



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA
SIMBIOSIS MICORRÍZICA ARBUSCULAR
EN PLANTAS INFECTADAS CON *Tobacco
mosaic virus***

ESMERALDA JUDITH CRUZ GUTIÉRREZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2013

La presente tesis, titulada: **Estudio de la interacción de la simbiosis micorrízica arbuscular en plantas infectadas con *Tobacco mosaic virus***, realizada por la alumna: **Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



DR. RONALD FERRERA CERRATO

ASESOR



DR. ALEJANDRO ALARCÓN

ASESOR



DR. DANIEL LEOBARDO OCHOA MARTÍNEZ

ASESOR



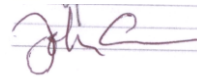
DRA. MA. ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR




DRA. BEATRIZ XOCONOSTLE CÁZARES

ASESOR



DR. JOHN LARSEN

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Junio de 2013.



La presente tesis “Estudio de la interacción de la simbiosis micorrízica arbuscular en plantas infectadas con virus sistémicos” fue parcialmente financiada por el **Fideicomiso Revocable de Administración e inversión No. 167304 de 2009** y por el proyecto **SEP-CONACYT 58594**.

ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA ARBUSCULAR EN PLANTAS INFECTADAS CON *Tobacco mosaic virus*

Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2013.

Este estudio evaluó la respuesta fisiológica en plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) y de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) inoculadas con un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) o con *Rhizophagus intraradices*, e infectadas con el *Tobacco mosaic virus* (TMV). Además, se analizó la posible transferencia de partículas virales a través de las hifas de los HMA de una planta enferma a una planta sana. Este trabajo se dividió en dos capítulos, el primer capítulo describe el crecimiento, el contenido de clorofila total, la determinación de la fosfatasa ácida de la raíz, el contenido total de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante total, y la colonización micorrízica, en plantas de jitomate colonizada por *R. intraradices* e infectada por el TMV. El segundo capítulo describe la posible transferencia del TMV de una planta enferma de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) a una planta sana a través de las hifas de los HMA, y evaluando el crecimiento de la planta, el contenido de clorofila total, la actividad de la fosfatasa ácida de la raíz, el contenido total de compuestos fenólicos, la actividad antioxidante total, la colonización micorrízica, y la detección de virus en hojas y raíz, y en esporas de los HMA por RT-PCR. En general, los resultados mostraron que los HMA no atenuaron el daño ni los síntomas causados por la enfermedad del TMV en las plantas de jitomate y tabaco. Las estructuras de los HMA podrían transmitir al TMV de una planta enferma a una planta sana por el contacto cercano de los HMA con las células de la raíz de una planta infectada con el virus.

Palabras clave: interacción virus-hongo, vector, solanáceas, fisiología, micorriza.

**STUDYING THE INTERACTION BETWEEN THE ARBUSCULAR MYCORRHIZAL
PLANTS INFECTED WITH THE *Tobacco mosaic virus***

Esmeralda Judith Cruz Gutiérrez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2013.

This study evaluated the physiological responses of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) and tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants inoculated with a consortium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) or with *Rhizophagus intraradices*, and infected with the *Tobacco mosaic virus* (TMV). The possible transference of viral particles throughout via mycelium of AMF from diseased plants to healthy plants was also analyzed. This research was divided in two chapters. First chapter describes the growth, total chlorophyll content, acid root phosphatase, total content of phenolic compounds, total antioxidant activity, and the mycorrhizal colonization of tomato plants inoculated with *R. intraradices* and/or infected with TMV. Second chapter describes the transference of TMV from a diseased tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.) to healthy ones via AMF mycelium, also evaluates the growth, the total chlorophyll content, acid root phosphatase, total content of phenolic compounds, total antioxidant activity, the mycorrhizal colonization, and the virus detection in leaves and roots, and in AMF spores by RT-PCR method. Overall, results showed that AMF did not attenuate either damage or symptoms caused by TMV in tomato or tobacco plants. AMF structures may harbor and transmit the TMV from diseased to healthy plants due to direct contact of AMF with roots of plants infected with this virus.

Key words: virus-fungi interactions, vector, Solanaceae, mycorrhiza.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, por permitirme desarrollar mis estudios de Doctorado en Ciencias.

A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología), por la beca proporcionada durante el periodo de Enero 2008-Diciembre 2011.

Al Colegio de Postgraduados por el apoyo del Fideicomiso Revocable de Administración e inversión No. 167304 de 2009.

A COMECYT (Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología), por la beca proporcionada para la elaboración de la tesis.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, por la formación y orientación académica, por su apoyo para la terminación de la investigación y de la tesis y sobre todo por sus consejos para mi formación personal.

Al Dr. Alejandro Alarcón, por su apoyo en la investigación y realización de la tesis, gracias por su apoyo.

Al Dr. Daniel L. Ochoa Martínez, por su orientación en la investigación y por apoyar parte de esta investigación en su laboratorio.

A todo mi consejo particular, Dra. Ma. Alejandra Gutiérrez Espinosa, Dra. Beatriz Xoconostle Cásarez, Dr. John Larsen, por su valiosa participación en este trabajo y sus acertados comentarios y por la información prestada para la terminación de la tesis.

A los investigadores del Área de Microbiología: Dr. Juan José Almaraz Suarez, Dr. Jesús Pérez-Moreno, M.C. María Encarnación Lara Hernández, por su amistad que me ofrecieron, por el espacio y la ayuda prestada en los laboratorios de Fijación y de Micorrizas.

A la Srita. Rosario Galicia, por su amistad y su apoyo en los trámites realizados durante mi estancia en el área de microbiología.

Al personal del Área de Microbiología por su apoyo en el laboratorio: Sr. Edmundo Martínez Galán, Sr. Lorenzo Viana Monsalvo, Sr. Manuel Solano Díaz, Sr. Fernando López Santillán.

A mis compañeros, porque me brindaron su amistad, su apoyo y su tiempo durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados, siempre los tendré en mis pensamientos y espero seguir contando con todos ustedes: Alicia, Claudia Ordóñez, Claudia De La Rosa, Rosalba, Magda, Yesica, Miguel, Paco, Vivian, Mariela, Brigsania, Deysi, Alfonso, Violeta, Alejandra, Nadia, Esther, Judith, Eliseo, Susana, Cristina, Yadira, Raúl, Apolinar, Azucena, Blanca, Mariano, Nora, Araceli, Imelda Arcadio, Antonio, Misael, Cesar, Miguel, Alejandro Cenobio.

A la Dra. María Elena Ramírez, por su amistad, por estar siempre apoyándome cuando la necesitaba y al Dr. Aquiles Carballo por sus consejos y por la amistad que me brindo.

Al Dr. José Fernando De La Torre Sánchez, director del Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP, por todo su apoyo brindado para terminar el doctorado en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Carlos Romás Castillo Martínez y a la M. C. Claudia Pérez Mendoza, investigadores del CNRG-INIFAP por sus consejos que me han dado y por brindarme su amistad.

Al todo el personal de apoyo administrativo del CNRG-INIFAP por su apoyo y amistad, Martha, Issis, Enrique, Ceci, Sandra Casillas, Nena, Primi, los Farias.

A la familia Castillo Velázquez por estar siempre con nosotros, Amalia y Paola, Gracias.

A todos aquellos que están a mi lado.

DEDICATORIA

A DIOS, por todo lo me ha permitido realizar, por guiar mis pasos por buen sendero, por permitirme realizar mis metas.

A mis papás por brindarme su amor, su apoyo en los momentos más difíciles. Gracias por sus consejos e inculcarme valores.

A mi hijo Sebastián, mi motorcito que tengo para seguir adelante, te quiero mucho mi Corazón de Melón.

A mis amigos del alma que siempre me brindaron su mano con cada tropiezo, gracias por no dejarme caer en los momentos difíciles. Gracias por sus consejos.

A mi abuelita Francisca Ramírez que siempre me dio consejos que me ayudaron hacer una mejor persona. Gracias por cuidarme y más ahora que te encuentras en el cielo. Cuídanos desde donde te encuentres y a mia abuelito Juan Gutiérrez Ramírez, que este mucho más tiempo con nosotros.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	xii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II.....	4
OBJETIVOS E HIPÓTESIS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS PARTICULARES	4
HIPÓTESIS.....	5
HIPÓTESIS GENERAL.....	5
HIPÓTESIS PARTICULARES	5
CAPÍTULO III.....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
HONGOS DE VIDA LIBRE Y HONGOS SIMBIÓTICOS, Y SU RELACIÓN CON VIRUS FITOPATÓGENOS.....	6
<i>Tobacco mosaic virus</i>	6
Jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	7
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	8
Efecto de la infección del virus en el desarrollo de las plantas	9
Hongos micorrízicos arbusculares	9
Interacción entre las plantas de jitomate y tabaco colonizadas por los hongos micorrízicos arbusculares.....	11
Interacción de los virus fitopatógenos sistémicos con hongos de la rizosfera.....	12
Relación virus-hongos fitopatógenos con origen en el suelo.....	17

Virus que se transmiten por hongos habitantes del suelo	18
Justificación y relevancia de la investigación	20
CAPÍTULO IV	22
RESPUESTAS DE PLANTAS DE JITOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) A LA INOCULACIÓN DE <i>Rhizophagus intraradices</i> Y A LA INFECCIÓN DEL <i>Tobacco mosaic virus</i>	22
Resumen	22
CHAPTER IV	23
RESPONSES OF TOMATO PLANTS (<i>Solanum lycopersicum</i>) TO THE INCOULATION OF <i>Rhizophagus intraradices</i> AND WITH THE INFECTION OF <i>Tobacco mosaic virus</i>	23
Abstract.....	23
Introducción.....	24
Materiales y métodos.....	26
Material vegetal, hongo micorrízico arbuscular y fuente de inóculo del virus.....	26
Severidad de síntomas causados por el TMV.....	28
Evaluación del crecimiento de la planta.....	28
Contenido de clorofila total.....	28
Determinación de la fosfatasa ácida en raíz.....	29
Contenido total de compuestos fenólicos y determinación de la actividad antioxidante total.....	29
Colonización micorrízica medida por tinción vitañ de la fosfatasa alcalina del hongo.....	30
Diseño experimental	31
Resultados.....	31
Severidad de síntomas causados por el TMV	31
Evaluación del crecimiento de la planta	31

