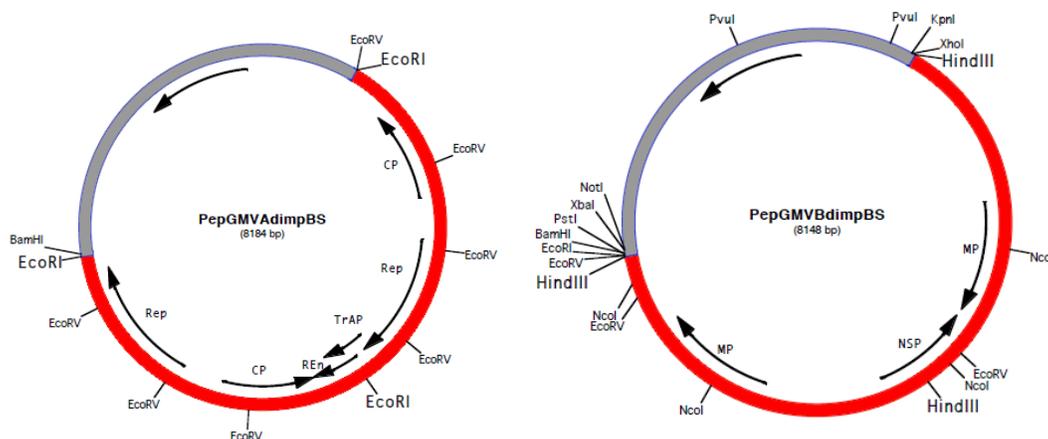


Figura 7. Representación gráfica de los dímeros de PepGMV A y PepGMV B. (Carrillo-Tripp, 2006).

### **5.10. Extracción de DNA plasmídico**

Se centrifugó 1.5 ml de medio LB con la bacteria *E. coli* en un tubo Eppendorf de 1.5 ml a 13 000 rpm por un minuto y se decantó el sobrenadante, este procedimiento se realizó por duplicado. Una vez obtenida la pastilla se le adicionó 0.25 ml de solución 1 (50 mM Glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM tris HCL pH 8.0) y se mezcló en vortex, hasta que la pastilla fue homogénea. Se le agregó 0.25 ml de solución 2 (75ml de H<sub>2</sub>O, 20 mg de NaOH [1N], 5 ml de SDS [20%] m/V), se agitó por inversión de 5 a 10 veces, después se le agregó 0.35 ml de la solución 3 (24.6g de acetato de sodio, 40 ml de H<sub>2</sub>O y se ajustó el pH a 8.0 con ácido acético glacial y se aforó a 100 ml con H<sub>2</sub>O), posteriormente se centrifugó a 13 000 por 8 minutos, se transfirió el sobrenadante a otro tubo Eppendorf , se le agregó 0.8 ml de etanol absoluto para precipitar el DNA, se centrifugó a 13 000 por 8 minutos y se decantó el sobrenadante, después se le agregó 1 ml de etanol 70% y se centrifugó a 13 000 rpm por 3 minutos. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, finalmente el DNA se resuspendió en 30 ml de H<sub>2</sub>O.

### **5.11. Electroforesis en gel para la visualización del DNA**

Para la electroforesis en gel se preparó una solución de agarosa al 1 o 2% (dependió del uso) en TAE 1X, se calentó hasta que la agarosa se disolvió, se vertió en bases propias de las cámaras de electroforesis. Para marcaje del DNA se utilizó buffer de carga adicionado de GelRed (Biotium, cat. 41003). Se cargaron 2 µl de DNA con 2 ml de buffer de carga. Se corrió en una cámara de electroforesis con buffer TAE 1X a 80 V durante 30 min. Se visualizó en un foto documentador de imágenes mediante el software Doc it.

### **5.12. Limpieza de DNA.**

El DNA se resuspendió con 200 µl de agua y 200 µl de cloroformo, se mezcló en vortex, por 10 segundos, se centrifugó a 12000 g, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, y se le agregaron 0.8 volúmenes de isopropanol y 10% del total del volumen de acetato de sodio [3M] y se incubó a -20°C por 30 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000g, se desechó el sobrenadante por

decantación, la pastilla se lavó con 500 ml de etanol 70%, se centrifugó a 12000g y se desechó el sobrenadante por decantación, y finalmente se resuspendió en 15 ml. Se verificó su integridad y calidad por electroforesis en gel.

### **5.13. Cuantificación por espectrofotometría**

Se tomaron 5  $\mu$ l de DNA y se diluyó en 995  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O destilada estéril, utilizando 1 ml de agua estéril como blanco, se cuantificó en el espectrofotómetro cada muestra de DNA, de acuerdo al protocolo según Sambrook (1989), se midió en las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm. Las lecturas a 260 nm permitió calcular la concentración de DNA en la muestra, una densidad óptica de 1 correspondió aproximadamente a 50 mg/ml de DNA para DNA de doble cadena y 40 mg/ml de DNA o RNA de cadena sencilla. La relación entre las lecturas de 260 y 280 nm (OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>) nos proporciona un estimado de la pureza de nuestro DNA. Valores entre 1.8 y 2.0 fueron considerados puros. Si hubiera contaminación con proteínas o fenoles el producto de OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> serán significativamente menores. (Sambrook, 1989).

### **5.14. Preparación de partículas de Tungsteno**

Para la preparación de partículas de Tungsteno se siguió la siguiente metodología: Se tomó 10 mg de partículas de Tungsteno, se les agregó 2 ml de ácido nítrico [0.1N], se sonicó en tubos de vidrio corex por 60 min, posteriormente se centrifugaron a 10 000 rpm (centrifuga eppendorf 5424) por 10 minutos, se desechó el ácido y se le adicionó 1 ml de etanol absoluto, se sonicó y mezcló en tubos corex, hasta que fuera homogéneo, posteriormente se centrifugó por 15 segundos a 12 000 rpm (centrifuga eppendorf 5424), luego se hicieron los lavados, primero se desechó el etanol y adicionó 1 ml de agua destilada o de ampolleta. Después se sonicó y alicuotó en 4 tubos con 250  $\mu$ l de partículas a cada uno, al final se le agregó a cada tubo 750  $\mu$ l de agua de ampolleta y se congeló a -20°C.

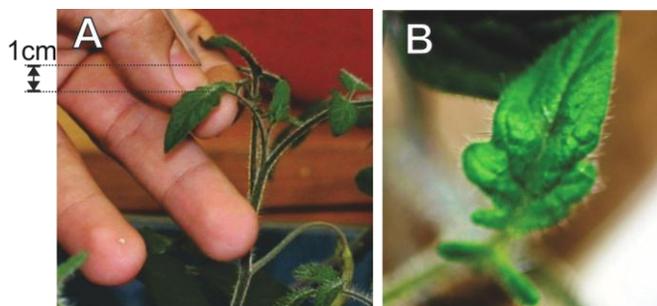
### **5.15. Impregnación de DNA a partículas de Tungsteno**

La impregnación de partículas de Tungsteno se llevó a cabo como lo

establecido en el laboratorio de Virología del CINVESTAV-Irapuato. Brevemente se sonicaron las partículas de tungsteno preparadas, se tomó 50  $\mu$ l de partículas por cada 6 disparos y se colocó en un tubo estéril de 1.5 ml, se les adicionó el DNA, luego 50  $\mu$ l de  $\text{CaCl}_2$  [2.5M] y finalmente se adicionó 20  $\mu$ l de espermidina [0.1M] (Sigma), se mezcló en vortex y se sonicó hasta que quedara homogéneo, posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm (Centrifuga eppendorf 5424) por 15 segundos, se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 500  $\mu$ l de etanol absoluto y se mezcló con un sonicador y se centrifugó por 15 segundos a 10 000 rpm se desechó el etanol y se le adicionó 60  $\mu$ l de etanol absoluto y se guardó en hielo hasta el bombardeo, las plantas se bombardearon con 5  $\mu$ l para cada disparo, se hicieron 2 disparos por planta de tomate.

#### 5.16 Inoculación con pistola de baja presión

La inoculación de las plantas se realizó de acuerdo a lo descrito por Carrillo-Tripp, (2006), se utilizó una pistola portátil de baja presión (Adaptación de diseño y construcción: Ing. Horacio Morales López, CINVESTAV Irapuato) utilizando 120 psi de presión y una distancia aproximada de 1 cm, entre la pistola y la hoja a inocular (Figura 8).



**Figura 8. Inoculación de plantas de tomate mediante pistola portátil.** A) representación de inoculación de una planta de tomate con la pistola de genes de baja presión, la distancia está indicada por una línea, entre la punta y la hoja de tomate. B) Foliolo de tomate inoculado mediante una pistola de baja presión, la flecha indica el sitio de inoculación.

### 5.17. Extracción de DNA

Para la extracción la muestra se congeló en nitrógeno líquido, se trituró utilizando un pistilo estéril por cada muestra, el tejido se colocó en tubo 1.5 ml estéril, se le agregó 0.8 ml de buffer CTAB con 0.2% de mercaptoetanol, se incubó a 65 °C por 10 min, posteriormente se le agregó 0.6 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló en vortex y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 minutos, la fase acuosa se pasó a un nuevo tubo, se le agregó 0.6 ml de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversión 5 a 7 veces, posteriormente se le agregó RNAasa 10 µl [1mg/ml] y se incubó por 30 minutos a 37°C. Luego se le agregó 0.6 ml de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), 0.3 ml de 2-propanol y se mezcló por inversión, se centrifugó a 13 000 rpm por 8 minutos, se desechó el sobrenadante, se lavó la pastilla con 1 ml de etanol 70%, se centrifugó por 4 minutos a 13 000 rpm, se desechó el etanol por decantación y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y se resuspendió el DNA en 30 µl de H<sub>2</sub>O estéril.

### 5.18. Detección molecular de PepGMV en plantas de tomate

La detección de PepGMV en plantas de tomate se realizó por Reacción de Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos para el gen Ren de PepGMV obteniendo un amplicón de 400 pb. Para demostrar la integridad del DNA extraído de las plantas se utilizó un control interno del gen para el factor de elongación alfa 1 (EFalpha 1 F y EFalpha 1R) que amplifican un fragmento de aproximadamente 120 pb (tabla 1) se visualizó en un gel de agarosa al 1%.

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la detección de PepGMV

Nombre	Tamaño (pb)	Secuencia
PepGMV Ren F	400	5'CACGATATGGATCCTAATGCC3'
PepGMV Ren R		5'AGGTGAATTCTTAGCTATCCTG3'
EF alfa1 F	120	5'CTGGTCGAGAGCCTCAAG3
EF alfa 1 R		5'CTCAAGAAGGTCGGTTACAAC3'

### **5.19. Hibridación tipo Southern Blot**

Se utilizó 10 µg de DNA genómico total, y se separó en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente el gel con el DNA se desnaturalizó en solución desnaturalizante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) luego se neutralizó en la solución neutralizante (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCL pH 7.5) y se transfirió a una membrana de nylon Hybond N+ (Amersham), y se fijó por UV en un spectrolinker, conforme a Carrillo Tripp (Carrillo-Tripp *et al.*, 2007) Se hibrido, se lavó y se reveló según la metodología descrita más adelante.

### **5.20. Obtención de sonda de DNA**

Para la obtención de la sonda se utilizó DNA plasmídico de clona dímero de PepGMV, se hizo una restricción enzimática con EcoR1, se corrió en un gel de agarosa al 1% y se purifico del gel.

### **5.21. Marcaje de sonda**

Para el marcaje de la sonda se utilizó 1 ml de sonda purificada, fosforo [P]<sup>32</sup> y el kit de marcaje Rediprime II de Amersham, siguiendo las especificaciones del proveedor.

### **5.22. Hibridación**

La membrana se prehibridó a 50°C en buffer preparado según Hutvágner 2000, posteriormente se le agregó la sonda marcada con [P]<sup>32</sup>, se dejó hibridando a 50°C durante 18 horas. (Hutvágner *et al.*, 2000).

### **5.23. Lavado de membranas**

Se preparó la solución SSC 20X (NaCl [3M], Citrato de sodio [300mM], pH 7.0). Las membranas se lavaron 2 veces por 10 minutos en una solución que contenía SSC 2X y SDS 0.1%, y una vez en una solución que contenía SSC 0.2X y SDS 0.2%., los lavados se hicieron con la misma temperatura de hibridación. La detección se llevó a cabo utilizando un casset storage phosphor screen de

Amersham, durante toda la noche a temperatura ambiente.

#### 5.24. Primer bioensayo

Se pusieron a germinar 28 semillas de tomate variedad Missouri en sustrato arena-vermiculita (1:3), estéril, en macetas separadas, y se mantuvieron en una cámara bioclimática Binder con 16 horas luz, 8 horas oscuridad, y se regaron 2 veces por semana con diferentes soluciones nutritivas. Las plantas se agruparon en 6 tratamientos (cuadro 2).

Cuadro 2. Características de cada grupo de plantas del bioensayo 1

Planta	Tratamiento	Característica	No. Plantas
CV+	Hoagland's 20 $\mu$ M phosphato	Control sin micorrizar	5
CV-	Hoagland's 20 $\mu$ M phosphato	Control sin micorrizar	5
PV+	Hoagland's 200 $\mu$ M phosphato	Control de fosfato sin micorrizar	4
PV-	Hoagland's 200 $\mu$ M phosphato	Control de fosfato sin micorrizar	3
MV+	Hoagland's 20 $\mu$ M phosphato	Plantas micorrizadas	5
MV-	Hoagland's 20 $\mu$ M phosphato	Plantas micorrizadas	5

A las 7 semanas de germinación se pusieron en contacto con 120 esporas de *Rhizophagus intraradices*. A las semana 6 después de inoculación con *Rhizophagus intraradices*, se transportaron hacia el laboratorio de Virología en el Cinvestav Irapuato. Las plantas se inocularon en la antepenúltima hoja verdadera con PepGMV, dímero descrito por Carrillo-Tripp, 2007. Se tomó la primera muestra de tejido al momento de inoculación del virus PepGMV, de un foliolo no inoculado. Las plantas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a 28°C con 16 horas luz y 8 horas oscuridad. A cada muestra se le extrajo DNA total y se vio su integridad

en geles de agarosa. Se comprobó la infección por PCR punto final mediante los oligonucleótidos PepGMV Rep Q F y PepGMV Rep q R (tabla 1). Se realizó la detección por Southern blot a la primera hoja emergente para confirmar la infectividad y formas replicativas. Una vez colectada la muestra se dejó crecer a las plantas hasta su producción, registrando los datos de síntomas, estructuras florales y botones.

### **5.25. Segundo bioensayo**

Se germinaron 29 semillas de tomate, a las 3 semanas de germinación se inocularon con 120 esporas de *Rhizophagus intraradices* por planta y se pasaron a sustrato arena – vermiculita (1:3) estéril y se mantuvieron dentro de bolsas de plástico transparentes hasta que se adaptaron a condiciones de menor humedad relativa, manteniéndose en una cámara bioclimática Binder con 16 hr luz y 8 oscuridad. A las 6 semanas de germinación se inocularon con PepGMV por medio de biobalística en el laboratorio de Virología del Cinvestav Irapuato, con una pistola de baja presión como se describió anteriormente. Se realizaron dos inoculaciones por planta en 2 folíolos distintos de la última hoja verdadera para aumentar las posibilidades de infección. Las plantas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con temperaturas oscilando entre 26 a 28 °C. Tanto la preparación de las partículas así como la forma de inocular se realizó tal y como se describe en la sección 5.14 – 5.16. Se tomó la primera muestra al momento de inoculación del virus de un folíolo distinto al inoculado. Se tomó el primer folíolo de cada hoja emergente hasta la aparición de síntomas. Cada muestra se le extrajo DNA y se observó su integridad en geles de agarosa. Se comprobó la infección por PCR punto final mediante los oligonucleótidos PepGMV Ren F y PepGMV Ren R (cuadro 1). A la primera extracción de la primera hoja emergente se le hizo la detección por Southern blot para ver infectividad y formas replicativas. Tomada la muestra después de que las plantas presentaran síntomas se dejó a las plantas hasta producción, donde se tomaron datos de síntomas, estructuras florales y botones.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 6.1. Determinación de la presencia de PepGMV en plantas de tomate colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.

#### 6.1.1. Colonización de plantas de tomate con *Rhizophagus intraradices*.

Nueve plantas de tomate fueron colonizadas inoculándolas con 120 esporas de *Rhizophagus intraradices* por planta directamente a las raíces y se mantuvieron en una cámara bioclimática, con temperatura y fotoperiodo controlados. Plantas control no fueron inoculadas con el hongo micorrízico y se mantuvieron en las mismas condiciones.

Seis semanas después de la inoculación con *R. intraradices* las plantas se transportaron al CINVESTAV-Irapuato, para llevar a cabo los ensayos de infección con el virus PepGMV.

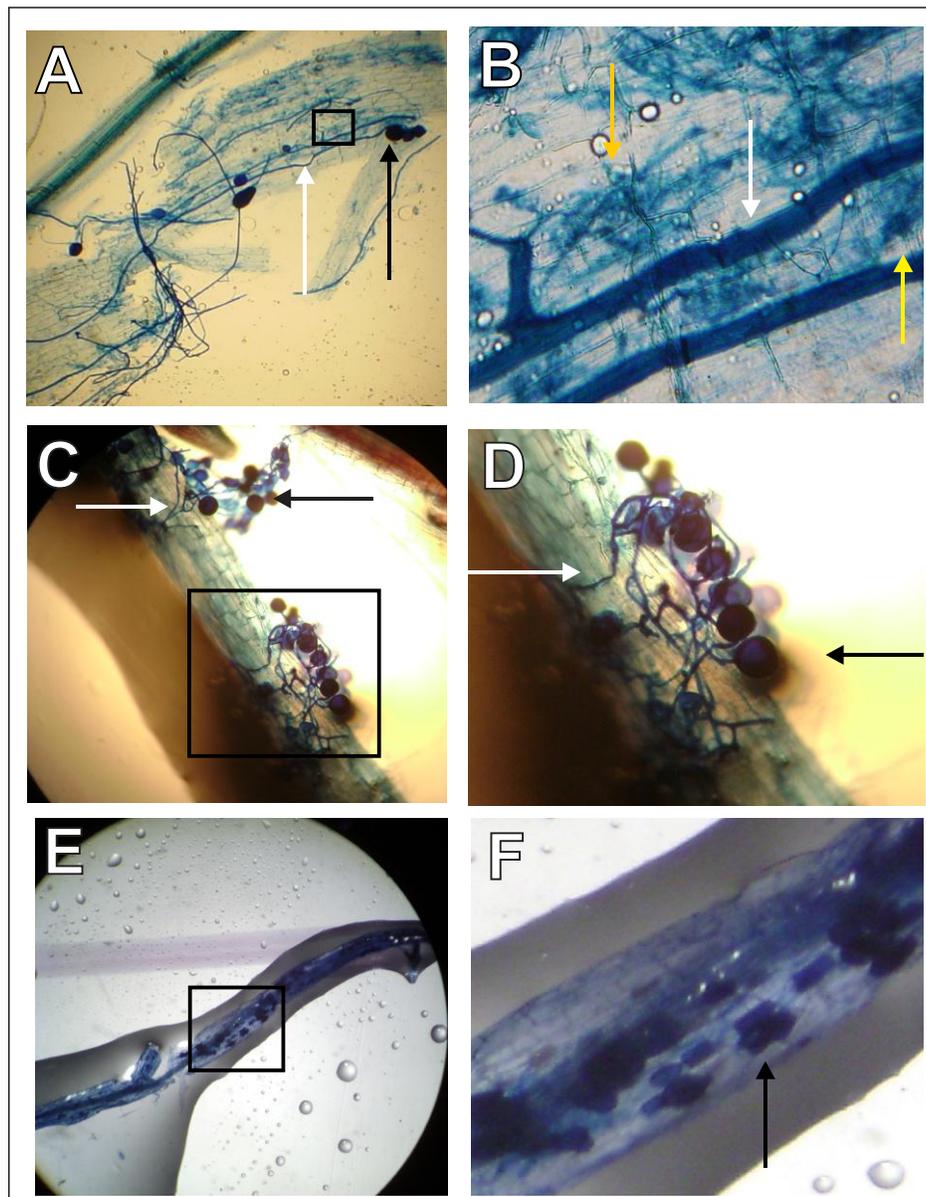
Antes de la inoculación con PepGMV se determinó la colonización de *R. intraradices* en plantas de tomate, la cual fue del 100% (cuadro 6, figura 9). Estudios anteriores señalan que las plantas de tomate con una colonización aproximada del 89% con *R. intraradices* induce tolerancia contra *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* (Galindo-Flores, 2008).

Al término de cada bioensayo, se determinó el porcentaje de colonización de las plantas inoculadas. Los porcentajes de colonización fueron del 100% para las todas las plantas antes y después de la inoculación con PepGMV (Cuadro 6, figura 9) comparable a lo reportado por Galindo-Flores donde los porcentajes de micorrización en plantas de tomate inoculadas con *X. campestris* prácticamente no tuvieron variación (Galindo-Flores, 2008).

**Cuadro 3. Porcentaje de colonización en plantas de tomate inoculadas con *R. intraradices* e infectadas con PepGMV.**

	0 ddi	92 ddi	
	Planta tomate M+	Planta tomate MV-	Planta tomate MV+
Porcentaje de micorrización	100±0%	100±0%	100±0%

M+ (micorrizadas), MV- (micorrizadas sin virus), MV+ (micorrizadas con virus)



**Figura 9. Microfotografías de raíces de tomate colonizadas con *R. intraradices*.**  
 A) Raíz de tomate micorrizada antes de la inoculación con PepGMV (amplificada 4X); B)

Raíz de tomate micorrizada (amplificada 40X) de A, Raíz de tomate; C) Raíz de tomate micorrizada e inoculada con PepGMV (amplificación 5X); D) Amplificación digital de C; E) Raíz de tomate micorrizado sin inoculación viral; F) Amplificación digital de E. Flechas blancas: hifas; flechas negras: vesículas y esporas; flechas amarillas: arbusculos.

### 6.1.2. Inoculación de PepGMV en plantas de tomate micorrizadas.

Se designaron al azar las plantas que se inocularon con PepGMV y los controles negativos de cada tratamiento. Para la inoculación de PepGMV se utilizaron 14 plantas del bioensayo 1 y 14 plantas del bioensayo 2, la inoculación de PepGMV, se realizó con 250ng de DNA plasmídico de PepGMV por cada planta (Carrillo-Tripp, 2006).

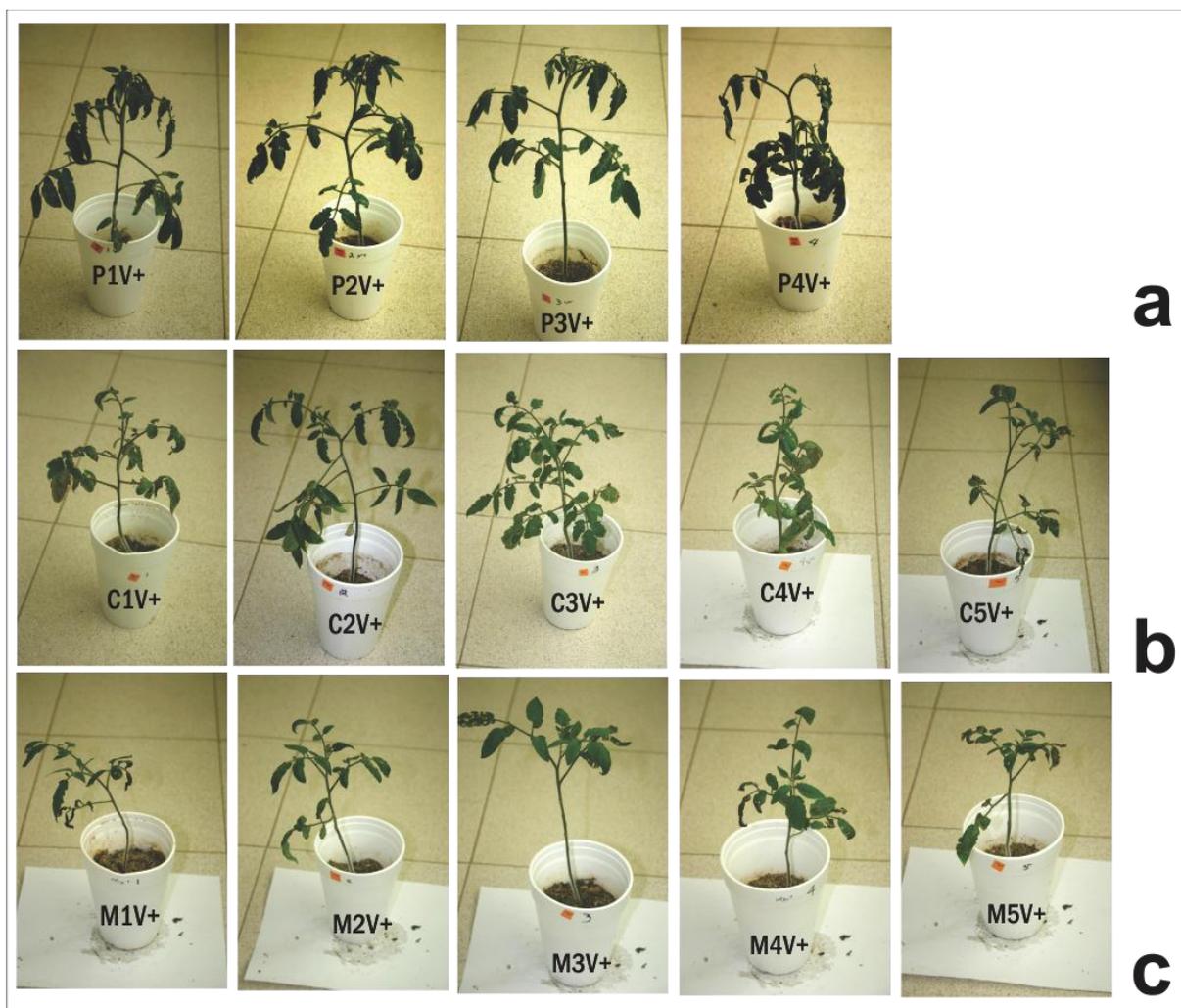
Para el bioensayo 1 se realizaron las inoculaciones en la octava hoja verdadera y para el bioensayo 2 la inoculación se realizó en la quinta hoja verdadera, en ambos casos se utilizaron dos folíolos, los más proximales al tallo, para incrementar así las posibilidades de infección, debido a que en otros modelos utilizados como chile, se ha observado que la utilización de plantas de más de 4 hojas verdaderas disminuye el porcentaje de plantas infectadas, conforme la inoculación se realice en plantas más viejas (Rivera-Bustamante, comunicación personal).

Después de la inoculación se observó en las plantas de tomate la lesión típica correspondiente al área de disparo en las plantas indicando el daño mecánico ocasionado por inoculación (Figura 10. B)



**Figura 10. Inoculación de planta de tomate por biobalística.** A) Inoculación de las hojas más jóvenes a una distancia de 1 cm; B) Lesión típica observada en el área de disparo.

Las plantas de tomate inoculadas con PepGMV y no inoculadas en ambos bioensayos mostraban un vigor homogéneo entre las plantas: no micorrizadas y fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fósforo, las plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fósforo y las plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fósforo (Figura 11, 12, 13 y 14).



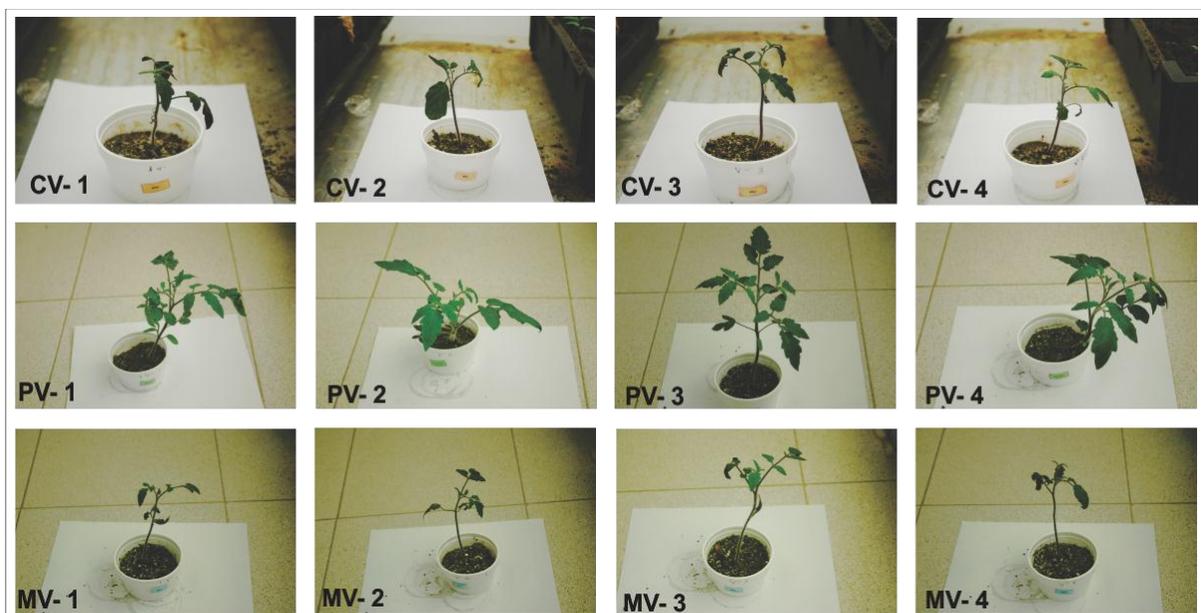
**Figura 11. Plantas de tomate inoculadas con PepGMV 2 horas ddi.** a) Plantas control no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fósforo, b) Plantas control no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fósforo, c) Plantas micorrizadas 20  $\mu\text{M}$  de fósforo.



**Figura 12. Plantas controles negativos sin inocular con PepGMV.** a) Plantas control no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato, b) Plantas control no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, c) Plantas micorrizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato.



**Figura 13. Plantas de tomate inoculadas con PepGMV bioensayo 2 (2hr ddi).** CV+) Plantas controles no micorrizadas fertilizados con 20  $\mu$ M de fosfato, PV+) Plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV+) Plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato.

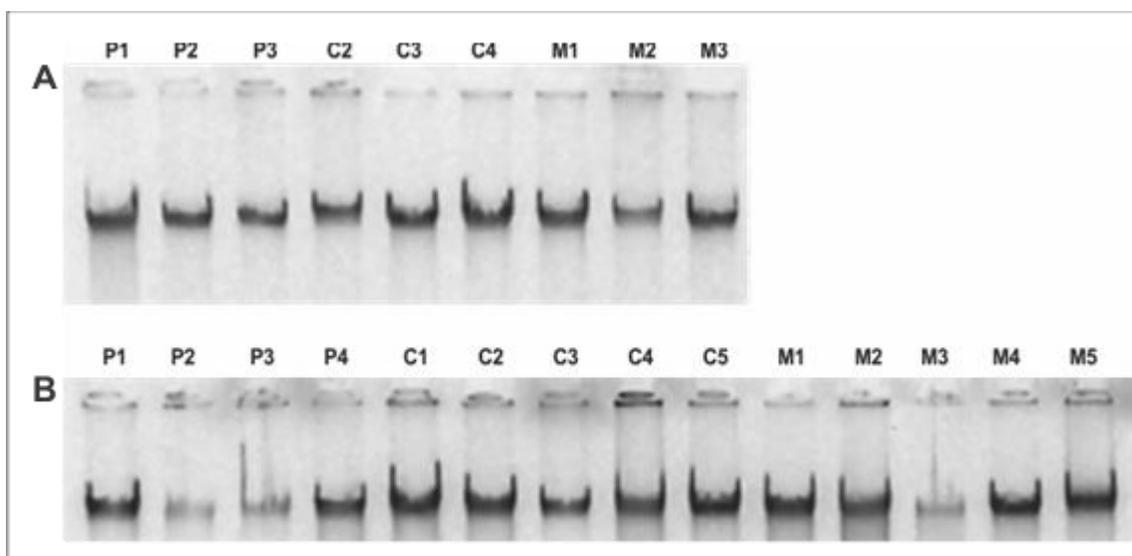


**Figura 14. Plantas de tomate sin inocular con PepGMV bioensayo 2 (2hr ddi).** CV+) Plantas controles no micorrizadas fertilizados con 20  $\mu$ M de fosfato, PV+) Plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV+) Plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato.