Contenido de clorofila, fosfatasa ácida en raíz, contenido total de fenólicos y actividad antioxidante.....	34
Colonización micorrízica arbuscular	36
Discusión	36
Conclusión.....	40
CAPÍTULO V.....	41
EVALUACIÓN DE LA POSIBLE TRANSFERENCIA DEL <i>Tobacco mosaic virus</i> EN HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES QUE COLONIZAN PLANTAS DE TABACO	41
Resumen	41
CHAPTER V	43
EVALUATION OF THE POSSIBLE TRANSFERENCE OF THE <i>Tobacco mosaic virus</i> VIA ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN TOBACCO PLANTS	43
Abstract.....	43
Introducción.....	45
Materiales y métodos	46
Material vegetal, hongo micorrízico arbuscular y fuente de inóculo del virus	46
Evaluación del crecimiento de la planta	51
Contenido de clorofila total	51
Determinación de la fosfatasa ácida en raíz	51
Contenido total de fenólicos y determinación de la actividad antioxidante total	52
Colonización micorrízica arbuscular	53
Detección de virus en hojas y raíz de las plantas de tabaco, y en esporas del HMA por RT-PCR.....	54
Diseño experimental.....	57
Resultados	58

Evaluación del crecimiento de la planta.....	58
Actividad antioxidante, contenido total de compuestos fenólicos, contenido de clorofila total	64
Detección de TMV en hojas y raíz de plantas de tabaco y en esporas de HMA por RT-PCR .	70
Colonización micorrízica	74
Discusión.....	76
Conclusión.....	82
CAPÍTULO VI	83
CONCLUSIONES GENERALES	83
LITERATURA CITADA	86
APÉNDICE I	109
APÉNDICE II.....	112

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 4.1. Respuesta del crecimiento de las plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) infectadas con el <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) e inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> (Ri) después de 40 días de la infección viral.....	33
Cuadro 4.2. Efecto de la colonización por el hongo micorrízico arbuscular <i>Rhizophagus intraradices</i> (Ri) sobre el contenido total de clorofila, actividad fosfatasa ácida de la raíz, y contenido total de compuestos fenólicos y actividad total antioxidante en hojas de plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) infectadas con <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV), después de 40 días de la infección viral.....	35
Cuadro 5.1 Característica de los géneros que conforman el consorcio utilizado en el experimento.....	48
Cuadro 5.2. Efecto de la infección del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el peso seco (g) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.....	60
Cuadro 5.3. Efecto de la infección del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el área foliar (cm ²) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.....	61
Cuadro 5.4. Efecto de la infección del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el área foliar específica de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.....	62

Continuación...	Página
Cuadro 5.5. Efecto de la infección del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la relación raíz-parte aérea (g g^{-1}) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.....	63
Cuadro 5.6. Efecto de la infección del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la fosfatasa ácida de la raíz ($\mu\text{M } p\text{-NP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.....	65
Cuadro 5.7. Efecto de la infección del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la actividad antioxidante total ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.....	67
Cuadro 5.8. Efecto de la infección del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el contenido total de compuestos fenólicos ($\mu\text{g ácido clorogénico g}^{-1}$) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.....	68
Cuadro 5.9. Efecto de la infección del <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el contenido del contenido de clorofila total de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.....	69

Continuación...	Página
Cuadro 5.10. Porcentaje de colonización por el hongo micorrízico arbuscular (HMA) en raíces de plantas de tabaco infectadas con el <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) después de 30 días de la infección.	75
Cuadro 5.11. Colonización por el hongo micorrízico arbuscular (HMA) por el método de la actividad de la fosfatasa alcalina, en raíces de plantas de tabaco infectadas con el <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) después de 30 días de la infección.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1. Esquematación del ciclo de vida del hongo <i>Spongospora subterranea</i> con diferentes eventos hipotéticos en la transmisión de <i>Potato mop-top pomovirus</i> (PMTV) (Arif, 2000).....	15
Figura 4.1. Área foliar (A) y área foliar específica (B) de las plantas de jitomate (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) infectadas con el <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV) e inoculadas con <i>Rhizophagus intraradices</i> , después de 40 días de la infección viral. Letras distintas en las barras son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$), $n = 5$, medias \pm error estándar.....	32
Figura 5.1. Esquema de la unidad experimental. a) Vista frontal. b) Vista lateral. Compartimentos A, plantas con virus según el tratamiento y Compartimento B, plantas libres de virus.....	49
Figura 5.2. Calidad del ARN de hojas de planta de tabaco. Pozo 1 CONS+TMV4-A; Pozo 2 CONS+SV4-B; Pozo 3 Ri+TMV5-A; Pozo 4 Ri+SV5-B; Pozo 5 TMV3-A; Pozo 6 SV3-B; Pozo 7 CONS1-A; Pozo 8 CONS1-B; Pozo 9 Ri2-A; Pozo 10 Ri2-B; Pozo 11 plantas testigo compartimento A; Pozo 12 plantas testigo Compartimento B; Pozo 13 control negativo; Pozo 14 Control positivo.....	71
Figura 5.3. Productos de RT-PCR obtenidos con iniciadores específicos para <i>Tobacco mosaic virus</i> en hojas de tabaco, electroforesis. Pozo 1 marcador de peso molecular 1 kb; Pozo 2 CONS+TMV4-A; Pozo 3 CONS4-B; Pozo 4 Ri+TMV5-A; Pozo 5 Ri+SV5-B; Pozo 6 TMV3-A; Pozo 7 SV3-B; Pozo 8 CONS1-A; Pozo 9 CONS1-B; Pozo 10 Ri2-A; Pozo 11 Ri2-B; Pozo 12 plantas testigo Compartimento A; Pozo 13 plantas testigo Compartimento B; Pozo 14 control negativo; pozo 15 control positivo.....	72

Continuación...	Página
<p>Figura 5.4. Calidad del ARN de raíces de planta de tabaco. Pozo 1 CONS+TMV4-A; Pozo 2 CONS+SV4-B; Pozo 3 Ri+TMV5-A; Pozo 4 Ri+SV5-B; Pozo 5 TMV3-A; Pozo 6 SV3-B; Pozo 7 CONS1-A; Pozo 8 CONS1-B; Pozo 9 Ri2-A; Pozo 10 Ri2-B; Pozo 11 plantas testigo negativo compartimento A; Pozo 12 plantas testigo negativo Compartimento B.....</p>	73
<p>Figura 5.5. Productos de RT-PCR obtenidos con iniciadores específicos para <i>Tobacco mosaic virus</i> en raíces de tabaco, electroforesis. Pozo 1 y 11 marcador de peso molecular de 1 kb; Pozo 2 CONS+TMV4-A; Pozo 3 CONS+SV4-B; Pozo 4 Ri+TMV5-A; Pozo 5 Ri+SV5-B; Pozo 6 TMV3-A; Pozo 7 SV3-B; Pozo 8 CONS1-A; Pozo 9 CONS1-B; Pozo 10 Ri2-A; Pozo 12 Ri2-B; Pozo 13 plantas testigo Compartimento A; Pozo 14 plantas testigo Compartimento B; Pozo 15 control negativo; pozo 16 control positivo.....</p>	73
<p>Figura 5.6. Productos de RT-PCR obtenidos con iniciadores específicos para <i>Tobacco mosaic virus</i> en esporas de la rizosfera de tabaco, electroforesis. Pozo 1 marcador molecular 1 Kb, pozo 2 control (+), pozo 3 control (-); Pozo 4 CONS+TMV4-A; Pozo 5 esporas e hifas que se encuentran en la parte media de la unidad experimental de los tratamientos CONS+TMV4-A y CONS+SV4-B; Pozo 6 CONS+SV4-B; Pozo 7 Ri+TMV5-A; Pozo 8 esporas e hifas que se encuentran en la parte media de la unidad experimental de los tratamientos Ri+TMV5-A y Ri+SV5-B; Pozo 9 Ri+SV5-B.....</p>	74

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los virus originan diversas enfermedades en las plantas causando daños físicos y económicos en los cultivos (Scholthof *et al.*, 2011). Una familia de virus importante es Virgaviridae que consiste de seis géneros: *Tobamovirus* (31 especies), *Furovirus* (5 especies), *Hordeivirus* (4 especies), *Pomovirus* (4 especies), *Tobravirus* (3 especies) y *Pecluvirus* (2 especies) (Kim *et al.*, 2012). El género *Tobamovirus* es uno de los más grandes de los virus de plantas, siendo *Tobacco mosaic virus* (TMV) la especie tipo (Lewandowski, 2000; Song *et al.*, 2006); además es el virus más importante por su estudio intensivo en relación a los demás virus de plantas (Hull, 2002; Scholthof *et al.*, 2011). El rango de hospedantes de los miembros del género *Tobamovirus*, comprende especies de las siguientes familias botánicas: Cucurbitaceae, Malvaceae, Solanaceae, Brassicaceae, Cactaceae, Passifloraceae y Orchidaceae (Zaitlin, 1998; De La Torre-Almaraz, 2007; Hull, 2002).