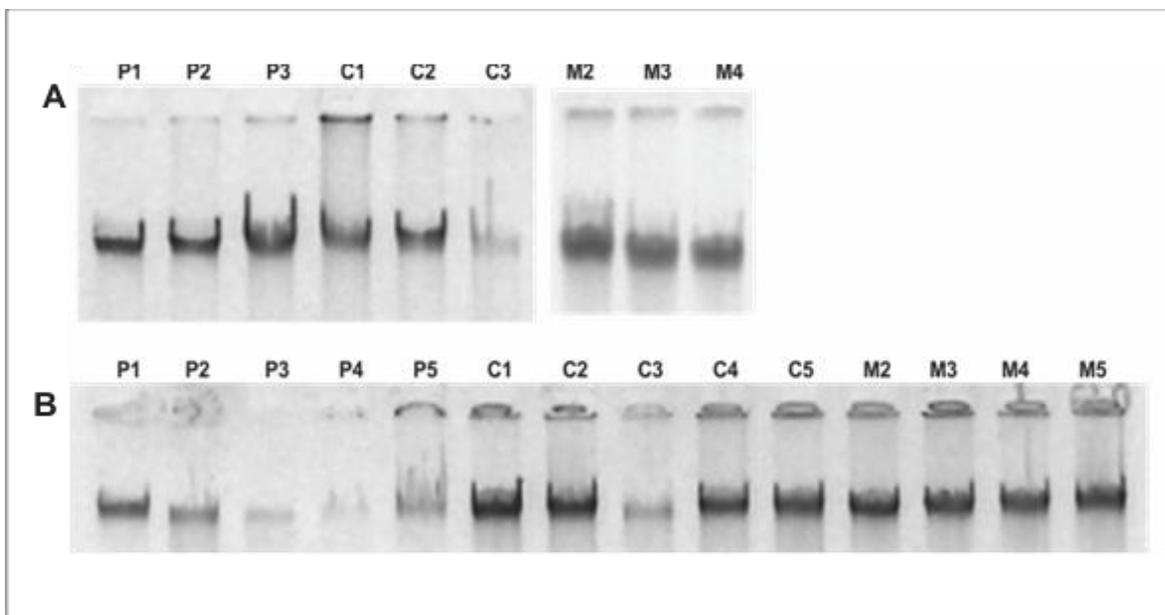
Los resultados del análisis de la sintomatología presentada por las plantas de tomate se abordarán en el apartado 6.3 de este documento.

### 6.1.3. Detección molecular de PepGMV por PCR

Para analizar la presencia de PepGMV se realizó una prueba de PCR en el DNA extraído de plantas de tomate en estado de floración (92 ddi). El DNA obtenido se determinó ser de buena calidad tanto para el bioensayo 1 como para el bioensayo 2 (Figura. 15 y 16).

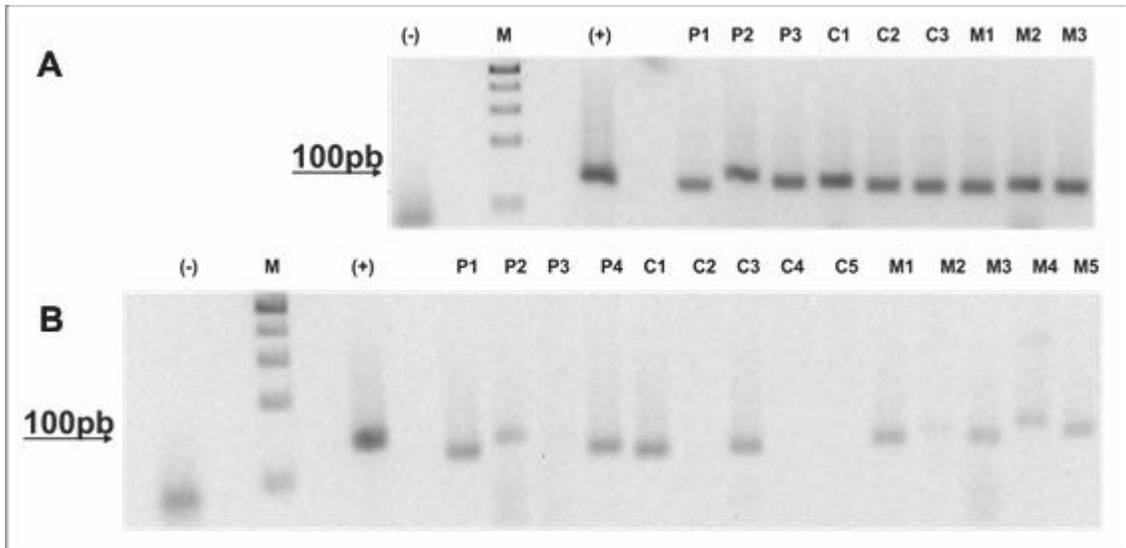


**Figura 15. Electroforesis del DNA total de plantas de tomate bioensayo 1.** a) Plantas controles negativos, carriles P1, 2, 3: plantas micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato; C2, 3, 4: plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato; M1, 2, 3: plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. b) plantas inoculadas con PepGMV carriles P1, 2, 3, 4: plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato; C1, 2, 3, 4, 5: plantas control no micorrizada fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato; M1, 2, 3, 4, 5: plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato.

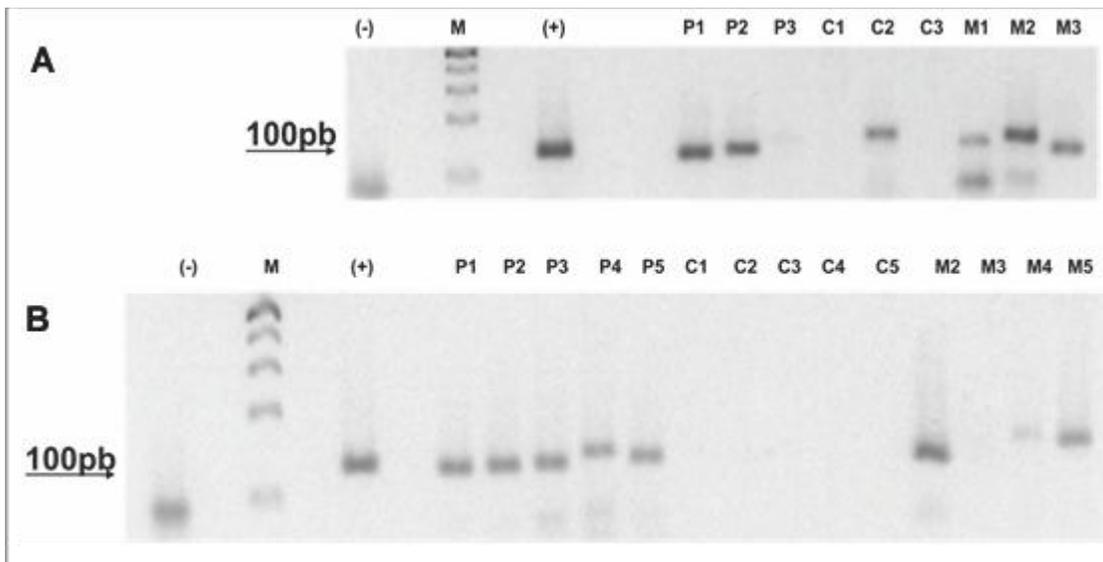


**Figura 16. Electroforesis DNA total de plantas de tomate bioensayo 2.** a) Plantas controles negativos, carriles P1, 2, 3: plantas micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato; C2, 3, 4: plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato; M1, 2, 3: plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. b) plantas inoculadas con PepGMV carriles P1, 2, 3, 4, 5: plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato; C1, 2, 3, 4, 5: plantas control no micorrizada fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato; M2, 3, 4, 5: plantas micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato.

Para determinar la integridad y calidad del DNA se amplificó un fragmento que corresponde al factor de elongación (EF $\alpha$ 1) (Rivera-Bustamante, comunicación personal). Se logró amplificar el fragmento esperado de 100 pb, para nuestros controles negativos (plantas sin inocular con PepGMV) del bioensayo 1 y 2, para las plantas inoculadas con PepGMV se logró la amplificación en 10 plantas de 14 y 8 plantas de 14 para el bioensayo 1 y 2 respectivamente (Figura. 17 - 18).



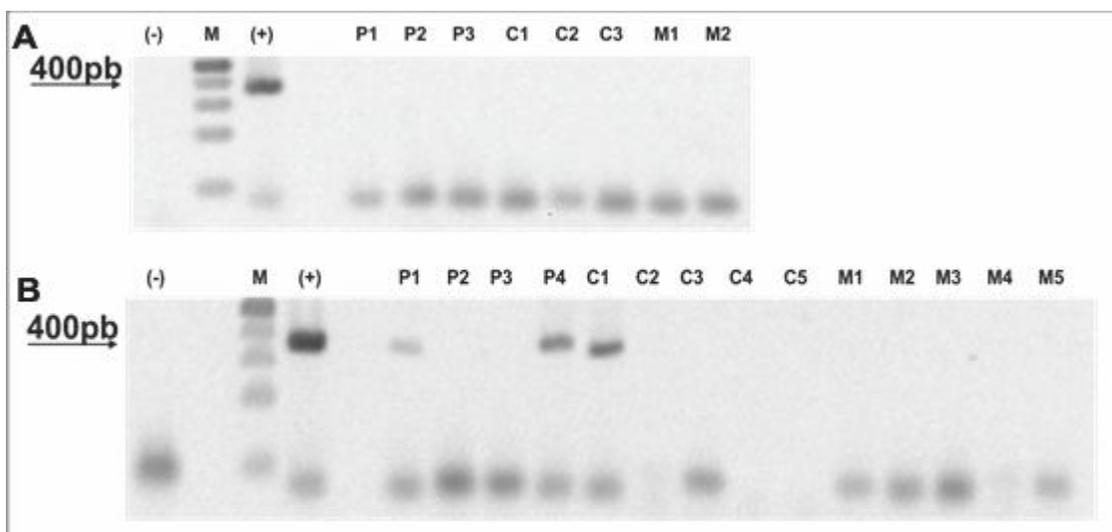
**Figura 17. Detección molecular del factor de elongación de plantas de tomate bioensayo 1.** a) Plantas controles sin inocular con PepGMV, carriles P1, 2, 3: plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, C1, 2, 3: plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, M1, 2, 3: plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. b) plantas inoculadas con PepGMV carriles P1, 2, 3, 4, 5: plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, C1, 2, 3, 4, 5: plantas control no micorrizada fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, M2, 3, 4, 5: plantas micorrizada fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. (-): control negativo, (M): marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder, (+): control positivo.



**Figura 18. Detección molecular del factor de elongación de plantas de tomate bioensayo 2.** a) Plantas sin inocular con PepGMV, carriles P1, 2, 3: plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, C1, 2, 3: plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, M1, 2, 3: plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. b) plantas inoculadas con PepGMV carriles P1, 2, 3, 4, 5: plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, C1, 2, 3, 4, 5: plantas control no micorrizada fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, M2, 3, 4, 5: plantas micorrizada fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato.

micorrizada fertilizada con 20  $\mu$ M de fosfato, M2, 3, 4, 5: plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. (-): control negativo, (M): marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder, (+): control positivo.

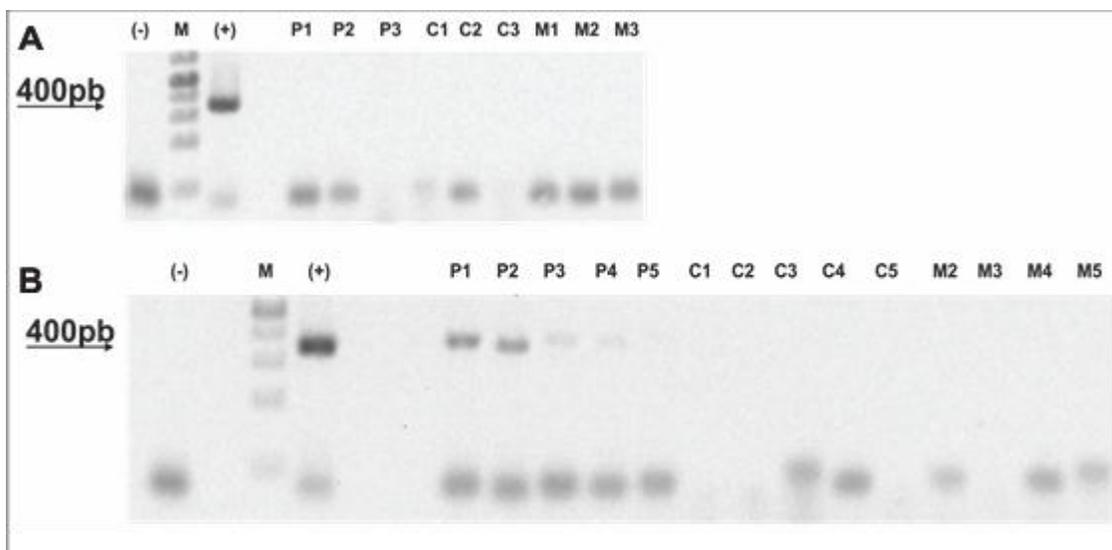
En la detección de PepGMV en el bioensayo 1 se logró amplificar el fragmento esperado de 400 pb en 2 de 4 plantas no micorrizadas fertilizadas con alto fosfato (PV+), 1 de 5 plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato (CV+) y 0 de 5 plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato (MV+), obteniendo así 50%, 20% y 0% de infección en plantas en dicho bioensayo (figura 19).



**Figura 19. Detección molecular del virus PepGMV en plantas de tomate bioensayo 1.** a) Plantas controles negativos sin inocular con PepGMV, carriles P1, 2, 3: plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, C1, 2, 3: plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, M1, 2, 3: plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. b) plantas inoculadas con PepGMV carriles P1, 2, 3, 4: plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, C1, 2, 3, 4, 5: plantas control no micorrizada fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, M2, 3, 4, 5: plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato (-): control negativo, (M): marcador de peso molecular 1 kb Plus DNA Ladder, (+): control positivo.

En la detección de PepGMV en el bioensayo 2 se logró amplificar el fragmento esperado de 400 pb en 4 de 5 plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato (PV+), 0 de 5 plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato (CV+), 0 de 4 plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato (MV+),

lo que correspondió a un 80% de infección para (PV+), 0% para (CV+) y 0% para (MV+) (figura 20).



**Figura 20. Detección molecular de PepGMV en plantas de tomate bioensayo 2.** a) Plantas control negativo: P: plantas no micorrizadas nutridas con 200  $\mu$ M de fosfato; C: plantas no micorrizadas nutridas con 20  $\mu$ M de fosfato; M: plantas micorrizadas nutridas con 20  $\mu$ M fosfato; b) plantas inoculadas con PepGMV: P: plantas no micorrizadas nutridas con 200  $\mu$ M de fosfato; C: plantas no micorrizadas nutridas con 20  $\mu$ M de fosfato; M: plantas micorrizadas nutridas con 20  $\mu$ M fosfato.

Con base en los resultados obtenidos se determinó usar hibridación tipo Southern Blot como segunda herramienta para analizar la infección de PepGMV y relacionar la tolerancia inducida por las micorrizas en dichas plantas.

#### 6.1.4. Análisis de la infección por hibridación tipo Southern Blot

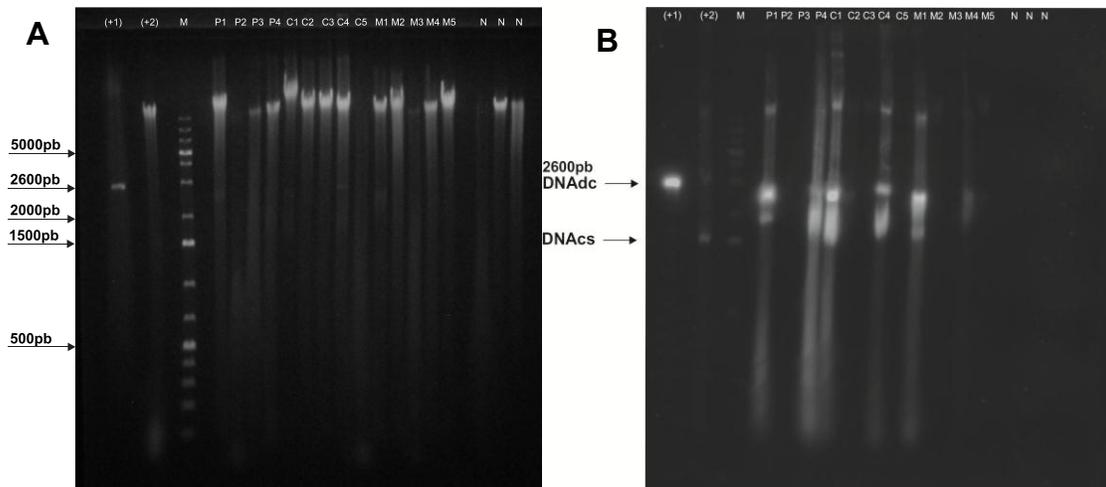
Para determinar la presencia de PepGMV en plantas micorrizadas por hibridación se utilizó 10 $\mu$ g de DNA por planta cosechada a los 92 dpi.

Para invadir sistémicamente una planta, los virus deben moverse en dos diferentes formas, a corta distancia y a larga distancia (Más-Martínez *et al.*, 1996). El movimiento de PepGMV en las plantas de tomate del lugar de inoculación hacia las partes más jóvenes de la planta implica un movimiento a larga distancia, indicativo de una infección sistémica.

En el bioensayo 1 se logró detectar formas replicativas de PepGMV en plantas

de tomate, determinando un 50% de infección en plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato (Figura 21b, carriles P1 y P4), 60% en plantas control no micorrizado fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato (figura 21b. Carriles C1, C2, C4) y 60% en plantas micorrizadas fertilizadas con 20 $\mu$ M de fosfato (figura 21b. Carriles M1, M4, M5). Estos resultados sugieren que el virus PepGMV realizó un proceso de infección (replicación y movimiento a larga distancia) en plantas micorrizadas y no micorrizadas.

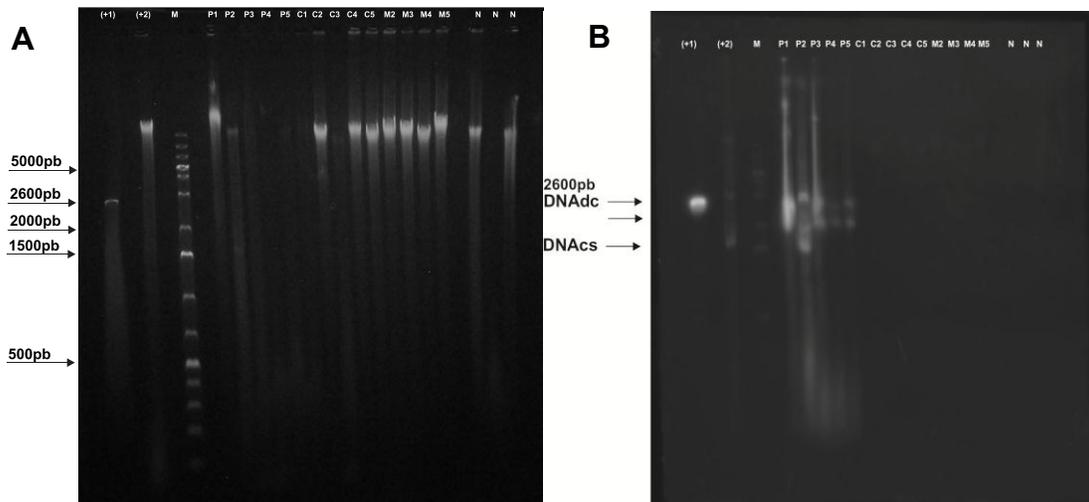
El análisis de las formas replicativas encontradas en las plantas de tomate inoculadas con PepGMV del bioensayo 1 correspondieron a DNA de doble cadena (DNAdc) y cadena sencilla (DNAs). El análisis por Southern blot de las plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato (P1, P4) presentaron patrones similares en las principales formas del virus (DNAs, DNAdc); así como, en la carga viral indicando una similitud en la infección viral entre las plantas de tomate; sin embargo, las plantas controles no micorrizadas y micorrizadas (C1, C2, C4, M1, M4 y M5) fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato presentaron diferencias tanto en el patrón de bandeo como en la intensidad, esto puede indicar que el proceso infectivo varió dentro del mismo tratamiento. En los geminivirus su forma replicativa es de DNA circular de doble cadena (DNAdc), dicha molécula permite copiar el genoma viral para la generación de nuevas partículas; así como, de moléculas para llevar a cabo la transcripción de sus genes, se describe que la forma replicativa de DNAdc es por lo menos 20 veces más abundante que la de DNAs (Gutiérrez, 2000). La presencia de la forma replicativa de DNAdc en todas las plantas de tomate infectadas con PepGMV sugiere una replicación activa en las plantas infectadas con PePGMV del bioensayo 1 (figura 21b).



**Figura 21. Southern blot de plantas de tomate correspondiente al bioensayo 1.**  
 A) Gel de agarosa 10  $\mu$ g de DNA de cada muestra por línea. B) Membrana de Nylon hibridada con PepGMV A. a) y b) Carriles (+1) DNA plasmídico de PepGMV digerido con EcoR1, (+2): planta de Chile infectado con PepGMV, [1.4  $\mu$ g]; M: Marcador de peso molecular de 1kb ladder Plus; P1-P4: plantas de tomate no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, C1-C5: plantas de tomate control no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, M1-M5: plantas de tomate micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, N1: planta sin inocular con PepGMV no micorrizada fertilizada con 200  $\mu$ M de fosfato, N2: planta sin inocular con PepGMV control no micorrizado fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato; N3: planta sin inocular con PepGMV micorrizada fertilizada con 20  $\mu$ M de fosfato.

Para el bioensayo 2, se logró detectar las formas replicativas de PepGMV en plantas de tomate no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, confirmando los resultados obtenidos por PCR. El porcentaje de infección fue de 100% en plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, 0% de infección en las plantas control no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato y 0% de infección en las plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato (Figura 22).

Las formas replicativas encontradas en plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato (P1, P2, P3, P4 y P5) fueron similares en el patrón de bandeo, concentración y correspondieron a DNAs y DNAdc. Las plantas control no micorrizadas así como las micorrizadas ambas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, no presentaron señal de hibridación (Figura 22).



**Figura 22. Southern blot de plantas de tomate correspondientes al bioensayo 2.**  
 a) Gel de agarosa 1% 10  $\mu$ g de DNA de cada muestra por línea. b) Membrana de Nylon hibridada con PepGMV A. a) y b) Carriles (+1) DNA plasmidico PepGMV digerido con EcoR1, (+2): planta de chile infectada con PepGMV, [1.4  $\mu$ g]; M: Marcador de peso molecular de 1kb ladder Plus; P1-P5: plantas de tomate micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, C1-C5: plantas de tomate controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, M2-M5: plantas de tomate micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, N1: planta sin inocular con PepGMV no micorrizada fertilizada con 200  $\mu$ M de fosfato, N2: plantas controles sin inocular con PepGMV no micorrizado fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato; N3 plantas sin inocular con PepGMV micorrizada fertilizada con 20  $\mu$ M de fosfato.

La disminución de síntomas y concentración viral relativa en hojas nuevas, son características de remisión de la infección en plantas de chile; sin embargo, aún en tejidos con una concentración relativa baja, es posible detectar a PepGMV (Carrillo-Tripp, *et al.* 2009). Debido a que los controles no micorrizados y las plantas micorrizadas fertilizadas con 20 mM de fosfato no presentaron infección, no permite obtener una conclusión clara con respecto al efecto de la micorrización en la infección por PepGMV en el bioensayo 2.

### 6.3. Determinación de la inducción de tolerancia contra PepGMV en plantas de tomate colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.

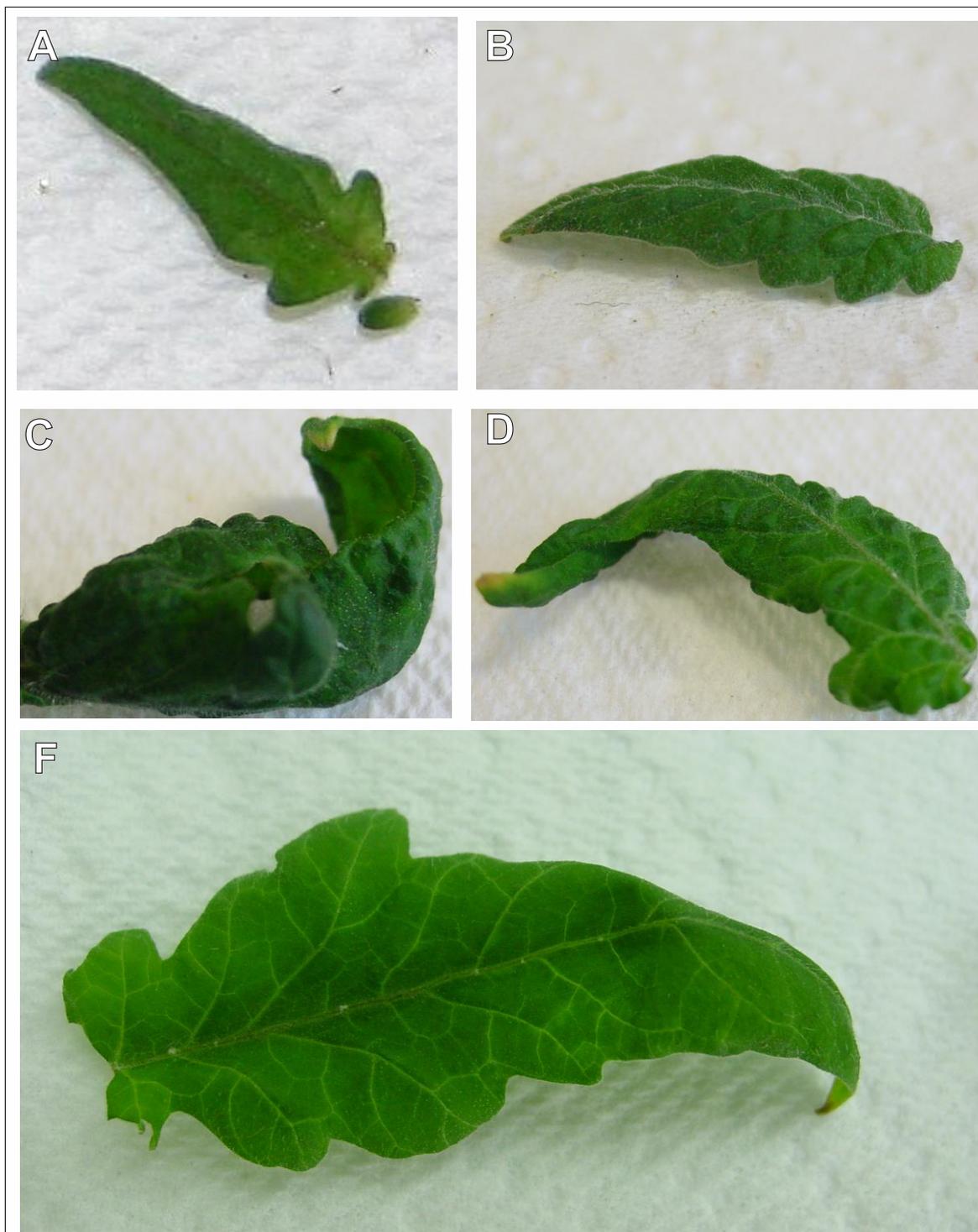
#### 6.3.1. Análisis temporal de sintomatología en plantas de tomate infectadas con PepGMV colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.

Para determinar la severidad de la infección de PepGMV en plantas de tomate

se elaboró una lista numérica con el grado de severidad (Cuadro 5). Los síntomas fueron: amarillamiento basal, ampollamiento, deformación de folíolos y acucharamiento (Figura 23).

**Cuadro 4. Escala utilizada para determinar la severidad de la infección de PepGMV en plantas de tomate.**

Grado	Síntoma
1	Amarillamiento basal
2	Amarillamiento basal y ampollamiento
3	Amarillamiento basal, ampollamiento y deformación de folíolos
4	Amarillamiento basal, ampollamiento, deformación de folíolos y acucharamiento



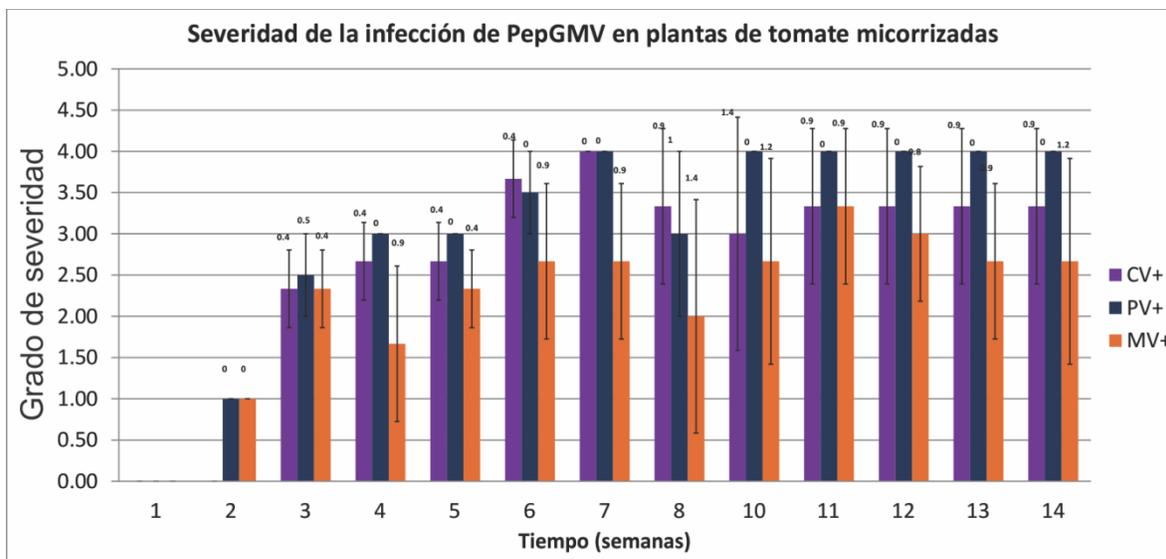
**Figura 23. Síntomas observados en plantas de tomate infectadas con PepGMV.**  
A) amarillamiento basal; B) abultamiento; C) deformación de folíolos; D) acucharamiento; E) abultamiento; F) hoja sana sin inoculación de PepGMV.

Las plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fósforo (P) fueron las que mostraron mayor grado de severidad seguido por las plantas controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  (C) y finalmente las plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fósforo (M), este efecto no es dependiente del estado de nutrición de cada planta.

Para mostrar el efecto de las plantas micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fósforo (M) contra las plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fósforo (C) y las plantas infectadas con PepGMV fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fósforo (P) se graficó el promedio de la severidad de la infección correspondientes a las plantas de tomate de cada tratamiento (cuadro 6). Con base en lo anterior se concluye que las plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fósforo (P) presentaron mayor severidad en la sintomatología durante todo el experimento (Figura 24). Los síntomas encontrados en estas plantas fueron amarillamiento basal, ampollamiento, deformación de folíolos y acucharamiento de los folíolos.