El TMV se transmite vía mecánica sin la ayuda de vectores. Los síntomas inducidos por el TMV varían de acuerdo con la planta hospedante, y pueden incluir manchas en forma de mosaico de color verde oscuro, moteados, necrosis, amarillamiento del follaje, decoloración en nervaduras, manchas circulares en hojas, reducción del desarrollo, muerte prematura, malformaciones, e hipertrofia (Scholthof, 2000; Zein *et al.*, 2012). Cuando el virus infecta a las plantas en época de bajas temperaturas, pueden aparecer plantas de pequeño tamaño con las hojas deformes. En plantas de pimiento puede causar también rizado en las hojas jóvenes, y en tomate causa un estriado pardo de tallos y ramas, seguido por necrosis foliar y abscisión de hojas (Vela, 1972; Hull, 2002). Los síntomas causados por el virus, son muy dependientes de la edad

de la planta hospedante, las condiciones ambientales, la variante del virus, y la genética de la planta (Scholthof, 2000).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos ubicuos que forman una simbiosis típicamente mutualista al colonizar aproximadamente el 80% de las plantas terrestres (Smith y Read 1997; Douds y Millner 1999; Varela y Trejo, 2001). Los HMA a través de su micelio extraradical, ayudan a las raíces de las plantas a incrementar el volumen de exploración del suelo para una mejor utilización de nutrientes de poca movilidad como el P, Cu, Zn, Mg y Fe, además de estimular el crecimiento de la planta (Vasanthakrishna y Bagyaraj, 1993; Stürmer y Bellei, 1994; Smith y Read, 1997; Young, 1998; Redecker *et al.*, 2000; Treseder y Allen, 2000; Bever *et al.*, 2001; Qiang-Sheng *et al.*, 2007). Los arbusculos son estructuras de los HMA que se encuentran relacionados íntimamente con la raíz ya que se desarrollan siempre dentro de las células, y que funcionan como sitios de intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta (Bonfante y Anca, 2009; Sidney, 2012); así, el hongo recibe carbono por parte del hospedero (Smith y Read, 1997; Treseder y Allen, 2000; Schübler *et al.*, 2001). Los HMA también intervienen en el aumento de la tolerancia de las plantas al estrés hídrico, al ataque de patógenos, y a la presencia de sustancias tóxicas (Trotta *et al.*, 1996; Smith y Read, 1997; Lingua *et al.*, 2002; Lovera y Cuenca, 2007; Akhtar y Siddiqui 2008).

En el caso de los virus y de patógenos biotróficos como *Blumeria*, *Oidium* y *Uromyces*, existen estudios donde se demuestra cierta susceptibilidad de las plantas colonizadas por HMA hacia estos organismos (Gernns *et al.*, 2001; Shaul *et al.*, 1999; Whipps, 2004). De manera particular, las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) colonizadas por *Rhizophagus intraradices* (previamente descrita como *Glomus intraradices*; Schübler y Walker, 2010) e infectadas con el TMV, presentaron alta incidencia y severidad de lesiones necróticas

provocadas por el virus (Akhtar y Siddiqui 2008; Shaul *et al.*, 1999) siendo incapaz de minimizar los daños provocados por estos fitopatógenos (St-Arnaud y Vujanovic, 2007). También se han reportado abundantes cantidades de partículas virales de TMV en células corticales de la raíz, en las que se encuentran los arbúsculos del HMA (Schönbeck y Spengler, 1979). Además, se han observado inclusiones virales no identificadas, en los tubos germinativos de algunas esporas de HMA (Kuga *et al.*, 2008).

La mayoría de los estudios realizados en relación a los HMA, están principalmente dirigidos hacia los beneficios que proporcionan a la planta, mientras que las investigaciones enfocadas a la evaluación de los posibles efectos que pueden tener estos hongos cuando la planta se encuentra infectada por virus, son escasas.

Con base en lo anterior, este trabajo se enfocó a estudiar la posible transferencia de *Tobacco mosaic virus* (TMV) a través de las estructuras de los HMA hacia una planta sana y evaluar el efecto de la infección del TMV en el crecimiento de las plantas inoculadas por HMA.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar a los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) como probable hospedante y/o transmisor de *Tobacco mosaic virus* (TMV) en *Solanum lycopersicum* L. y *Nicotiana tabacum*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el crecimiento, desarrollo y algunas respuestas fisiológicas de jitomate y tabaco inoculadas con HMA e infectadas por el TMV.
- Determinar la presencia de *Tobacco mosaic virus* en esporas de un consorcio de HMA, y de *Rhizophagus intraradices*.
- Evaluar el posible paso del TMV de plantas infectadas hacia plantas sanas vía hifas extraradicales de los HMA como posible puente de transmisión.

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

- Los HMA no hospedan ni transmiten virus o proteínas virales del TMV a plantas de *Nicotiana tabacum* y *Solanum lycopersicum* L.

HIPÓTESIS PARTICULARES

- El crecimiento, desarrollo y algunas respuestas fisiológicas de plantas infectadas de jitomate y tabaco con TMV no son favorecidas por la inoculación de los HMA.
- Las proteínas virales no se presentan dentro de las hifas o esporas de los hongos micorrízicos arbusculares que integran un consorcio micorrízico, o por esporas de *Rhizophagus intraradices*.
- El TMV no se transmite de plantas infectadas a plantas sanas a través de las hifas del consorcio de HMA y de *Rhizophagus intraradices*.

CAPÍTULO III
REVISIÓN DE LITERATURA
HONGOS DE VIDA LIBRE Y HONGOS SIMBIÓTICOS, Y SU RELACIÓN CON
VIRUS FITOPATÓGENOS

Tobacco mosaic virus

El *Tobacco mosaic virus* (TMV) es el más importante de los virus fitopatógenos (Scholthof, 2000; Scholthof *et al.*, 2011). En el año de 1879, el Director de la Estación Agrícola de Wageningen de los Países Bajos, Adolf Mayer, fue llamado para estudiar una peculiar enfermedad del tabaco (Agrios, 1996; Zaitli, 1998). En 1886, Mayer reprodujo la enfermedad del “mosaico del tabaco”, al inyectar el jugo de las plantas afectadas en plantas sanas, observando que la inyección del jugo producía la enfermedad. Sin embargo, hasta 1898 Martinus Beijerinck fue el primero en definir al agente causal del mosaico del tabaco como una entidad pequeña infecciosa (Agrios, 1996; Scholthof *et al.*, 2011), y sus hallazgos fueron confirmados y recapitulados por otros científicos en el siglo XX. Posteriormente, se realizaron experimentos para demostrar que la enfermedad del mosaico del tabaco no era un efecto fisiológico o de una enzima, sino que era una infección causada por un virus (Agrios, 1996; Allard, 1916; Hull, 2002).

El TMV es un ejemplo clásico de un virus en forma de varilla, que se presenta como una matriz regular helicoidal de subunidades de proteínas idénticas que recubre una molécula simple de ARN (Gera *et al.*, 1995). La envoltura de la proteína se compone de unas 2130 copias de una pequeña proteína que encaja como los ladrillos de una chimenea cilíndrica. La hebra de ARN codifica cuatro proteínas que replican el ARN viral, una proteína que transporta el ARN de

célula a célula, la difusión de la infección y la proteína de la cápside (Namba *et al.*, 1989; Bhyravhatla *et al.*, 1998; Sachse *et al.*, 2007; Scholthof *et al.*, 2011; Hull, 2002).

Jitomate (*Solanum lycopersicum* L.)

El jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) pertenece a la familia de las solanáceas. Los miembros de esta familia presentan haces bicolaterales, sus flores son radiales y con cinco estambres. El ovario, súpero, bicarpelar, contiene numerosos primordios seminales, produciendo bayas polispermas. Los carpelos se presentan en posición oblicua con respecto al plano mediano de la flor (Esquinas-Alcazar y Nuez, 2001). El centro de origen del género *Solanum* es la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, y en donde se encuentra la mayor variación de especies (Esquinas-Alcazar y Nuez, 2001).

El jitomate es una planta perenne muy sensible a las heladas, lo que determina su ciclo anual con distinta duración según la variedad, presenta una raíz principal pivotante y ramificada (Rodríguez *et al.*, 2001). El tallo es erguido durante los primeros estadios de desarrollo, pero pronto se tuerce a consecuencia del peso, y puede llegar a crecer hasta 2.5 m de longitud. El tallo es epigeo presentando ramificaciones dicotómicas, es cilíndrico cuando joven y de consistencia herbácea a algo leñosa, con pubescencias y su ciclo es anual (Rodríguez *et al.*, 2001; Garza, 1985; Esquinas-Alcazar y Nuez, 2001).

Las hojas son cortas, de tamaño medio o largas y están compuestas por siete, nueve y hasta once foliolos (Esquinas-Alcazar y Nuez, 2001). El haz es de color verde y el envés de color grisáceo, las flores se presentan formando inflorescencias que pueden ser de cuatro tipos (racimo simple, cima unípara, cima bípara, y cima multípara), y llega a tener hasta 50 flores por racimo (Rodríguez *et al.*, 2001). La flor esta formada por un pedúnculo corto, con cáliz gamosépalo, es decir, con sépalos soldados entre sí, y corola gamopétala. El fruto es una baya de color amarillo,

rosado o rojo debido a la presencia de licopina y carotina; el más común es el rojo (Valadez, 1998).

Tabaco (*Nicotiana tabacum* L.)

El tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) es uno de los principales productos agrícolas no alimenticios que se cultiva en todo el mundo, que se fuma o se mastica como un fármaco por sus efectos estimulantes. Es una planta herbácea robusta de la familia Solanaceae, cuyo origen se sitúa en la zona andina entre Perú y Ecuador. La hoja de tabaco se procesa para fabricar cigarrillos, puros, y tabaco para pipa o para mascar (Micheli y Izaguirre-Ávila, 2005; Congressional Research Service, 2003).

La planta madura mide de 1 a 3 m de altura y produce entre 10 y 20 hojas grandes. *Nicotiana tabacum* es una hierba anual, bienal o perenne, pubescente-glandulosa y robusta. La raíz es larga y fibrosa. El tallo es erecto de sección circular, piloso y viscoso al tacto, se ramifica cerca de su extremo superior produciendo hojas densas y grandes (30-40 cm de largo por 10 a 20 cm de ancho), alternas, sésiles, lanceoladas, apuntadas, de color verde pálido; al tacto comparten la viscosidad del tallo, son frágiles, y despiden un olor ligeramente acre y narcótico, debido a un alcaloide volátil de sabor agresivo y de olor intenso (nicotina). Las flores son actinomorfas, hermafroditas, bracteadas y pediceladas son verde-amarillentas o rosadas según la variedad, con un pequeño cáliz de 1 a 2 cm y una corola pubescente, de cinco lóbulos hasta de 5 cm. La planta es hermafrodita, produciendo flores de ambos sexos, con ovario glabro. La polinización es entomófila, siendo himenópteros y lepidópteros los principales polinizadores. En el mes de octubre las plantas dan un fruto cápsular ovoide y coriáceo de 1.5 a 2.5 cm de largo, con semillas infra-centimétricas pardas con apículo (Cao, 1994; Van Hoof, 2011).