**Cuadro 5. Promedio de los síntomas presentados por las plantas infectadas con PepGMV de cada tratamiento a través del tiempo.**

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13	14
CV+	0.00	0.00	2.33	2.67	2.67	3.67	4.00	3.33	3.00	3.33	3.33	3.33	3.33
PV+	0.00	1.00	2.50	3.00	3.00	3.50	4.00	3.00	4.00	4.00	4.00	4.00	4.00
MV+	0.00	1.00	2.33	1.67	2.33	2.67	2.67	2.00	2.67	3.33	3.00	2.67	2.67

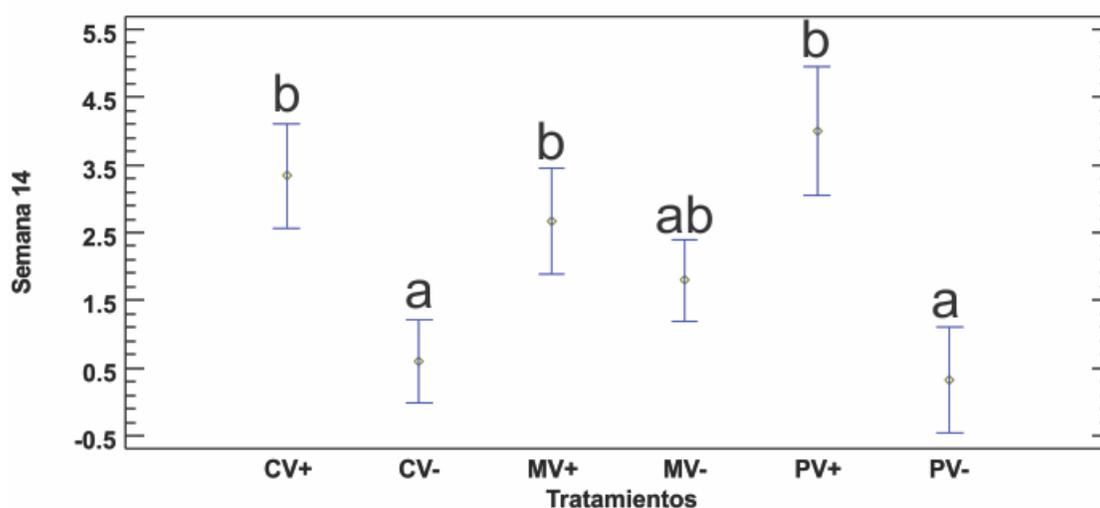


**Figura 24. Promedio de valores de la severidad de la infección con PepGMV en plantas de tomate del Bioensayo 1.** CV+: plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, PV+: plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato, MV+: plantas infectadas con PepGMV micorrizadas fertilizadas con PepMGMV. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.

Se realizó el análisis de varianza de los síntomas observados, en la semana 14, observamos que las plantas infectadas con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato (MV+) no presentaron diferencias significativas con las plantas control no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato (CV+), ni con las plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato (PV+) (Figura 25).

Al término del bioensayo 1, la severidad de la infección entre las plantas inoculadas con PepGMV fue similar en todos los tratamientos (figura 25, MV+, CV+ y PV+).

Análisis de varianza de todos los tratamientos B1 14 semanas



**Figura 25. Síntomas observados en plantas de tomate del bioensayo 1 hasta la semana 14.** CV+: plantas inoculadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, CV-: plantas sin inocular con PepGMV no micorrizado fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, MV+: plantas inoculadas con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, MV- plantas sin inocular con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, PV+ plantas inoculadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato, PV- plantas sin inocular con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato. Letras similares significan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Prueba Tukey ( $P < 0.05$ ). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.

La simbiosis entre un hongo micorrizico arbuscular y una planta provee cierta protección contra algunos patógenos como *Phytophthora parasitica* (Tahat *et al.*, 2010), *Phytophthora infestan* (Gallou *et al.*, 2011), *Pythium* (Li *et al.*, 2007), además se ha visto el efecto positivo de las micorrizas contra patógenos de la parte aérea, como *Xanthomonas campestris* pv vesicatoria donde se ha observado un efecto protector de las micorrizas reflejado por una disminución de las lesiones causadas por *X. campestris* sobre el tejido foliar de plantas de tomate micorrizadas. (Galindo-Flores, 2008). Otros estudios demuestran un efecto protector al observar una disminución del diámetro de la lesión causada por *Sclerotinia sclerotiorum* en plantas de frijol micorrizadas (Mora-Romero, 2008). En plantas de tomate micorrizadas se ha reportado un incremento de la tolerancia hacia fitoplasmas al observarse la reducción de síntomas y degeneración de células de fitoplasmas (Lingua *et al.*, 2002). Los fitoplasmas son bacterias patógenas sin pared celular, que necesitan de una célula viva para llevar a cabo su ciclo celular de manera muy

similar que los *Begomovirus* (Agris, 2005). El efecto de los hongos micorrízicos arbusculares contra enfermedades virales ha sido escasamente investigada. Daft y Okusanya (1973), utilizando plantas de tomate, petunia y fresa, sometidas a infecciones virales, observaron una estimulación de la replicación viral en aquellas plantas que estaban micorrizadas por lo que la interacción virus-planta-HMA resultó favorable para la replicación del virus y no contra de esta. Shaul y colaboradores (1999) presentaron un trabajo donde utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv *xanthi*) colonizadas con *Glomus intraradices* (actualmente *R. intraradices*) en donde las hojas desprendidas las inocularon con el *Virus del mosaico del tabaco*, un virus de RNA, presentando las plantas micorrizadas lesiones típicas de necrosis provocadas por TMV, en un menor tiempo y de mayor tamaño en hojas, lo que se le atribuyó a un aumento en la sensibilidad a infecciones virales por parte de la micorrización.

### **6.3.2. Análisis del número de botones en plantas de tomate infectadas con PepGMV y colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.**

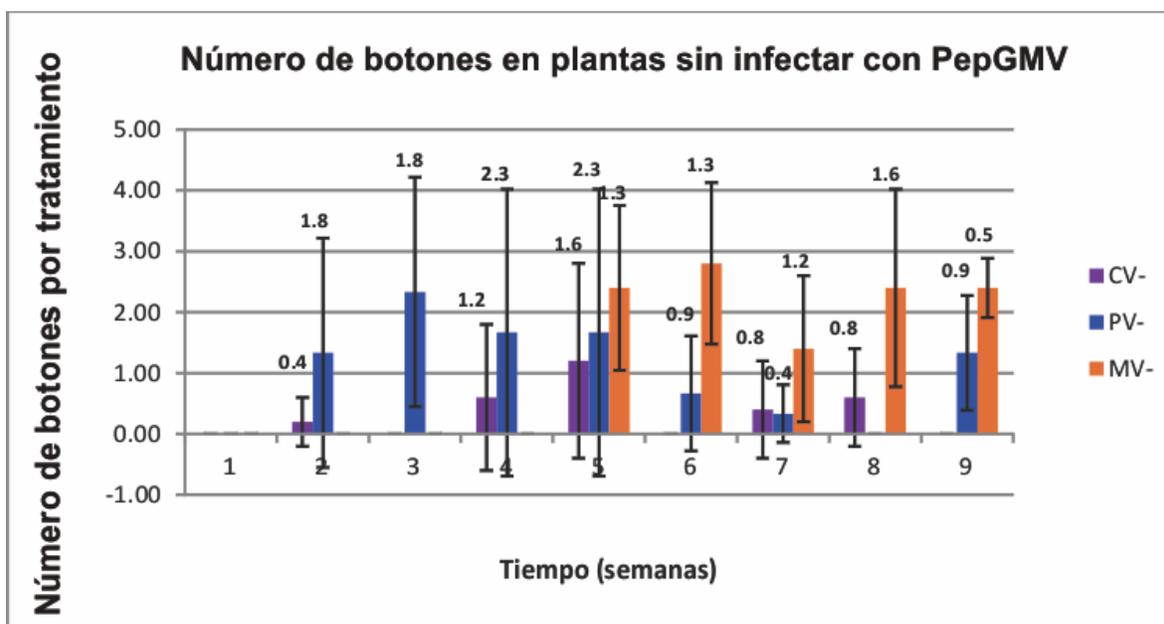
El desarrollo de botones fue variable pero al final del bioensayo se observó un mayor número botones en las plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, respecto a las plantas no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato y las plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato, se podría esperar un mayor desarrollo de botones por la mejor nutrición fosfatada (Figura 26). Otros estudios han demostrado que las micorrizas favorecen la formación de estructuras florales en plantas de tomate (Poulton *et al.*, 2001). Los resultados sugieren que este efecto se mantiene tanto en plantas micorrizadas sin virus como en plantas infectadas con PepGMV (cuadro 6, figura 26 y 27).

Las plantas de tomate micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato inoculadas con PepGMV, a diferencia de las plantas no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato y no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato presentaron una tendencia a conservar y mantener un número menor de botones que las plantas micorrizadas (Figura 27).

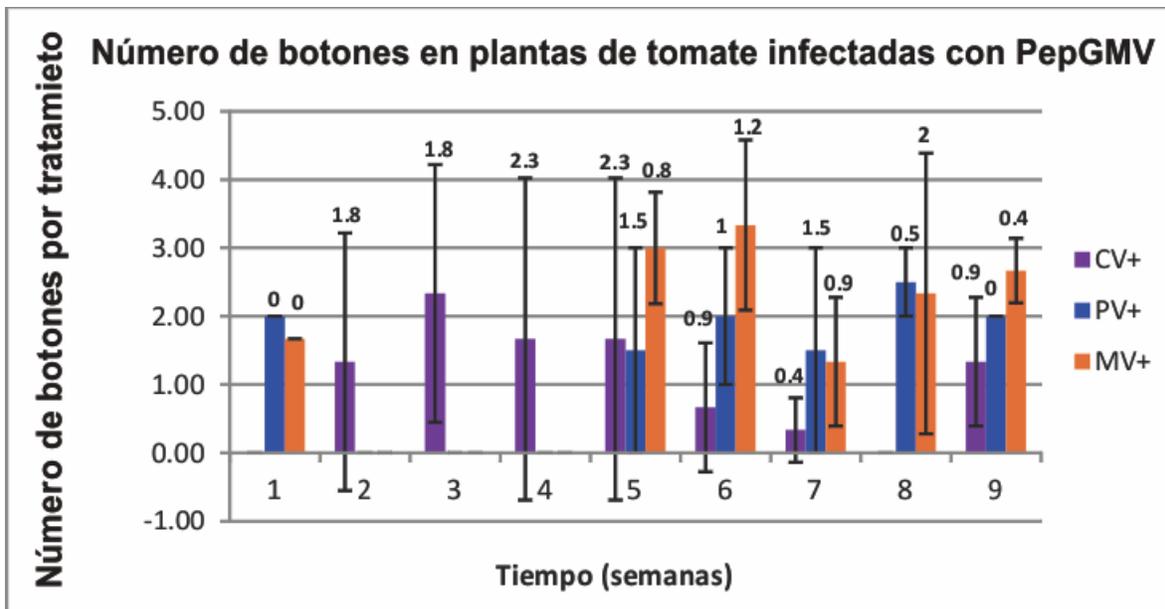
**Cuadro 6. Promedios de botones presentados semanalmente por planta de cada tratamiento.**

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CV+	0.00	1.33	2.33	1.67	1.67	0.67	0.33	0.00	1.33
PV+	2.00	0.00	0.00	0.00	1.50	2.00	1.50	2.50	2.00
MV+	1.67	0.00	0.00	0.00	3.00	3.33	1.33	2.33	2.67
CV-	0.00	0.20	0.00	0.60	1.20	0.00	0.40	0.60	0.00
PV-	0.00	1.33	2.33	1.67	1.67	0.67	0.33	0.00	1.33
MV-	0.00	0.00	0.00	0.00	2.40	2.80	1.40	2.40	2.40

CV+: plantas no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. PV+: plantas no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV+: Plantas micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. CV-: plantas no micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. PV-: plantas no micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV-: Plantas micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato.

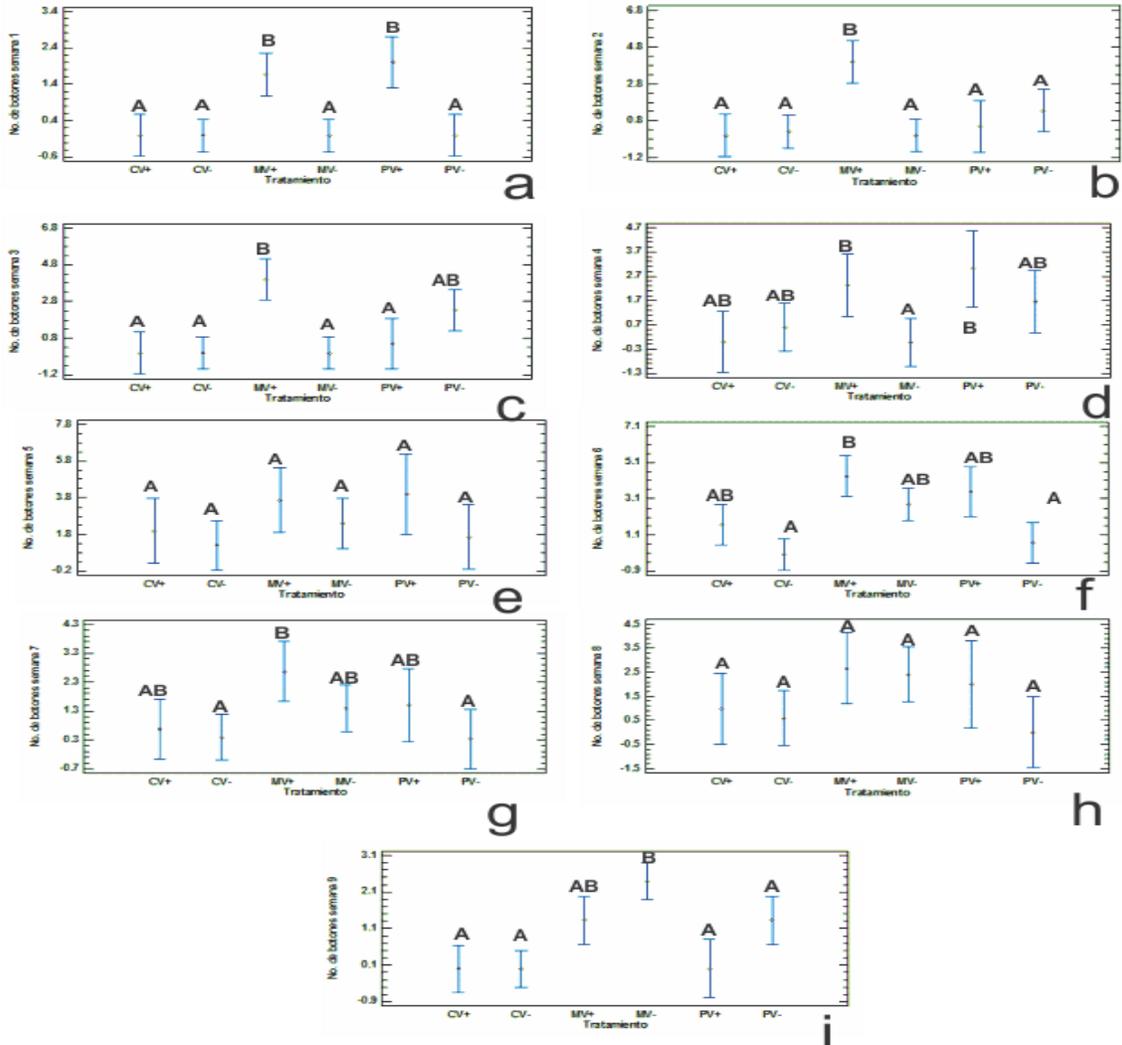


**Figura 26. Análisis temporal de botones en plantas micorrizadas y no micorrizadas con 20 y 200  $\mu$ M de fosfato, sin infectar con PepGMV bioensayo 1.** CV-: plantas no micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. PV-: plantas no micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV-: Plantas micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. Las barras de error representan la desviación estándar de cada una de las muestras.



**Figura 27. Análisis temporal de botones plantas infectadas con PepGMV, bioensayo 1.** CV+: plantas no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato. PV+: plantas no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato, MV+: Plantas micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato. Las barras de error representan la desviación estándar de cada una de las muestras.

Los análisis estadísticos se realizaron mediante una prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) y se observó un número de botones mayor en las plantas micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato comparando con las plantas inoculadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 20 y 200  $\mu\text{M}$  de fosfato (figura 28 a, b, c, d, f, g i).



**Figura 28. Análisis estadísticos del número de botones de las plantas de tomate del bioensayo 1.** Las barras que presentas letras iguales no existe diferencias significativas entre sus medias. Tukery ( $p < 0.05$ ). CV+: plantas infectadas con PepGMV controles no micorrizadas fertilizadas con  $20 \mu\text{M}$  de fosfato, PV+: Plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con  $200 \mu\text{M}$  de fosfato, MV+ plantas infectadas con PepGMV micorrizadas fertilizadas con  $20 \mu\text{M}$  de fosfato. CV-: plantas sin infectar con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con  $20 \mu\text{M}$  de fosfato, PV-: Plantas sin infectar con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con  $200 \mu\text{M}$  de fosfato, MV+ plantas sin infectar con PepGMV micorrizadas fertilizadas con  $20 \mu\text{M}$  de fosfato. A) Semana 1 de floración; B) Semana 2 de floración; C) Semana 3 de floración; D) Semana 4 de floración; E) Semana 5 de floración; F) Semana 6 de floración; G) Semana 7 de floración; H) Semana 8 de floración; I) Semana 9 de floración.