Efecto de la infección del virus en el desarrollo de las plantas

El TMV tiene un amplio rango de plantas hospedantes, incluyendo al jitomate y al tabaco. Los síntomas en plantas de jitomate se presentan en las hojas cuyas áreas de color verde oscuro tienden a ser más gruesas que las regiones más claras de la hoja. Las plantas enfermas presentan un moteado en las hojas, se detiene el crecimiento de las plantas jóvenes, las hojas se distorsionan formando hojas en forma de “helecho”. Las hojas más viejas se enroscan hacia abajo y también se distorsionan. Ciertas variantes del virus pueden causar un moteado, rayas y necrosis en los frutos, y no es común la muerte de las plantas debido a la infección del TMV; sin embargo, producen fruta de mala calidad y bajos rendimientos (Kennelly, 2007).

En cuanto a las plantas de tabaco, en general, se observan síntomas progresivos en forma de decoloración de las hojas jóvenes, que aparecen a los 5 ó 6 días después de la infección. Posteriormente, se observa un moteado formando un mosaico de áreas verdes de diferente intensidad y una disminución en el crecimiento con hojas pequeñas y deformadas. En plantas maduras se ha observado que al infectarse con el virus, los síntomas solo se desarrollan en las hojas apicales. Algunas variedades de tabaco son hipersensibles y los tejidos se necrosan muy rápidamente en el punto de infección, apareciendo como pequeñas manchas secas de 1 a 2 mm de diámetro. Esta reacción de la planta impide la difusión del virus a otras partes de la misma (Martínez *et al.*, 2006).

Hongos micorrízicos arbusculares

La rizosfera del suelo se define como el volumen del suelo adyacente que está influenciado por las raíces de la planta, y representa una región de intensa actividad microbiana (Westover *et al.*, 1997). En la rizosfera se encuentran organismos patógenos y benéficos; como

hongos, bacterias, nematodos, protozoos, algas y microartrópodos, los cuales influyen en la salud y el crecimiento de la planta (Johansson *et al.*, 2004). Un ejemplo son los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) habitan en el suelo y viven simbióticamente con la mayoría de las plantas superiores favoreciendo su crecimiento (Douds y Millner, 1999; Varela y Trejo, 2001; Giovannetti y Sbrana, 1998; Vierheilig, 2004). Estos hongos se caracterizan por presentar un crecimiento intra e intercelular en la raíz y por formar dos tipos de estructuras, arbusculos y vesículas (Quilambo, 2003). Los arbusculos son hifas que se dividen dicotómicamente, invaginando la membrana plasmática de las células corticales, y que presentan periodos de vida cortos; mientras que las vesículas son estructuras de almacenamiento de reservas y que se forman en la parte terminal de las hifas (Barker *et al.*, 1998). Los géneros *Gigaspora* y *Scutellospora* no producen vesículas, en lugar de ellas forman células auxiliares en el micelio externo (Walker, 1992; Douds y Millner, 1999; Peterson *et al.*, 2004). Otra estructura corresponde a las hifas externas que ayudan a explorar el perfil del suelo para una mejor absorción de nutrimentos (Alarcón y Ferrera-Cerrato, 1999). Las hifas se desarrollan dentro y fuera de la raíz colonizando a otras raíces de la misma o de diferente planta (Bever *et al.*, 2001). Las hifas externas se producen a partir de propágulos fúngicos presentes en el suelo como las esporas, o a partir de fragmentos de raíz micorrizada (Varela y Trejo, 2001). Las esporas son los principales propágulos de resistencia y propagación de los HMA que al germinar produce una hifa que se desarrolla hasta colonizar las células corticales de la raíz de las plantas hospedantes (Varela y Trejo, 2001); además, las esporas son utilizadas para estudios taxonómicos de los HMA (Gerdemann y Trappe, 1974; Morton, 1988; Redecker *et al.*, 2000).

Interacción entre las plantas de jitomate y tabaco colonizadas por los hongos micorrízicos arbusculares

Los HMA han demostrado ser promotores de crecimiento de la planta, principalmente porque mejoran la adquisición de nutrimentos principalmente el P (Harley y Smith, 1983); por consecuencia, mejoran las condiciones del suelo y de la rizosfera (Linderman, 1994). Las plantas colonizadas por los HMA alteran la morfología del sistema radical haciéndola más ramificada, aumentando el diámetro de las raíces adventicias (Smith y Read, 1997; Tahat *et al.*, 2008), alterando también las propiedades bioquímicas, como el aumento de la actividad peroxidasa (Smith y Read, 1997; That *et al.*, 2010). Otra característica de las plantas micorrizadas es que son más tolerantes a patógenos que se transmiten por el suelo, disminuyendo su ataque (Schönbeck y Dehne, 1979; Dehne, 1982; Linderman, 1994); sin embargo, las enfermedades causadas vía foliar generalmente se incrementan (Schönbeck y Dehne, 1979; Dehne, 1982).

Por ejemplo, cuando se aplica fertilizante mineral junto con el HMA *Glomus hoi*-like, las plantas de tabaco presentaron mayor longitud y diámetro del tallo, así, como un aumento en el peso fresco y seco de las plántulas (Cruz *et al.*, 2012). Por otra parte, al inocular plantas de tabaco con *Rhizophagus intraradices* el ataque de los patógenos foliares como *Botrytis cinerea* y *Tobacco mosaic virus* es más agresivo, ya que las plantas presentan mayor tamaño de las lesiones provocadas por estos patógenos (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007). En plantas de jitomate, se ha observado que los HMA reducen los síntomas de la enfermedad causada por *Alternaria solani* (Lingua *et al.*, 2002; Fritz *et al.*, 2006), y aumenta la resistencia contra la infección de *Pseudomonas syringae* (Pozo y Azcón-Aguilar, 2007), así, como el incremento del peso fresco y seco, y el aumento en la altura de las plantas, y mayor absorción de P y N (Karagiannidis *et al.*, 2002).

Interacción de los virus fitopatógenos sistémicos con hongos de la rizosfera

Los patógenos con origen en el suelo, como los hongos, son más difíciles de controlar que los que afectan la parte aérea. Los hongos fitopatógenos con origen en el suelo más comunes son *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phoma terrestris*, *Sclerotium rolfsii*, *Polymyxa* spp., *Spongospora* spp. y *Olpidium* spp. Estos tres últimos además son vectores de virus fitopatógenos (Arif, 2000; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Mochizuki *et al.*, 2008). Los virus más comunes que se encuentran en el suelo pertenecen a los géneros *Ophiovirus*, *Varicosavirus*, *Bymovirus*, *Carmovirus*, *Dianthovirus*, *Necrovirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus*, *Pomovirus* y *Benyvirus* teniendo como vía de transmisión a los hongos *Polymyxa* spp., *Spongospora* spp. y *Olpidium* spp., afectando a diversos cultivos como trigo, cebada, papa, arroz y cacahuate, entre otros (Campbell, 1996; Rush, 2003; Rochon *et al.*, 2004; Merz *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2005; Sasaya y Koganezawa, 2006; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Rush, 2003; Karp, 1998; Hull, 2002).

Los virus que se transmiten por hongos habitantes del suelo pueden ser clasificados con base en su morfología y organización genómica, en tres tipos: 1) virus isométricos (*Carmovirus*, *Necrovirus* y algunos agentes sin caracterizar) que se transmiten por hongos del género *Olpidium* spp.; 2) virus en forma de varilla rígida, tales como los *Furovirus*; y 3) virus en forma de varilla flexible, como los *Bymovirus*. Los *Furovirus* y *Bymovirus* son transmitidos por especies de *Polymyxa* y *Spongospora* (Arif, 2000; Sasaya y Koganezawa, 2006).

Los hongos de los géneros *Polymyxa* y *Spongospora* pertenecen a la familia *Plasmodiophoraceae*. Tradicionalmente, algunos fitopatólogos han considerado a estos hongos en el Phylum *Plasmodiophoromycota* mientras que otros los incluyen en el reino Protista; sin embargo, con base en estudios moleculares, se ha sugerido que los plasmodióforos no están relacionados con los Ascomycetes, Basidiomycetes, Oomycetes o Myxomycetes, y se han

ubicado con los Protozoa (Rush, 2003). Los hongos *Polymyxa graminis*, *P. betae*, y *S. subterranea* (plasmidióforos) no eran considerados económicamente importantes para los cultivos agrícolas, hasta que se descubrió que son capaces de transmitir virus como el *Rice necrosis mosaic virus* (RNMV) (Usugi *et al.*, 1989; Badge *et al.*, 1997); *Beet necrotic yellow vein benyvirus* (BNYVV) (Rush, 2003), y *Watercress yellow spot virus* (WYSV).

Los plasmidióforos son parásitos intracelulares obligados, tienen división nuclear cruciforme, zoosporas con dos flagelos anteriores de diferente tamaño, forman un plasmodio multinucleado y estructuras resistentes a condiciones adversas, denominadas esporas de reposo, las cuales tienen una larga vida formando quistes que a menudo se encuentran en racimos formando un esporosorio o quistisorios (Campbell, 1996; Rush, 2003). Al germinar cada una de las esporas de reposo o de supervivencia, producen una sola zoospora, que se dirige a los pelos radicales o células epidérmicas de la raíz, donde forma un apresorio que le permite penetrar la epidermis y así, diseminarse al interior de la célula vegetal. Después, el protoplasma de la zoospora aumenta de tamaño, y su núcleo se divide formando un plasmodio. Al madurar, el plasmodio se divide en fracciones, que se rodean inmediatamente de una membrana para constituirse en esporangios, que son los encargados de producir las zoosporas que posteriormente serán liberadas a través de un tubo o poro de salida, y con ello iniciar nuevas infecciones (Figura 3.1) (Campbell, 1996; Verchot- Lubicz *et al.*, 2007; Rush, 2003; Merz *et al.*, 2005). La producción de zoosporas y la longevidad de los esporocarpos son rasgos importantes en la epidemiología de las enfermedades causadas por estos organismos vectores de virus (Campbell, 1996; Rush, 2003). Por otra parte, el talo del hongo está embebido en el citoplasma del hospedante y las esporas biflageladas se encuentran separadas por una membrana en los primeros pasos del ciclo de infección (Campbell, 1996).