### 6.3.3. Análisis del número de flores en plantas de tomate infectadas con PepGMV y colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.

Se observó la presencia de un mayor número de flores en las plantas de tomate micorrizadas e infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato con respecto a las plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 20 y 200  $\mu\text{M}$  de fosfato. Este hecho sugiere un efecto positivo en la floración de las plantas de tomate durante la interacción PepGMV-tomate-HMA. En trabajos anteriores donde se utilizaron HMA para tratar de inducir tolerancia contra virus observando un aumento en la sintomatología viral o un aumento del título viral en las plantas micorrizadas y no así en las plantas control (Daft 1973, Shaul *et al.*, 1999). En el cuadro 8, se muestra el número de flores durante las 9 semanas que del experimento, en el cual se observó siempre un mayor número de flores en plantas micorrizadas inoculadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato.

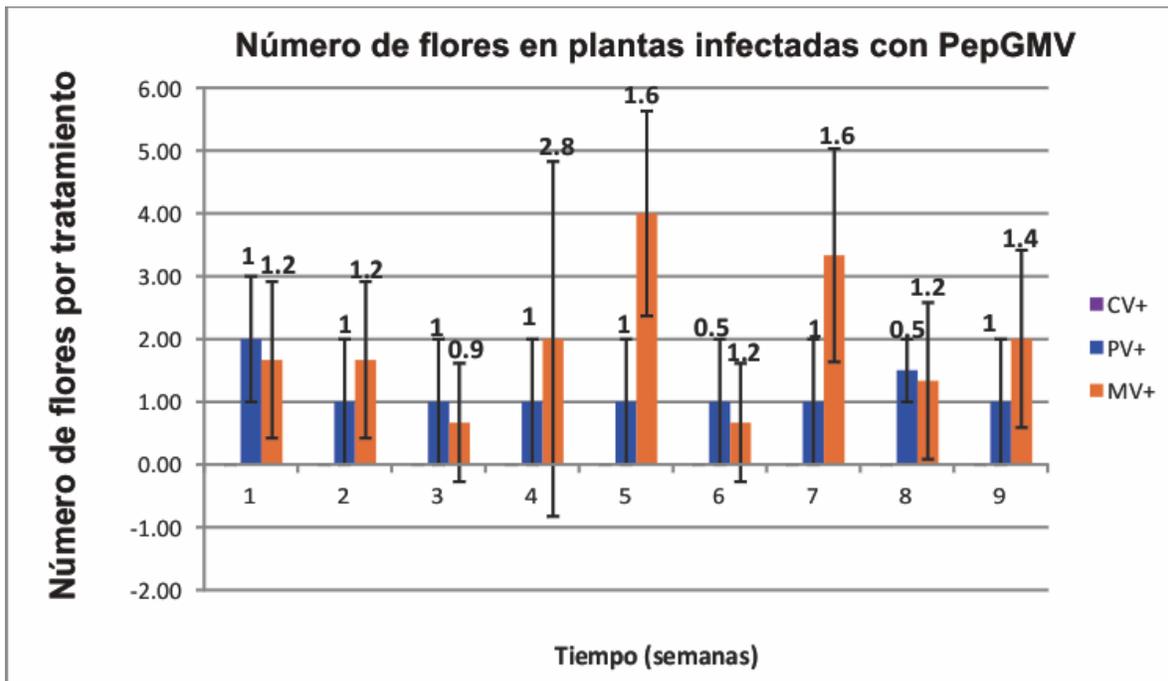
Las plantas sin inocular con PepGMV no florecieron en el tiempo que duró el experimento, mientras que las plantas micorrizadas y no micorrizadas inoculadas con PepMGV fertilizadas con 20 y 200  $\mu\text{M}$  de fosfato si lo hicieron. (cuadro 7), debido muy probablemente a que las plantas que son infectadas con virus alcanzan el estado de floración a más temprana edad que las plantas que no lo están (Rivera-Bustamante, comunicación personal), (Figura 29 y 30).

**Cuadro 7. Número de flores por tratamiento. CV+: plantas no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato.**

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8	9
CV+	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PV+	2.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.50	1.00
MV+	1.67	1.67	0.67	2.00	4.00	0.67	3.33	1.33	2.00
CV-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
PV-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
MV-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

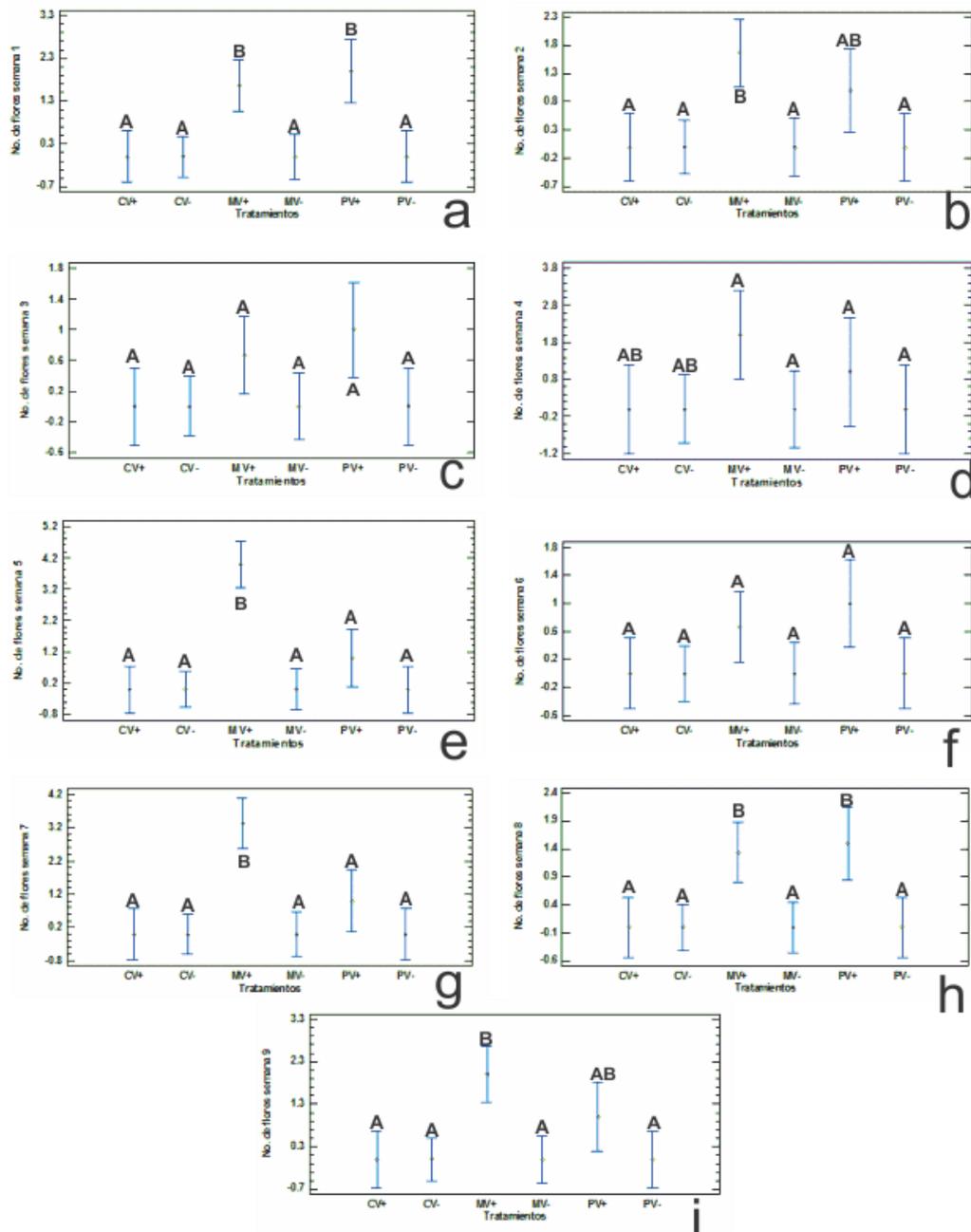
PV+: plantas no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV+: Plantas micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. CV-: plantas no micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. PV-: plantas no micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV-: Plantas micorrizadas sin infectar con PepGMV fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato.

En las plantas no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, no se observó el desarrollo de flores durante el tiempo que duró el tratamiento.



**Figura 29. Análisis temporal del desarrollo de frutos en plantas de tomate infectadas con PepGMV.** CV+: plantas no micorrizadas infectada con PepGMV fertilizada con 20  $\mu$ M de fosfato, PV+: Plantas no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizada con 200 mM de fosfato, MV+ Plantas micorrizadas infectada con PepGMV fertilizada con 20  $\mu$ M de fosfato. Las barras representan las desviaciones estándar.

En las plantas infectadas con PepGMV micorrizadas y fertilizadas con 20 mM de fosfato (MV+) se observó un mayor número de flores con respecto a los otros tratamientos (figura 30).



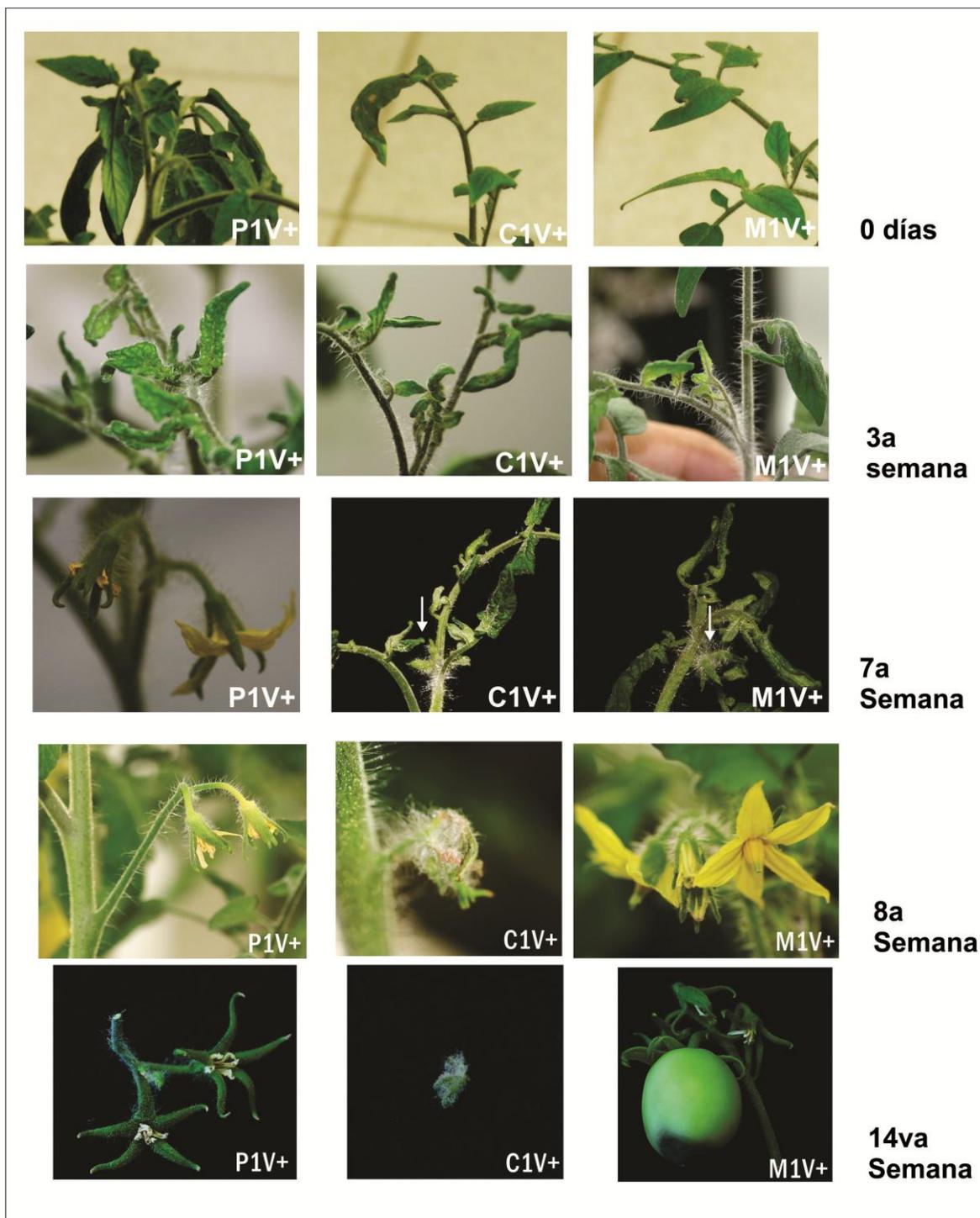
**Figura 30. Análisis estadísticos del número de botones de las plantas de tomate del bioensayo 1 por semana.** Las barras que presentan letras iguales no existe diferencias significativas entre sus medias. Tukey ( $p < 0.05$ ). CV+: plantas infectadas con PepGMV controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, PV+: Plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato, MV+ plantas infectadas con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato. CV-: plantas sin infectar con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, PV-: Plantas sin infectar con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu\text{M}$  de fosfato, MV+ plantas sin infectar con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato. A) Semana 1 de floración; B) Semana 2 de floración; C) Semana 3 de floración; D) Semana 4 de floración; E) Semana 5 de floración; F) Semana 6 de floración; G) Semana 7 de floración; H) Semana 8 de floración; I) Semana 9 de floración.

Semana 8 de floración; l) Semana 9 de floración.

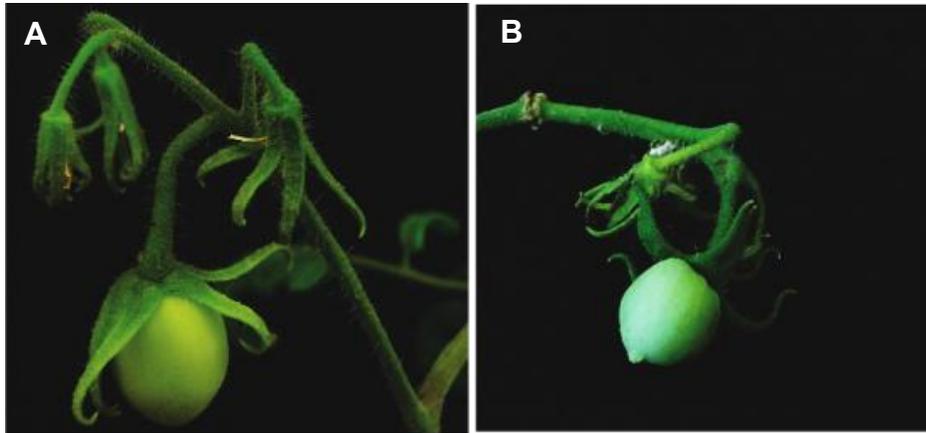
#### **6.3.4. Análisis del número de frutos en plantas de tomate infectadas con PepGMV y colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.**

Para analizar diferencias en la formación de estructuras en las plantas micorrizadas o no micorrizadas se evaluaron hasta el desarrollo de frutos. Durante este tiempo, las plantas infectadas con PepGMV que presentaron sintomatología de virosis, producían botones; cabe señalar, que en general no siempre se mantenían viables debido a deshidratación, necrosis o simplemente no se desarrollaron (Figura 31).

En las plantas de tomate infectadas con PepGMV y micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu\text{M}$  de fosfato, se lograron obtener 2 frutos de (figura 32. M1, M5), a diferencia de las plantas no micorrizadas e infectadas con PepGMV fertilizadas con 20 y 200  $\mu\text{M}$  de fosfato, las cuales no desarrollaron frutos (Figura 31), este efecto se correlaciono con la presencia de la simbiosis tomate-*Rhizophagus intraradices*, y no con la nutrición de la planta. Este hecho se sustenta al no observar desarrollo de frutos en las plantas no micorrizadas infectadas con PepGMV fertilizadas con 200 mM de fosfato. Este tipo de correlación se ha observado también en otros trabajos, donde las plantas en simbiosis con HMA, presentan una, tolerancia, hacia la infección del patógeno (Cordier *et al.*, 1998; Lingua *et al.*, 2002; García-Chapa, 2004; Fritz *et al.*, 2006; de la Noval *et al.*, 2007; Galindo-Flores, 2008; Mora-Romero, 2008; Kaminska *et al.*, 2010; Gallou *et al.*, 2011).