Una de las características importantes de los hongos vectores de virus es la especialización y especificidad hacia el hospedante. Por ejemplo, el ciclo de vida de *Polymyxa* spp. que infecta arroz, avena, sorgo, cacahuate, trigo y cebada (Kanyuka et al., 2004), tiene dos fases: de esporangio y esporogénica (Littlefield *et al.*, 1997). La infección del hongo empieza cuando las zoosporas penetran la pared de las células epidérmicas de la raíz, momento en que transfieren su citoplasma al interior de las mismas para formar un esporangio multinucleado que al madurar contiene numerosas zoosporas secundarias. Las zoosporas secundarias se liberan dentro de los espacios extracelulares, a través de los tubos de salida de los zoosporangios (D'Ambria y Mutto, 1976; Littlefield *et al.*, 1997) y penetran en nuevas células donde se desarrollan los plasmodios esporogénicos (Campbell, 1996; Littlefield *et al.*, 1998; Verchot *et al.*, 2001). Al aplicar un riego pesado, por ejemplo, las esporas en reposo germinan, liberan las zoosporas primarias e infectan nuevas raíces.

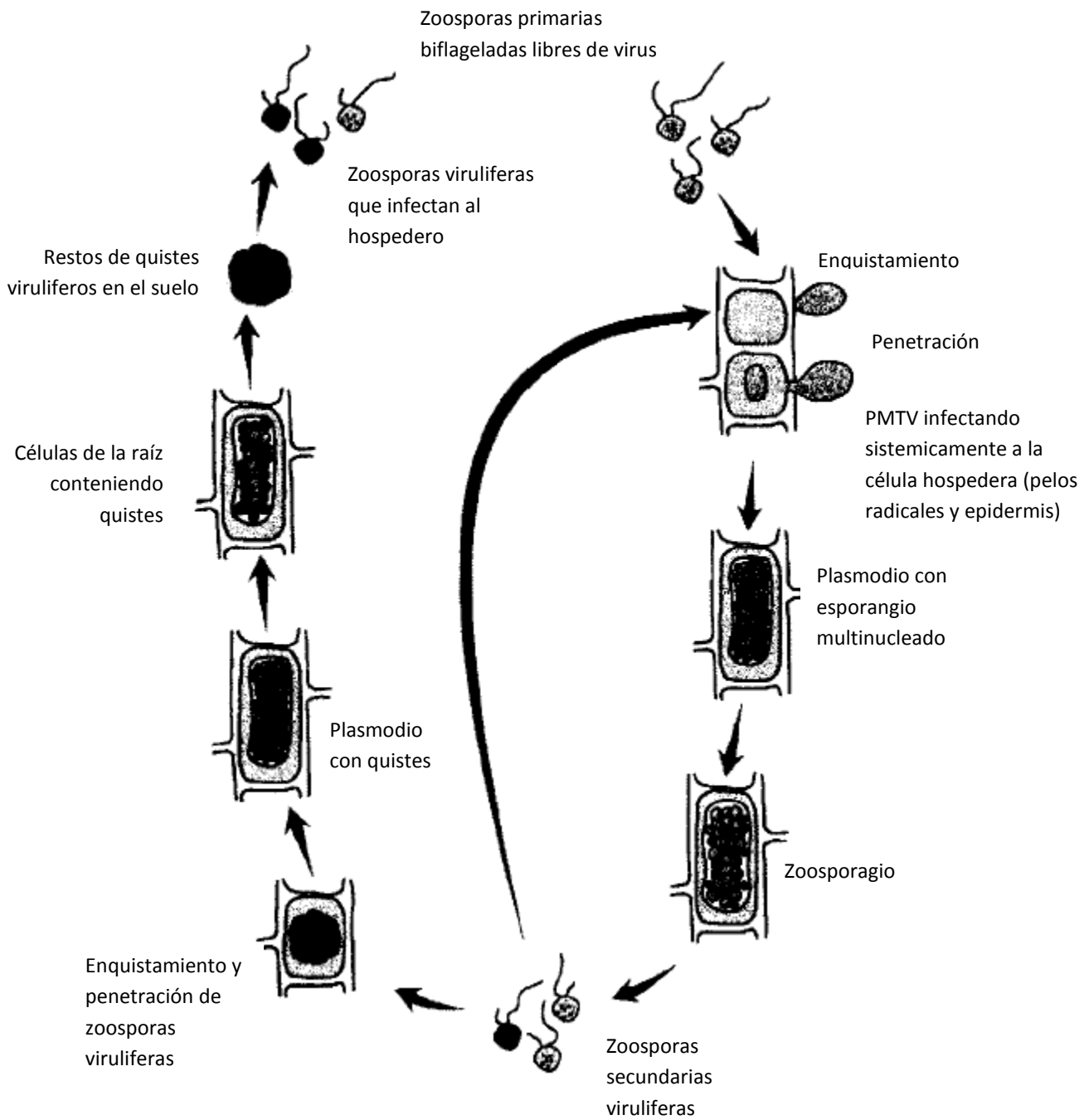


Figura 3.1. Esquematación del ciclo de vida del hongo *Spongospora subterranea* con diferentes eventos hipotéticos en la transmisión de *Potato mop-top pomovirus* (PMTV) (Arif, 2000).

Por otra parte, la clase Chytridiomycetes está actualmente constituida en cinco órdenes: Chytridiales, Rhizophydiales, Spizellomycetales, Rhizophlyctidales y Lobulomycetales (Barr, 1980; Letcher *et al.*, 2005; Letcher *et al.*, 2006; Letcher *et al.*, 2008; Simmons *et al.*, 2008). De éstos, los hongos pertenecientes al orden Chytridiales, que incluye a la familia *Olpidaceae*, transmiten virus fitopatógenos. Estos hongos tienen una estructura somática sencilla, cuyo talo joven carece de una membrana que se forma hasta la madurez. La mayoría de estos hongos finaliza su ciclo de vida en el hospedante (endobióticos); sin embargo, hay algunos que producen cuerpos fructíferos en la superficie del hospedante (epibióticos). Estos últimos desarrollan un sistema rizoidal que forma parte integral del talo, que sirve para fijarse al hospedante y absorber alimento. La reproducción asexual se realiza por medio de esporangios, cuyo contenido protoplásmico se transforma eventualmente en zoosporas. Para la liberación de estas zoosporas, los esporangios están provistos de un poro de salida (esporangios inoperculados) o poseen una tapa circular bien definida (esporangios operculados), según la especie fúngica (Campbell, 1996; Navarro *et al.*, 2005; Verchot- Lubicz *et al.*, 2007).

El ciclo de vida de los hongos de la familia *Olpidaceae*, empieza cuando los esporangios de reposo germinan durante la primavera y producen zoosporas que se transportan por medio del agua, nadando por algún tiempo, y después se enquistan sobre la superficie del hospedante. Posteriormente, se inicia la infección y solo pasa el protoplasma del quiste a través de un poro formado en la pared de la célula hospedante. Dentro de la célula vegetal, el protoplasma del hongo empieza a crecer rápidamente, hasta llenar la cavidad celular, se recubre de una membrana y se convierte en un esporangio multinucleado. Después, el protoplasma del esporangio se divide en tantas porciones como núcleos contenga, y se inicia la diferenciación de las zoosporas. Las

zoosporas al madurar, escapan a través de un tubo de salida y una vez fuera, pueden reiniciar el ciclo asexual, si encuentran agua en abundancia (Campbell, 1996).

La fase sexual tiene lugar cuando, por cambios en el medio debido a las estaciones del año o por escasez de agua, las zoosporas se comportan como gametos al fusionarse en pares y con ello producir cigotes móviles, los cuales al infectar al hospedante y desarrollarse en él, se transforman en esporangios de paredes gruesas, comúnmente llamados “esporangios de reposo”, que son las estructuras de dormancia del hongo. Los Chytridiales se identifican por el tamaño del flagelo posterior de las zoosporas y la morfología de la espora (Campbell, 1996).

Relación virus-hongos fitopatógenos con origen en el suelo

Durante la década de 1950 en Japón fue reportado el *Tobacco stunt virus* (TSV) como agente causal de una necrosis que inhibe el crecimiento del tabaco. Este virus fue el primero reportado por ser transmitido por *Ospidium brassicae*, el cual lleva al virus dentro de las esporas de reposo permitiéndole sobrevivir por 20 años o más. Otro virus que puede ser transmitido por un hongo es el *Tobacco necrosis virus* (TNV) asociado con el cultivo del tabaco y del frijol. El TNV (Familia *Tombusviridae*; género *Necrovirus*) puede ser transmitido por *O. brassicae* en el agua de riego tanto en campo como en invernadero (Tolin, 2008). La asociación entre *O. brassicae* y el TNV es una de las más estudiadas. Los viriones del TNV sobreviven libres en el suelo y después de la irrigación, las zoosporas de *O. brassicae* se liberan de las esporas de reposo o del zoosporangio. Las partículas del virus que se encuentran libres en el suelo entran en contacto con la superficie de las zoosporas, donde son fuertemente adsorbidas. Una vez dentro de la célula del hospedero, los virus se alojan en el citoplasma, donde se replican e inician la

enfermedad de manera independiente al hongo vector, y las esporas de reposo no virulíferas se liberan en el suelo para infectar raíces sanas (Campbell, 1996; Rush, 2003).

Diversos virus del género *Ophiovirus* son transmitidos por *O. brassicae*, tales como el *Tulip mild mottle mosaic virus* (TMMMV), *Mirafiori lettuce virus* (MiLV), *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV), *Tobacco stunt virus* (TStV) y *Lettuce ring necrosis virus* (LRNV) (Campbell 1996; Lot *et al.*, 2002; Rochon *et al.*, 2004; Vaira y Milne, 2008). De manera particular, se ha descrito con más precisión la relación virus-hongo para MiLV-*Olpidium brassicae*; en este caso, las zoosporas sanas adquieren al virus cuando entran a las raíces de las plantas infectadas. Las esporas llevan al virus en el protoplasma al ser liberadas del esporangio infectado, y pueden transmitirlo a las raíces sanas (Vaira y Milne, 2008).

Virus que se transmiten por hongos habitantes del suelo

Los virus que son transmitidos por hongos plasmodiíferos se caracterizan por tener un genoma de ARN de cadena sencilla de sentido positivo y pertenecen a los géneros *Bymovirus*, *Benyvirus*, *Furovirus*, *Pecluvirus*, y *Pomovirus*. Estos virus pueden estar en el interior del hongo y permanecer en el suelo por varios años (Campbell, 1996; Rush, 2003).

Dentro del género *Bymovirus* (familia *Potyviridae*) se encuentra el *Rice necrosis mosaic virus* (RNMV) (Usugi *et al.*, 1989). Este virus tiene forma de varilla flexible con una longitud de 275 a 550 nm y se transmite por el hongo *Polymyxa graminis*, aislado por primera vez en Japón en el cultivo del arroz, el cual es el único hospedante conocido hasta la fecha (Badge *et al.*, 1997).

Para el género *Benyvirus*, los virus *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) y *Beet soilborne mosaic virus* (BSBMV), se transmiten por el hongo *Polymyxa betae* en cuyos

zoosporangios permanecen las partículas virales (Henry, 1996; Rush, 2003; Sayama *et al.*, 2006; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). La replicación del virus y la síntesis de sus proteínas de movimiento del BNYVV ocurre dentro de los esporangios y en el estado esporogénico de *P. betae*, lo que sugiere que el virus se encuentra en diferentes fases del ciclo de vida del hongo, mismo que además de ser vector del virus, también es su hospedero (Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). El *Oat mosaic virus* (OMV) también pertenece al género *Benyvirus* y se transmite por *Polymyxa graminis*, y su infección disminuye el rendimiento del cultivo de avena (Clover *et al.*, 2002). La enfermedad por el OMV se observó por primera vez en 1944 en Carolina del Sur, Estados Unidos, y en Europa se reportó en Inglaterra en 1964, y posteriormente en Gales, Irlanda, Francia e Italia (Monger *et al.*, 2001).

Otros ejemplos de transmisión de virus por *Polymyxa graminis*, son aquellos pertenecientes al género *Furovirus*, entre ellos el *Soilborne wheat mosaic virus* (SBWMV). En este caso, el ARN viral es llevado en los zoosporangios al interior de las células de las raíces (Driskel *et al.*, 2002). Otro virus del mismo género es el *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV) (Bass *et al.*, 2006). Estos dos virus causan enfermedades importantes en trigo. Otro virus que se transmite por *P. betae* es el *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) (Adams, 2002; Driskel *et al.*, 2002) y el *Rice necrosis mosaic virus* (RNMV) (Badge *et al.*, 1997).

Oplidium brassicae es vector de diversos virus del género *Varicosavirus* como el *Lettuce big-vein virus* (LBVV); este virus se encuentra dentro de las esporas de reposo del hongo y por esta razón se hace casi imposible erradicarlo porque una vez que ya se estableció en el suelo, sobrevive durante más de 20 años en ausencia de organismos hospederos. Otros virus transmitidos por este hongo son los *Mirafiori lettuce big-vein virus* (MLBVV), *Lettuce big-vein associated virus* (LBVaV) y *Lettuce big-vein virus* (Lot *et al.*, 2002).

Los virus asociados a los hongos representan serios problemas en el control de la enfermedad de la “várice” de la lechuga, porque pueden sobrevivir de cultivo en cultivo, dentro de las esporas de reposo y permanecer por décadas (Navarro *et al.*, 2005). Sin embargo, la densidad de esporas de reposo virulíferas puede incrementarse por la continua producción del mismo cultivo en el área afectada. El hongo *Spongospora subterranea* transmite el virus *Potato mop-top virus* (PMTV) perteneciente al género *Pomovirus*, y el *Watercress yellow spot virus* (WYSV) que causa la enfermedad conocida como raíz curvada (Reavy *et al.*, 1998).

El hongo *Olpidium bornovanus* transmite virus pertenecientes al género *Carmovirus*, como el *Melon necrotic spot virus* (MNSV) que causa serias pérdidas económicas. Los síntomas que presenta la planta al ser infectada por este virus son necrosis en los hipocótilos y pequeñas manchas cloróticas. Cuando el hongo penetra a las raíces de las plantas empieza la infección del virus (Mallor *et al.*, 2006).

Justificación y relevancia de la investigación

La mayoría de los trabajos realizados sobre HMA están enfocados hacia los beneficios que estos hongos aportan a las plantas, pero no se ha llevado a cabo trabajos sobre los posibles efectos que puedan tener cuando la planta se encuentra infectada por virus.

Hasta el momento no se ha demostrado que los HMA puedan ser transmisores de virus; sin embargo, con los antecedentes que se tienen con hongos fitopatógenos del suelo como vectores de virus (Jacobi *et al.*, 1995; Peerenboom *et al.*, 1996; Ratti *et al.*, 2004; Mallora *et al.*, 2006; Hiruki, 1967), y la cantidad de partículas virales que se encuentran en células que contienen arbuscúlos del HMA (Schönbeck y Spengler, 1979), este trabajo profundizará en la

posible transferencia de virus o proteínas virales a través de las estructuras del HMA, hacia plantas sanas.

Los beneficios que los HMA aportan a las plantas son muchos incluyendo la resistencia a patógenos; sin embargo, hay que profundizar sobre que pasa cuando las plantas inoculadas con HMA se encuentran infectadas con TMV. Por ejemplo, es importante demostrar si los HMA son capaces de alojar o transmitir virus, e incluirlos como vectores de enfermedades virales, comparando con los estudios relacionados al beneficio que le proporciona a la planta cuando son atacadas por patógenos.

CAPÍTULO IV

RESPUESTAS DE PLANTAS DE JITOMATE (*Solanum lycopersicum* L.) A LA INOCULACIÓN DE *Rhizophagus intraradices* Y A LA INFECCIÓN DEL *Tobacco mosaic virus*

Resumen

Este capítulo describe el efecto de *Rhizophagus intraradices* y del *Tobacco mosaic virus* (TMV) en el crecimiento, el contenido de clorofila, la fosfatasa ácida de la raíz, el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante total de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) en condiciones de invernadero. Se estableció un experimento factorial 2x2 teniendo presencia y ausencia de *R. intraradices*, y con presencia y ausencia del TMV, incluyendo cuatro tratamientos con cinco repeticiones cada uno. Después de cinco semanas del trasplante, las plantas se inocularon mecánicamente con el virus. Después de 40 días de la infección viral, la relación raíz-parte aérea, peso seco del tallo, peso seco de raíz, contenido de clorofila, contenido de fenoles totales y la actividad de antioxidantes no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. Sin embargo, el peso seco total de plantas inoculadas con *R. intraradices* fue 10% mayor que el de las plantas infectadas con el TMV. Las plantas con *R. intraradices* presentaron menor área foliar específica en relación con la combinación *R. intraradices* y TMV. La actividad fosfatasa ácida de la raíz en plantas con *R. intraradices* fue menor en relación a plantas testigo y a plantas con TMV. Los síntomas de la infección por el TMV se presentó de igual manera independientemente de la inoculación de *R. intraradices*. La colonización micorrízica no benefició el crecimiento de las plantas infectadas con el TMV.

Palabras claves: Tobamovirus, fisiología, interacción planta-patógeno, micorriza

CHAPTER IV

RESPONSES OF TOMATO PLANTS (*Solanum lycopersicum*) TO THE INCOULATION OF *Rhizophagus intraradices* AND WITH THE INFECTION OF *Tobacco mosaic virus*

Abstract

This chapter describes the effect of *Rhizophagus intraradices* (AMF) and the *Tobacco mosaic virus* (TMV) on the growth, the total chlorophyll content, acid root phosphatase, total content of phenolic compounds, and the total antioxidant activity of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) under greenhouse conditions. A 2x2 factorial experiment was set considering the presence or absence of either *R. intraradices* or the TMV, including four treatments with five replicates each. After five weeks of transplanting, plants were mechanically infected with the TMV. After 40 days of viral infection, the root to shoot ratio, the plant dry weight (root, shoot, and total), the total chlorophyll content, acid root phosphatase, total content of phenolic compounds, and the total antioxidant activity did not show significant differences among treatments. Nevertheless, the total dry weight of AMF-plants was 10% greater than TMV-plants. AMF-plants had lower specific leaf area when compared to the plants with AMF and TMV. The acid root phosphatase of AMF-plants was lower than control and TMV-plants. Regardless of AMF inoculation, the TMV symptoms were observed in all plants infected with the virus. Mycorrhizal colonization did not influence the growth of plants infected with the TMV.

Key words: Tobamovirus, plant physiology, plant-pathogen interaction, mycorrhizal.

Introducción

Los virus fitopatógenos son parásitos obligados que requieren de una célula viva de la planta para replicarse (Karp, 1998; Hull, 2002; Šindelářová *et al.*, 2005). La partícula de un virus completo se conoce como virion y consiste en un ácido nucleíco rodeado por una capa proteica llamada cápside (García-Arenal y García, 1994; Wolf y Millatiner, 2000). Los virus se transmiten en su mayoría por medios mecánicos o por insectos u hongos (Campbell, 1996; Merz *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2005; Sasaya y Koganezawa, 2006), y no se pueden controlar con algún agroquímico, por lo que la eliminación de plantas enfermas y el control de insectos y de hongos vectores son algunas de las prácticas más comunes para su manejo (Moriones y Luis 1994; Zein *et al.*, 2012).

El *Tobacco mosaic virus* (TMV) es la especie tipo del género *Tobamovirus* cuya partícula contiene 5% de ácido nucleíco y 95% de proteína, y su genoma consta de ARN lineal (con un tamaño de 6,395 kb) con partículas tubulares rígidas que miden 300 nm de largo y 18 nm de ancho. Estos patógenos se encuentran en todos los organelos de las células vegetales (Gargouri *et al.*, 1989; Dawson *et al.*, 1988). La infección del virus en la planta se caracteriza por formar inclusiones virales cristalinas intracelulares; estas inclusiones se forman a partir de una proteína del virus con abundantes partículas virales, y se encuentran en altas concentraciones en las células corticales (Bos, 1983; Jabaji-Hare y Stobbs, 1984).