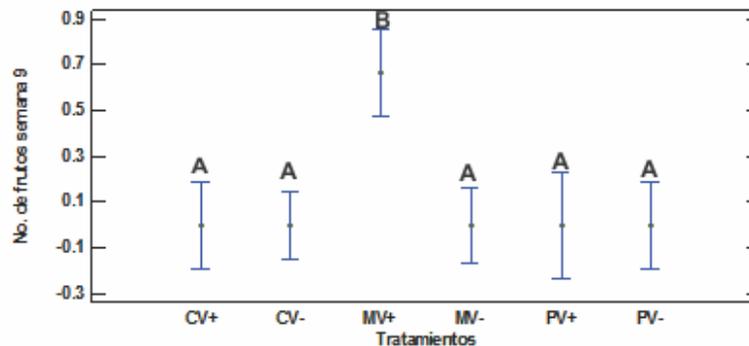


**Figura 31. Desarrollo de síntomas y frutos en platas micorrizadas e infectadas con PepGMV.** P1V+: planta infectada con PepGMV no micorrizada fertilizada con 200  $\mu$ M de fosfato; C1V+: planta infectada con PepGMV no micorrizada fertilizada con 20  $\mu$ M de fosfato; M1V+: planta infectada con PepGMV micorrizada fertilizada con 20  $\mu$ M de fosfato.



**Figura. 32. Frutos de plantas micorrizadas infectadas con PepGMV. A) y B)** Frutos de plantas micorrizadas e infectadas con PepGMV.

Para analizar número de frutos desarrollados en cada uno de los tratamientos de las plantas inoculadas con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20 mM de fosfato, se realizó un análisis de varianza del las únicas que mostraron desarrollo. Los análisis que existe una diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos (figura 33).



**Figura 33. Análisis de varianza del número de frutos en plantas infectadas con PepGMV semana 9.** Letras iguales significan que no hay diferencias significativas entre los tratamientos, Prueba Tukey ( $p < 0.05$ ). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos. CV+: plantas infectadas con PepGMV controles no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, PV+: Plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV+ plantas infectadas con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato. CV-: plantas sin infectar con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato, PV-: Plantas sin infectar con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato, MV+ plantas sin infectar con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato.

Al final del experimento no se observó ninguna diferencia en la altura de plantas de tomate infectadas con PepGMV (figura 34).



**Figura 34. Plantas de tomate infectadas con PepGMV correspondiente a la semana 9.** P: Plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 200  $\mu$ M de fosfato; C: plantas infectadas con PepGMV no micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato; M: plantas infectadas con PepGMV micorrizadas fertilizadas con 20  $\mu$ M de fosfato.

## 7. CONCLUSIONES

Se determinó la infectividad de PepGMV en plantas de tomate colonizadas con *Rhizophagus intraradices*.

La presencia de las formas replicativas de DNA de cadena doble y sencilla (DNA<sub>dc</sub> y DNA<sub>cs</sub>) de PepGMV en las plantas de tomate micorrizadas con *Rhizophagus intraradices* indica que el virus mantiene activa su replicación.

El desarrollo de frutos en plantas de tomate en simbiosis con *Rhizophagus intraradices* sugiere que el efecto de la micorrización sobre la planta es a través de acelerar su desarrollo.

Los resultados indican la inducción de tolerancia en plantas de tomate durante la infección de PepGMV y no está relacionada con el estado nutricional de fosfatos de la planta.

## 8. RECOMENDACIONES

Respecto a la utilización de plantas de tomate colonizadas con *Rhizophagus intraradices* se debe caracterizar los porcentajes de colonización de las plantas de tomate cada semana después de la colonización para usar las plantas mas jóvenes y reducir el tiempo de los bioensayos.

Para analizar más finamente el efecto de la micorrización en plantas infectadas con virus recomendamos utilizar un mayor número de plantas por tratamiento, así como técnicas moleculares como PCR tiempo real.

Caracterizar la infección de PepGMV en tomate siguiendo hoja por hoja su replicación en plantas sin colonizar y colonizadas con *R. intraradices*.

Para continuar con este trabajo se recomienda analizar la expresión diferencial de genes en las plantas micorrizadas y no micorrizadas infectadas con PepGMV.

## **9. SUGERENCIAS**

Para darle continuidad a este trabajo se sugiere hacer un análisis de la expresión de genes inducidos por micorrización mediante otras técnicas moleculares como la hibridación substractiva de RNA mensajero. Esta técnica permite seleccionar solo los genes inducidos o reprimidos en la condición que se desea estudiar.

Se sugiere analizar la presencia de RNA pequeños relacionados a PepGMV en las plantas micorrizadas y no micorrizadas infectadas con PepGMV ya que son comunes en plantas que presentan remisión.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

**Agrios, George N. 2005.** Plant Pathology. Fifth Ed. Academic Press, London.

**Al-Karaki, G. N. 2000.** Growth of mycorrhizal tomato and mineral acquisition under salt stress. *Mycorrhiza* 10(2): 51-54.

**Anaya-López, J. L., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Garzón-Tiznado, J. A., Pons-Hernández, J. L., Guevara-González, R. G., Muñoz-Sánchez, C., Guevara-Olvera, L., Rivera-Bustamante, R. F., Hernández-Verdugo, S. 2003.** Resistance to *Geminivirus* Mixed Infections in Mexican Wild Peppers. *HortScience* 38(2): 251-255.

**Ascencio-Ibáñez J. T., Arguello-Astorga G.R., Méndez-Lozano J., Rivera-Bustamante R.F. 2002.** First report of *Rhynchosia Golden Mosaic Virus* (RhGMV) infecting tobacco in Chiapas, México. *Plant Disease* 86:692

**Ascencio-Ibáñez, J. T., Diaz-Plaza, R., Méndez-Lozano, J., Monsalve-Fonnegra, Z. I., Argüello-Astorga, G. R., Rivera-Bustamante, R. F. 1999.** First Report of *Tomato Yellow Leaf Curl Geminivirus* in Yucatán, México. *Plant Disease* 83(12): 1178-1178.

**Bai, Y., Lindhout, P. 2007.** Domestication and Breeding of Tomatoes: What have We Gained and What Can We Gain in the Future?. *Annals of Botany* 100(5): 1085-1094.

**Berreiro-Perera M. 1998.** El jitomate, la hortaliza de excelencia en exportación. En: *Claridad agropecuaria*. 2: 3 -18

**Brown., J. K. y Poulos, B. T., 1990.** Serrano golden mosaic virus: a new identified whitefly-transmitted *Geminiviruses* and associated disorders in the Americas and Caribbean Basin. *Plant Dis.* 76: 220-225.

**Brown, J. K. y Bird, J. 1992.** Whitefly-transmitted *Geminiviruses* and associated disorders in the Americas and Caribbean Basin. *Plant and virusvector in agro-ecosystems worldwide*. FAO Plant Prot.Bu 11.41:3-32

**Brown, J. K., A. M. Idris, Olsen, M. W., Miller, M. E., Isakeit, T., Anciso, J. 2000.** Cucurbit leaf curl virus, a New Whitefly Transmitted *Geminivirus* in Arizona, Texas, and Mexico. *Plant Disease* 84(7): 809-809.

**Brown, J. K. y Nelson, M. R., 1986.** Partial characterization of a *Geminivirus*

Isolated from Tomato with Yellow Leaf Curl Symptoms. *Phytopathology* 76(8): 7.

**Brown, J. K. y Nelson, M. R. 1988.** Transmission, Host Range, and Virus-Vector Relationships of Chino del Tomate Virus, a Whitefly-Transmitted *Geminivirus* from Sinaloa, Mexico. *Plant Disease* 72(10): 866 - 869.

**Brown, J. K., R. B. h. 1984.** Geminata particles associated with the leaf curl or "CHINO" disease of tomatoes in coastal areas of western Mexico. *Phytopathology* 74: 97.

**Brown, J. K., P. B. T. 1990.** "Serrano Golden Mosaic Virus: a Newly Identified Whitefly-Transmitted *Geminivirus* of pepper and Tomato in the United States and Mexico." *Plant Disease* 74(9): 720.

**Cardenas-Conejo, Y., G. Arguello-Astorga, Poghosyan, A. Hernandez-Gonzalez, J. Lebsky, V., Holguin-Peña, J., Medina-Hernandez, D., Vega-Peña, S. 2010.** First Report of Tomato yellow leaf curl virus Co-infecting Pepper with Tomato chino La Paz virus in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease* 94(10): 1,266-263.

**Carrillo-Tripp, J., 2006.** Estudio de la remisión de síntomas en plantas de Chile (*Capsicum annuum* L.) infectadas con el Geminivirus del mosaico dorado del Chile (PepGMV). Irapuato, G., México. Tesis de Doctorado. Centro de investigación y de estudios avanzados del IPN.

**Carrillo-Tripp, J., Lozoya-Gloria, E., Rivera-Bustamante, R. F. 2007.** Symptom Remission and Specific Resistance of Pepper Plants After Infection by Pepper golden mosaic virus. *Phytopathology* 97(1): 51-59.

**Cervantes-Díaz, L.M., Rojas-Martínez, E., Alanís-Martínez, R.I., Ochoa-Martínez, I., Valadez-Moctezuma, D. L., Grimaldo-Juárez, E. 2009.** Detección de *Geminivirus* Asociados a la alstroemeria (*Alstroemeria* L.) en la Villa de Guerrero, Estado de México." *Interciencia* 34(12): 903 - 908.

**Conrath U., Beckers G. J. M., Flors V., García-Agustín P., Jakab G., Mauch F., Newman M. Pieterse C. M. J., Pointssot B., Pozo M. J., Pugin A., Schaffrath U., Ton J., Wendehenne D., Zimmerli L., Mauch-Mani B., 2006.** Priming: Getting Ready for Battle. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 1062-1071.

**Cordier, C., Pozo, M. J., Barea, J. M., Gianinazzi, S., Gianinazzi-Pearson, V.**

**1998.** Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mol Plant-Microbe Interact.* 11: 1017-1028

**Choundhary D. K., Praskash A., Johri B. N., 2007.** Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian Journal of Microbiology*, 47: 289-297.

**Credi, R., Betti, L., and Canova, A. 1989.** Association of a *Geminivirus* with a severe disease of tomato in Sicily. *Phytopathologia Mediterranea* 28:223-226

**Cruz, L., Cruz, J., Eloy, M., Oliveira, H., Vaz, H., Tenreiro, R. 2010.** First Report of Bacterial Speck of Tomato Caused by *Pseudomonas syringae* pv. tomato Race 1 in Portugal. *Plant Disease* 94(12): 1504-1504.

**Czosnek, H., Laterrot, H. 1997.** A worldwide survey of tomato yellow leaf curl viruses. *Archives of Virology* 142:1391-1400.

**Daft, M. J., Okusanya, B. O. 1973.** Effect of endogone mycorrhiza on plant growth. *New Phytol.* 72: 975 - 983.

**De la Noval B, Pérez E, Martínez B, León O, Martínez-Gallardo N y Délano-Frier J. 2007.** Exogenous systemin has a contrasting effect on disease resistance in mycorrhizal tomato (*Solanum lycopersicum*) plants infected with necrotrophic or hemibiotrophic pathogens. *Mycorrhiza.* 17: 449-460

**De La Torre-Almaraz, R., Monsalvo-Reyes, A., Romero-Rodríguez, A., Argüello-Astorga, G. R., Ambriz-Granados, S., 2006.** A New *Begomovirus* Inducing Yellow Mottle in Okra Crops in México is Related to *Sida yellow vein virus*. *Plant Disease* 90(3): 378-378.

**Espinoza-Mancillas, M. G. 2008.** Análisis de la diversidad genética de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Pseudomonas syringae* pv. tomato y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* en cultivos de tomate en Sinaloa. Guasave. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. 130 p.

**Faostat.fao.org, 2011.** www.faostat.fao.org

**Fauquet, C. M., Stanley, J., 2005.** Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of *Geminivirus* taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. *Archives of Virology* 150:2151-2159

**Fauquet, C., Mayo M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. 2005.** Virus Taxonomy VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. (eds) Elsevier.

**Fauquet, C. M., Bisaro, D. M., Briddon, R. W., Brown, J. k., Harrison, B.D., Rybicki, E. p., Stenger, D.C., Stanley, J. 2003.** Revisión of taxonomic criteria for species demarcation in the family Geminiviridae, and an updated list of *Begomovirus* species. Archives of Virology 148, 405-421.

**Fauquet, C., Briddon, R., Brown, J., Moriones, E., Stanley, J. Zerbini, M., Zhou, X. 2008.** *Geminivirus* strain demarcation and nomenclature. Archives of Virology 153(4): 783-821.

**Fracchia, S., Garcia-Romera, I., Godeas, A., Ocampo, J. A. 2000.** the saprophytic fungus *Fusarium oxysporum* on arbuscular mycorrhizal colonization and growth of plants in greenhouse and field trials. Plant and Soil. 233: 177- 186

**Fritz, M., Jakobsen, I., Lyngkjaer M. F., Thordal-Christensen H., Pons-Kuhnemann J. 2006.** Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. Mycorrhiza. 16(6), 413-9

**Galindo Flores, Hugo., 2008.** Resistencia iinducida por micorrización en tomate (*Lycopersicon sculentum* Mill.) ante *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Guasave. S. México. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. 117 p.

**Gallou, A., H. P. Lucero-Mosquera, H. P., Cranebrouck, S., Suárez, J. P., Declerck, S. 2011.** Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*. Physiological and Molecular Plant Pathology In Press, Corrected Proof.

**Gámez-Jiménez, C. Romero-Romero, J.L., Santos-Cervantes, M. E., Leyva-López, N. E., Méndez-Lozano, J. 2009.** Tomatillo (*Physalis ixocarpa*) as a Natural New Host for Tomato yellow leaf curl virus in Sinaloa, Mexico. Plant Disease 93(5): 545.541.

**García-Chapa M, Batlle A, Laviña A, Camprubí A, Estaún V, Calvet C. 2004.** Tolerance increase to pear decline phytoplasma in mycorrhizal OHF-333 pear rootstock. Acta Hort. 657:437–441

**García-Garrido J. M., Ocampo J. A. 1989.** Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. Soil Biol Biochem . 21,165–167

**Garrido-Ramirez, E. R., Gilbertson, R. L. 1998.** First report of Tomato mottle *Geminivirus* infecting tomatoes in Yucatan, Mexico. Plant Dis. 85:592.

**Garzón-Tiznado, J. A., Acosta-García, G. 2002.** Presencia de los *Geminivirus*, Huasteco del Chile (PHV), Texano del Chile Variante Tamaulipas (TPV-T), y Chino del Tomate (VCdT), en los Estados de Guanajuato, Jalisco y San Luis Potosí, México. Revista Mexicana de Fitopatología 20(001): 45 - 52.

**Garmendia, I., Goicoechea, N., Aguirreolea, J., 2004.** Antioxidant Metabolism in Asymptomatic Leaves of Verticillium-infected Pepper Associated with an Arbuscular Mycorrhizal Fungus. 11., 593-595

**Garzón-Tiznado, J. A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibáñez, J. T. Herrera-Estrella, Rivera-Bustamante, R. F. 1993.** Inoculation of peppers with infectious clones of a new *Geminivirus* by a biolistic procedure. Phytopathology. 83: 514-521.

**Gianinazzi-Pearson, V., 1984. Host-Fungus specificity recognition and compatibility in mycorrhizae.** In Genes involved in microbe plant interaction: Advance in plant gene research, Basic Knowledge and application. E.S. Denise, B., Hohn., Th. Hohn., P. King, I. Schell, and D. P. S. Verma Eds (New York: Springer – Verlag), pp 225 – 253.

**Gianinazzi-Pearson, V., 1996.** Plant cell responses to arbuscular mycorrhiza fungi: Getting to the roots of the symbiosis. Plant Cell. 8., 1871-1883.

**Glick, E., Levy, Y., Gafni, Y., 2009.** The viral etiology of tomato yellow leaf curl disease – A review. Plant Protect. Sci. Vol 45, 3:81-97.

**Gutierrez, C. 2000.** DNA replication and cell cycle in plants: learning from *Geminiviruses*. EMBO J 19(5): 792-799.

**Gutiérrez, C., Ramírez-Parra, E., Castellano, M. M., Sanz-Burgos, A. P., Luque, A., and Missich, R. 2004.** *Geminivirus* DNA replication and cell cycle interactions, Vet. Microbiol. 98:111-119.