Los síntomas del TMV son persistentes y consisten en mosaicos de color verde a blanco, acompañado de una apariencia filiforme en las hojas, y afecta a miembros de la familia *Solanaceae* causando pérdidas considerables en los cultivos. Este virus es sistémico y a partir de la hoja infectada emigra rápidamente hacia el ápice, y la base foliar, hasta las raíces. No obstante, la infección del virus es generalmente mecánica por contacto durante las prácticas culturales, y a

través de semillas, agua, restos vegetales, suelo y semilleros, pero no es transmitida por insectos vectores (Hull, 2002; Agrios, 2004; Lucas y Hare, 1959).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos ubicuos que forman una simbiosis mutualista, y colonizan aproximadamente el 80% de las plantas terrestres (Smith y Read, 1997). Esta simbiosis facilita la absorción de agua y nutrientes de poca movilidad como P (Qiang-Sheng *et al.*, 2007; Redecker *et al.*, 2000; Bever *et al.*, 2001), Cu, Zn, Mg y Fe (Vasanthakrishna y Bagyaraj, 1993; Young, 1998), y estimula el crecimiento de la planta (Stürmer y Bellei, 1994). Por otro lado, el hongo recibe carbono por parte del hospedero (Smith y Read, 1997; Treseder y Allen, 2000; Schöblier *et al.*, 2001). Los HMA también intervienen en el aumento de la tolerancia de las plantas al estrés hídrico, a la presencia de sustancias tóxicas (Akhtar y Siddiqui, 2008), y al ataque de patógenos (Trotta *et al.*, 1996; Smith y Read, 1997; Lingua *et al.*, 2002; Lovera y Cuenca, 2007; Akhtar y Siddiqui, 2008).

Las plantas colonizadas por HMA se vuelven tolerantes o resistentes a varios patógenos del suelo (Trotta *et al.*, 1996; Smith y Read, 1997; Lingua *et al.*, 2002; Lovera y Cuenca, 2007; Akhtar y Siddiqui, 2008). Se sabe que los HMA reducen la incidencia y la severidad de las enfermedades causadas por hongos de los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Verticillium* y *Aphanomyces* (St-Arnaud y Vujanovic, 2007; Whipps, 2004). Además, Lingua *et al.* (2002) y Fritz *et al.* (2006) demostraron que las plantas de jitomate colonizadas por el HMA presentan menor severidad de síntomas causados por fitoplasmas y mayor protección contra *Alternaria solani*. Por otra parte, los HMA inducen mayor resistencia en las plantas hacia las bacterias *Pseudomonas syringae* (Pozo y Azcon-Aguilar, 2007) y *Xanthomonas campestris* (Liu *et al.*, 2007).

En el caso de los virus y de patógenos fúngicos biotróficos como *Blumeria*, *Oidium* y *Uromyces*, existen estudios donde se demuestra cierta susceptibilidad de las plantas colonizadas por HMA ante estos organismos (Gernns *et al.*, 2001; Shaul *et al.*, 1999; Whipps, 2004). De manera particular, las plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) colonizadas por *Rhizophagus intraradices* e infectadas con TMV, presentaron alta incidencia y severidad de lesiones necróticas provocadas por el virus (Akhtar y Siddiqui, 2008; Shaul *et al.*, 1999). La mayoría de los estudios realizados en relación a los HMA, están principalmente dirigidos a la evaluación de sus beneficios que aportan a la planta; sin embargo, hay pocos trabajos enfocados hacia los efectos negativos de los HMA en plantas infectadas por virus.

Por lo anterior, este trabajo evaluó el efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* en el crecimiento de plantas de jitomate colonizadas por *Rhizophagus intraradices*.

Materiales y métodos

Material vegetal, hongo micorrízico arbuscular y fuente de inóculo del virus.

Se utilizaron plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) var. Marmande (Hortaflo, Rancho Los Molinos) con 100% de pureza y un 95% de viabilidad. Las semillas se colocaron en almácigos de unicel con sustrato estéril para su germinación. Se consideró un almácigo de plantas testigo y otro almácigo inoculado con *Rhizophagus intraradices*. El inóculo de *R. intraradices* consistió de 15 g de suelo y raíces del cultivo trampa, con 87% de colonización y 800 esporas en 100 g de suelo seco. Después de 20 días de la germinación, las plántulas se trasplantaron a vasos de unicel de un litro de capacidad, conteniendo arena de río esterilizada en autoclave a 120°C por 3 h, con intervalo de un día.

Después de cinco semanas del trasplante, se llevó a cabo la infección del virus en las plantas correspondientes. Una hoja de planta de jitomate previamente infectada con el TMV, se colocó en una bolsa de plástico que contenía buffer de fosfatos 0.1 M [fosfato de potasio monobásico (3.4 g L⁻¹), fosfato de potasio dibásico (4.34 g L⁻¹), fosfato de sodio dibásico (4.34 g L⁻¹) y dietilditiocarbamato de sodio (DIECA) (4.34 g L⁻¹), pH 7.2] aplicado en una relación 1:10 (tejido:buffer). El tejido foliar infectado con el TMV dentro de la bolsa de plástico fue macerado, y posteriormente se mantuvo a 4° C para su inoculación en las plantas de jitomate del experimento (Apéndice I-1.2).

En las hojas de las plantas de jitomate a inocular se espolvoreó carburo de silicio (Bos, 1983) como abrasivo para realizar pequeñas heridas al tejido foliar y con ello facilitar la entrada de las partículas virales a la célula vegetal. La inoculación del virus se realizó con un hisopo que se sumergió en la suspensión viral obtenida de las hojas previamente maceradas, el cual se frotó sobre la superficie de las hojas a infectar. Las hojas de las plantas testigo fueron frotadas únicamente con buffer de fosfatos. La fertilización de las plantas se realizó con la solución nutritiva Long Asthon, con aplicación de 11 µg de P mL⁻¹ (Hewitt, 1966) dos veces por semana (Apéndice I-1.1).

El experimento se estableció en invernadero con una temperatura promedio diurna de 26° C y nocturna de 18° C, con un fotoperíodo de 16 h y humedad relativa de 34%. Se utilizó un termohigógrafo digital para el registro de las condiciones ambientales.

Los tratamientos consistieron en plantas colonizadas por *R. intraradices* e infectadas por el TMV (Ri + TMV), plantas con *R. intraradices* y sin TMV (Ri), plantas sin *R. intraradices* y con el TMV (TMV) y plantas testigo sin TMV y *R. intraradices* (Testigo).

Severidad de síntomas causados por el TMV.

La severidad de la infección del virus se determinó después de 15, 30 y 40 días después de la infección por el TMV, observando los síntomas en las hojas de las plantas inoculadas. Para este propósito se realizó una escala arbitraria con cuatro categorías para determinar el porcentaje de tejido con síntomas: clase I, 0% de la superficie foliar con manchas cloróticas; clase II, 25% de la superficie foliar con manchas cloróticas; clase III, 50% de la superficie foliar con manchas cloróticas, y clase IV, 100% de la superficie foliar con manchas cloróticas.

Evaluación del crecimiento de la planta.

Después de 40 días del trasplante se determinó el área foliar (cm^2) con un medidor de área foliar (LI-COR, model 3100), peso seco de hojas, tallos y raíces por separado, y el peso seco total. Los órganos vegetales se colocaron por separado en una estufa a 70°C durante 48 h, para posteriormente pesarlos en balanza analítica (Ohaus ® ScoutTMPro). Además, se estimó el área foliar específica (área foliar/peso seco de la hoja, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$), y la relación raíz-parte aérea (peso seco de la raíz/peso seco de la parte aérea, g g^{-1}).

Contenido de clorofila total.

El contenido de clorofila se determinó mediante la extracción de los pigmentos con acetona al 80%, y siguiendo el procedimiento descrito por Harborne (1998). Se tomaron muestras de 0.1 g de tejido foliar de cinco plantas a los 40 días después de la infección.

Los extractos fueron centrifugados (12,000 rpm, 1min), y se tomaron lecturas de absorbancia a 645 y 663 nm de longitud de onda con un espectrofotómetro (Hewlett Packard^R modelo 8453), para posteriormente determinar el contenido de clorofila total (mg g^{-1}).

Determinación de la fosfatasa ácida en raíz.

La actividad de la fosfatasa ácida en raíz se determinó con la técnica descrita por Tabatabai (1982) modificada como se describe a continuación: se maceró 0.1 g de raíz en 1 mL de buffer universal modificado pH 5.5 (100 mM THAM, 100 mM ácido maleico, 5 mM ácido cítrico, y 100 mM ácido bórico). Se tomaron 400 μ L del extracto obtenido y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales se centrifugaron a 13,000 rpm por 15 min. Se tomaron 150 μ L del supernadante y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL al cual se agregaron 200 μ L de *p*-nitrofenil fosfato (*p*-NPP) 3 mM. Los tubos se incubaron a 37°C durante 45 min, y se adicionaron 100 μ L de 0.5 M CaCl₂ y 400 μ L de 0.5 M NaOH agitando vigorosamente. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. Finalmente se obtuvieron las lecturas de absorbancia a 420 nm utilizando un espectrofotómetro (Biotek® modelo Synergy 2). Los resultados fueron expresados como micromoles de *p*-nitrofenil liberados por gramo por hora (μ moles *p*-NP g⁻¹ h⁻¹).

Contenido total de compuestos fenólicos y determinación de la actividad antioxidante total.