**Hanley-Bowdoing, L., Settlege, S., Orozco, B. M., Nagar, S., Robertoson, D. 2000.** *Geminivirus*: Models for plant DNA replication, transcription, and cell cycle

regulation. Crit. Rev. Plant Sci. 18 (1):71-106

**Harrison, B.D., Barker, H., Boock, K. R., Guthie, E. J., Meredith, G. And Atkinson, M. 1977.** Plant viruses with circular single-strand DNA. Nature 270: 760-762

**Harrison, M. J., 2005.** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. Annual reviews of microbiology, 59, 19-42.

**Heil, M. y Bostock, R. M. 2002.** Induced Systemic Resistance (ISR) Against Pathogens in the Context of Induced Plant Defences. Annals of Botany 89(5): 503-512.

**Hernández-Zepeda, C., Brown, J. K., Moreno-Valenzuela, O., Argüello-Astorga, G. R., Idris, A. M., Carnevali, G., Rivera-Bustamante, R. F. 2010.** Characterization of Rhynchosia yellow mosaic Yucatan virus, a new recombinant *Begomovirus* associated with two fabaceous weeds in Yucatan, Mexico. Archives of Virology 155(10): 1571-1579.

**Hernández-Zepeda, C., Idris A. M., Carnevali, G., Brown, J. K., Moreno-Valenzuela, O. 2007.** Molecular characterization and phylogenetic relationships of two new bipartite *Begomovirus* infecting malvaceous plants in Yucatan, Mexico. Virus Genes 35(2): 369-377.

**Hernández-Zepeda, C., Idris A. M., Carnevali, G., Brown, J. K., Moreno-Valenzuela, O. 2007.** Molecular characterization and experimental host range of Euphorbia mosaic virus-Yucatan Peninsula, a *Begomovirus* species in the Squash leaf curl virus clade. Plant Pathology 56(5): 763-770.

**Holguín-Peña, R. J., Arguello-Astorga, G. R., Brown, J. K., Rivera-Bustamante, R. F. 2006.** A New Strain of Tomato chino La Paz virus Associated with a Leaf Curl Disease of Tomato in Baja California Sur, Mexico. Plant Disease 90(7): 973-973.

**Holguín-Peña, Vázquez-Juárez, R., Rivera-Bustamante, R. F., 2004.** Pepper golden mosaic virus Affecting Tomato Crops in the Baja California Peninsula, Mexico. Plant Disease 88(2): 221-221.

**Holguín-Peña, R. J., R. Vázquez-Juárez, et al., (2005).** "A New *Begomovirus* Causes Tomato Leaf Curl Disease in Baja California Sur, Mexico." Plant Disease

89(3): 341-341.

**Holguín-Peña, R. J., Vázquez-Juárez, R. C., Martínez-Soriano, J. P. 2007.** First Report of a 16Srl-B Group Phytoplasma Associated with a Yellowing-Type Disease Affecting Tomato Plants in the Baja California Peninsula of Mexico. *Plant Disease* 91(3): 328-328.

**Holguín-Peña, R. J., Vázquez Juárez, R., Rivera-Bustamante, R. F., 2003.** First Report of a *Geminivirus* Associated with Leaf Curl in Baja California Peninsula Tomato Fields. *Plant Disease* 87(11): 1397-1397.

**Hutvagner, G., L. Mlynárová, L., Nap, J. P. 2000.** Detailed characterization of the posttranscriptional gene-silencing-related small RNA in a GUS gene-silenced tobacco. *RNA* 6(10): 1445-1454.

**Hunziker, A.T. 1979.** South American Solanaceae: a synoptic survey. En: Hawkes JG, Lester RN, Skelding AD (eds) *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London. Pp 49 – 85

**Idris, A. M. y Brown J. K. 1998.** Sinaloa Tomato Leaf Curl *Geminivirus*: Biological and Molecular Evidence for a New Subgroup III Virus. *Phytopathology* 88(7): 648-657.

**Idris, A. M., Lee, S. H., Brow, J. K. 1999.** First Report of Chino del Tomate and Pepper Hausteco Geminiviruses in Greenhouse-Grown Tomato in Sonora, Mexico. *Plant Disease* 83(4): 396-396.

**Garzón-Tiznado, J. A., Torres-Pacheco, I., Ascencio-Ibañez, J.T., Herrera-Estrella, L., Rivera-Bustamante, R.F. 1993.** Inoculation of Peppers with Infectious clones of a New *Geminivirus* By a Biolistic Procedure. *Phytopathology* 83(5): 514 - 521.

**Sambrook, J., Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning*, Eds Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Jones J. P. 1991.** Fusarium wilt. In: JONES JB; JONES JP; STALL RE; ZITTER TA. (eds.). *Compendium of Tomato Diseases*. Saint Paul, Minnesota, APS PRESS, p.15.

**Lazarowitz, S.G. 1992.** *Geminiviruses: genome structure and gene function*. *Critical Review of Plant Science*, 11:327-429

**Li, B., Ravnskov, S., Xie, G., Larsen, J. 2007.** “Biocontrol of *Pythium*; damping-off in cucumber by arbuscular mycorrhiza-associated bacteria from the genus *Paenibacillus* *BioControl* 52(6): 863-875

**Liu J, Lopez-Meyer M., Cheung, F., Town C. D., Maldonado-Mendoza E., Harrison M. J. 2007.** The arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *The plant Journal*. 50:529-544.

**Lingua G., D’Angostino G., Massa N., Antosiano M., Berta G. 2002.** Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. *Mycorrhiza* 12:191-198.

**Lilly, S. T., Drummond, R. S. M., Pearson, M. N., MacDiarmid, R. M. 2010.** “Identification and Validation of Reference Genes for Normalization of Transcripts from Virus-Infected *Arabidopsis thaliana*.” *Molecular Plant-Microbe Interactions* 24(3): 294-304.

**Kaminska, M., Klamkowski, K., Berniak, H., Sowik, I. 2010.** Response of mycorrhizal periwinkle plants to aster yellows phytoplasma infection. *Mycorrhiza*. 20 (3), 161-166

**Khalaf-Alhussaen, E. I. H., Khalid M. Al-Batayneh, Mahmoud Al-Khatib, Wesam Al Khateeb, Jacob H. Jacob, Mohamad A. Shatnawi, Ashraf Khashroum and Mohamed I. Hegazy. 2011.** Identification and Controlling *Pythium* sp. Infecting Tomato Seedlings Cultivated in Jordan Valley using Garlic Extract. *Asian Journal of Plant Pathology* 5(2): 84-92.

**Tahat, M.M., Sijam, K., Othman, R. 2010.** Mycorrhizal Fungi as a Biocontrol Agent. *Plant Pathology Journal*. 9: 198 - 207.

**Mauricio-Castillo, J. A., Argüello-Astorga, G. R., Alpuche-Solis, A. G., Monreal-Vargas, C. T., Díaz-Gómez, O., De la Torre-Almaraz, R. 2006.** First Report of Tomato severe leaf curl virus in México. *Plant Disease* 90(8): 1116-1116.

**Méndez-Lozano, J., Perea-Araujo, L. L., Ruelas-Ayala, R.D., Leyva-López, N. E., Mauricio-Castillo, J. A., Argüello-Astorga, G. R., 2006.** A *Begomovirus* Isolated from Chlorotic and Stunted Soybean Plants in Mexico is a New Strain of *Rhynchosia* golden mosaic virus. *Plant Disease* 90(7): 972-972.

**Méndez-Lozano, J., Quintero-Zamora, E., Barbosa-Jassco, M. P., Leyva-López, N. E., Garzón-tiznado, J. A., Argüello-Astorga, G. R. 2006.** A *Begomovirus* Associated with Leaf Curling and Chlorosis of Soybean in Sinaloa, Mexico is Related to Pepper golden mosaic virus. *Plant Disease* 90(1): 109-109.

**Méndez- Lozano J., Rivera-Bustamante, R. F., Fauquet, C. M. De La torre – Almaraz, R. 2001.** *Pepper huasteco virus* and *Peppers golden mosaic virus* are *Geminiviruses* affecting tomatillo (*Physalis ixocarpa*) crops in México. *Plant disease*, 85;1291.

**Montealegre, J. R., Reyes, R., Pérez, L. M., Herrera, R., Silvia, P., Besoain, X. 2003** Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology* 6: 115-127.

**Mora-Romero, G. A., 2008.** Efecto de la micorrización con *Glomus intrarradices* en la tolerancia al moho blanco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* en tres líneas de frijol. Guasave. S., México. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. 99 p.

**Morales F. J., Anderson P. K., 2001.** The emergence and dissemination of whitefly-transmitted *Geminiviruses* in Latin America. *Archives of Virology* 146:415-441.

**Pongtharin Lotrakul, R. A., Valverde, R. T., Sim, J., 2000.** Occurrence of a Strain of Texas pepper virus in Tabasco and Habanero Pepper in Costa Rica. *Plant Disease*. 84, 168 – 172.

**Paximadis, M., Idris, A. M., Torres-Jerez, I., Villareal, A., Rey, M.E.C., Brown, J. K. 1999.** Characterization of tobacco *Geminiviruses* in the Old and New World. *Archives of Virology* 144(4): 703-717.

**Holguín-Peña, R. J. Vázquez-Juárez, R., Rivera-Bustamante, R.F. 2004.** Rango de Hospedantes, Incidencia y Filogenia del Virus del mosaico Dorado del Chile (PepGMV) en Baja california Sur, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(002): 206 - 215.

**Pozo, M. J. y Azcón-Aguilar, C. 2007.** Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10(4): 393-398.

**Pieterse, C., Van Wees, S., Hoffland, E., Van Pelt, J.A., and Van Loon, L. C.**

**1996.** Systemic Resistance in Arabidopsis induced by biocontrol Bacteria is independent of Salicylic Acid Accumulation and Pathogenesis-Related Gene Expression. 10.1105/tpc.8.8.1225. Plant Cell, 8, 1255-1237

**Pohronezny, K., Waddill, V.H. Schuster, D.J., Sonoda, R.M. 1986.** Integrated pestmanagement for Florida tomatoes. Plant Dis. 70: 92-102.

**Polston, J. E., & Anderson, P.L. 1997.** The emergence of whitefly transmitted *Geminiviruses* in tomato in the Western Hemisphere. Plant dis. 81: 1358-1369.

**Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M., Azcon-Aguilar, C. 2002.** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. J. Exp. Bot., 53, 525-534.

**Rentería-Canett, I. (2011).** Infecciones mixtas de Geminivirus en plantas de Chile: Interacción sinérgica entre PHYVV y PePGMV. Irapuato, Gto., México. Tesis de Doctorado. Centro de investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional: 100.

**Rybicki, e. P., Briddon, R., Brown, J. K., Fauquet, C., Maxwell, D. P., Stanley, J., Harrison, B.D., Markham, P., Bisaro, D. M. & Robinson, D. J. 2000.** Family *Geminiviridae*. In Virus Taxonomy. Pp. 285-297.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989.** Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd edición. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanderfoot, A., y Lazarowitz, S. G. 1996.** Getting it together in plant virus movement: cooperative interactions between bipartite *Geminivirus* movement proteins, Trends Cell Biol. 6:353-358.

**Sánchez-Campos, S., Navas-Castillo, J., Camero, R., Soria, C., Diaz, J. A. Moriones, E.1999.** Displacement of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)-Sr by TYLCV-Is in tomato epidemics in Spain. Phytopathology 89:1038-1043.

**Santos-Cervantes, M. E., Chávez-Medina, J. A., Méndez-Lozano, J, 2008.** Detection and Molecular Characterization of Two Little Leaf Phytoplasma Strains Associated with Pepper and Tomato Diseases in Guanajuato and Sinaloa, Mexico. Plant Disease 92(7): 1007-1011.

**Settlage, S. B., See, R. G., Hanley-Bowdoin, L. 2005.** *Geminivirus C3 Protein: Replication Enhancement and Protein Interactions.* J. Virol. 79(15): 9885-9895.

**Shaul, O., Galili, S., Volpin, H., Ginzberg, I., Elad, Y., Chet, I., Kapulnik, Y., 1999.** Mycorrhiza-Induced Changes in Disease Severity and PR Protein Expression in Tobacco Leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12(11): 1000-1007.

**Siap, 2011.** [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx)

**Smith, A. F., 2001.** The tomato in America: early history, culture, and cookery, University of South Carolina Press.

**Smith, S. E. y Smith S. A., 2011.** Roles of Arbuscular Mycorrhizas in Plant Nutrition and Growth: New Paradigms from Cellular to Ecosystem Scales." *Annual Review of Plant Biology* 62(1): 227-250.

**Smith y Andrew, F. 1994.** The tomato in America: Early history, culture and cookery.

**Smith S. E., Read D. J., 1997.** Mycorrhizal symbiosis. Academic, London

**Smith S. E., Smith F. A., Jakobsen I. 2004.** Functional diversity in arbuscular mycorrhizal (AM) y symbioses: the contribution of the mycorrhizal P uptake pathway is not correlated with mycorrhizal responses in growth or total P uptake. *New Phytol* 162, 511-524.

**Song, W., Ma, X., Tan, H., Zhou, J. 2011.** Abscisic acid enhances resistance to *Alternaria solani* in tomato seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 49(7): 693-700.

**Stoner, W. N., & Hogan, W. D., 1950.** Viruses affecting vegetable crops in the everglades area. Florida Agriculture Experimental Station Annual report, 206

**Sunter G, Bisaro D.M. 1992.** Transactivation of geminiviruses AR1 and BR1 gene expression by the viral AL2 gene product occurs at level of transcription. *Plant Cell* 4:1321-1331.

**Tavazza, L. 2009.** Reply to First transgenic *Geminivirus*-resistant plant in the field. *Nat Biotech* 27(12): 1088-1089.

**Taylor J., Harrier L. A., 2003.** Expression studies of plant genes differentially

expressed in leaf and root tissues of tomato colonised by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Mol Biol.* 4, 619-629.

**Torres-Pacheco, I. Garzón-Tiznado, J. A., Brown, J. K., Becerra-Flora, A., Rivera-Bustamante, R. F. 1996.** Detection and Distribution of *Geminiviruses* in Mexico and the Southern United States. *Phytopathology* 86(1186 - 1192).

**Torres-Pacheco, I., Garzón-Tiznado, J.A., Herrera-Estrella, L., Rivera-Bustamante, R.F. 1993.** Complete nucleotide sequence of pepper huasteco virus: analysis and comparison with bipartite *Geminiviruses*” *Journal of General Virology* 74(10): 2225-2231.

**Umaharan, P., Padidam, M., Phelps R. H., Beachy, R. N. & Fauquet, C. M. 1998.** Distribution and diversity of *Geminiviruses* in Trinidad and Tobago. *Phytopathology* 88, 1262-1268

**Van Loon L. C., 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal Plant Pathology*, 119: 243-254.

**Van, W., Saskia, C.M., Van, E., Sjoerd, P., Corné, M. J., 2008.** Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (4), 443-448

**Van-Wezel, R., Dong. X., Blake, P., Stanley, J., Hong, Y., 2002.** “Differential roles of *Geminivirus* Rep an AC4 (C4) in the induction fo necrosis in *Nicotiana benthamiana*.” *Molecular Plant Pathology*” 3 (6): 461-471.

**Vlot A. C., Klessig D. F., Park S. W., 2008.** Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 436–442.

**Vega-Arreguín y Rivera-Bustamante. 2001.** Los virus: Cómplices para Descifrar Procesos Moleculares en Planta. *Avance y Perspectiva*, vol. 20.

**Ward, B. M. Y Lazarowitz, S. G. 1999.** Nuclear export in plants: use *Geminivirus* movement proteins for a cell-based export assay. *The Plant Cell* 11:1267-1276.

**Zhang, W., Olson, N.H., Baker, T.S., Faulkner, L., Agbandje-McKenna, M., Boulton, M.I., Davies, J. W., McKenna, R. 2001.** Structure of the *Maize Steak Virus* geminate particle. *Virology* 279 (2): 471 – 477.

**Walters D. y Heil M., 2007.** Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 71: 3–17.

**Zubiaur, T., Fonseca, D., Quinones, M., and Oalenzuela, I. 2004.** Presence of *Tomato yellow leaf curl virus* infecting squash (*Cucurbita pepo*) in Cuba. *Plant Dis.* 88:572.