El contenido total de compuestos fenólicos fue determinado usando el reactivo Folin-Ciocalteu, y utilizando una curva estándar de ácido gálico (Singleton y Rossi, 1965; Soong y Barlow, 2004; Cartmill *et al.*, 2007). Los extractos fueron obtenidos macerando 0.15 g de tejido fresco en un mortero con 3 mL de metanol al 80% y centrifugando por 15 min a 15,000 rpm. La mezcla de reacción consistió de 30 μ L del extracto más 90 μ L de Na₂CO₃ y 150 μ L del reactivo Folin-Ciocalteu en una microplaca de 96 pozos. Después de 30 minutos, la absorbancia fue medida a 725 nm con un espectrofotómetro (Biotek® modelo Synergy 2). Los resultados fueron

expresados como microgramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de tejido fresco (μg ácido gálico g^{-1}) (Re *et al.*, 1999; Cartmill *et al.*, 2007).

La actividad antioxidante total (AT) se determinó por neutralización del radical libre de 1,1-diphenyl-2-picryldrazyl (DPPH), utilizando Trolox como compuesto antioxidante (Mathäus, 2002). La mezcla de reacción consistió en 15 μL del extracto más 270 μL de solución DPPH en microplacas de 96 pozos. A los 15 minutos de incubación de las microplacas se tomaron lecturas de absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro (Biotek® modelo Synergy 2). Los resultados fueron expresados como micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de tejido fresco (μmol Trolox g^{-1}).

Colonización micorrízica medida por tinción vital de la fosfatasa alcalina del hongo.

La colonización micorrízica en las raíces se hizo mediante la tinción vital de la fosfatasa alcalina del hongo en la raíz (Pearse, 1968; Tisserant *et al.*, 1993), tomando cuatro muestras de raíz por tratamiento. El proceso de tinción vital consistió en la exposición de las raíces en un medio de reacción que consistió en buffer Tris/ácido cítrico 0.05 M, con un pH de 9.2, 0.05% sorbitol, modificando la concentración de celulosa de 15 a 5 unidades y 5 unidades de pectinasa por mililitro de solución utilizada, durante una hora. Posteriormente, se enjuagaron las raíces con agua destilada y se agregó la solución para la detección de la fosfatasa alcalina del hongo (Tris/ácido cítrico (pH 9.2), 1 mg mL^{-1} de azul rápido, 1 mg mL^{-1} de ácido α -naftil fosfato, 0.5 mg mL^{-1} de MgCl_2 , y 0.8 mg mL^{-1} de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) durante toda la noche. Al día siguiente, se eliminó la solución y se detuvo la reacción al agregar hipoclorito de sodio al 1% por 7 minutos. Las raíces se contra-tiñeron durante la noche y en oscuridad a temperatura ambiente, en una solución de fucsina ácida (0.1% en glicerol al 50%), y el exceso de colorante se eliminó con glicerol al 50%. Posteriormente, se estimó microscópicamente el porcentaje de colonización

total, mediante la determinación de la frecuencia de micelio interno con reacción positiva de la fosfatasa alcalina presentes en las raíces.

Diseño experimental

El experimento consistió de un factorial 2x2, con dos niveles de inoculación micorrízica (con y sin HMA) y dos niveles de infección con virus (con y sin TMV), con un total de cuatro tratamientos con cinco repeticiones cada uno en un diseño completamente al azar. Los datos se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha=0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 2002).

Resultados

Severidad de síntomas causados por el TMV

Los síntomas del TMV se manifestaron a los 15 días después de la infección viral (ddi) y se hicieron más evidentes a los 30 ddi. Los síntomas causados por el TMV se presentaron en plantas inoculadas o no con *R. intraradices*, presentándose un nivel de severidad clase IV. Los síntomas consistieron de la presencia de manchas amarillas en las hojas más jóvenes de las plantas el cual fue avanzando al resto de la planta con el tiempo. A los 40 ddi, las plantas infectadas por el TMV presentaron en su totalidad manchas amarillas en todas las hojas, evidenciando la presencia del virus en toda la planta (Apéndice I-1.3).

Evaluación del crecimiento de la planta

El peso seco de tallo y de raíz no presentaron diferencias significativas entre tratamientos. El peso seco de hojas y de la parte aérea no fue afectado por la inoculación del HMA; en general,

las plantas con HMA presentaron los menores valores en comparación con las plantas testigo (Cuadro 1). Por otra parte, las plantas infectadas con TMV mostraron una reducción significativa en el peso seco de hojas y de la parte aérea (LSD, $\alpha = 0.05$). En general, el peso seco total de las plantas disminuyó significativamente en el tratamiento Ri+TMV en comparación con las plantas testigo (Cuadro 4.1) (Apéndice AI-1.4).

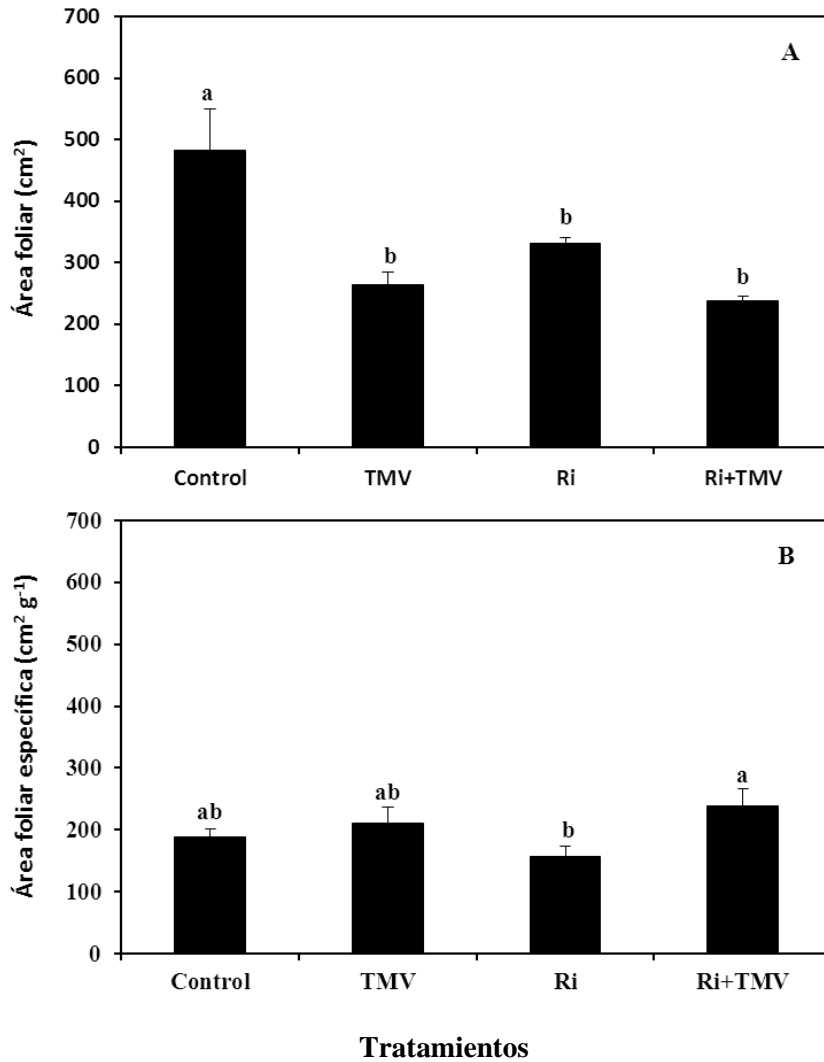


Figura 4.1. Área foliar (A) y área foliar específica (B) de las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectadas con el *Tobacco mosaic virus* (TMV) e inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (RI), después de 40 días de la infección viral. Letras distintas en las barras son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$), $n = 5$, medias \pm error estándar.

Por otro lado, la relación raíz-parte aérea no presentó diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 4.1). Sin embargo, las plantas infectadas con TMV presentaron el valor más bajo (0.39), mientras que el valor más alto lo presentó el tratamiento Ri+TMV (0.51) (Cuadro 4.1).

Cuadro 4.1. Respuesta del crecimiento de las plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectadas con el *Tobacco mosaic virus* (TMV) e inoculadas con *Rhizophagus intraradices* (Ri), después de 40 días de la infección viral.

Tratamientos	Peso seco (g)					Relación raíz-parte aérea (g g ⁻¹)
	Hojas	Tallo	Raíz	Parte aérea	Total	
Testigo	2.52 a	3.46 a	2.91 a	5.98 a	8.89 a	0.48 a
TMV	1.29 b	3.56 a	1.95 a	4.85 b	6.80 ab	0.39 a
Ri	2.16 a	2.86 a	2.52 a	5.02 ab	7.54 ab	0.48 a
Ri + TMV	1.02 b	3.05 a	2.12 a	4.07 b	6.19 b	0.51 a
Significancia:						
TMV	0.001	NS	NS	0.05	0.001	NS
Ri	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ri x TMV	0.001	NS	NS	0.05	0.001	NS

Letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$); n = 5, NS = no significativo.

Los tratamientos Ri+TMV, TMV y testigo no presentaron diferencias significativas entre sí en el área foliar (Figura 4.1A); aunque, las plantas infectadas con el TMV tuvieron menor área foliar que las plantas testigo. La infección por el TMV disminuyó en 38.4% en promedio, el área

foliar en comparación con las plantas testigo (Figura 4.1A). Así, mismo, las plantas con Ri presentaron menor área foliar (23.9%) que las plantas testigo (Figura 4.1A).

En cuanto a la área foliar específica el tratamiento Ri presentó un 34.24% menor valor teniendo un diferencia seignificativa con el tratamiento Ri+TMV, el cual presento la mayor área foliar específica (Figura 4.1B).

Contenido de clorofila, fosfatasa ácida en raíz, contenido total de fenólicos y actividad antioxidante.

El contenido de clorofila total, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos a los 40 días después de la infección (Cuadro 4.2). Por otro lado, la actividad de la enzima fosfatasa ácida de la raíz no presentó diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos TMV y Ri+TMV. El tratamiento Ri presentó diferencia significativa respecto a los demás tratamientos al presentar el menor valor de esta actividad enzimática (Cuadro 4.2). Así, mismo, el contenido total de compuestos fenólicos y la actividad de antioxidante total no presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Cuadro 4.2).

Cuadro 4.2. Efecto de la inoculación de *Rhizophagus intraradices* (Ri) en el contenido total de clorofila, actividad fosfatasa ácida de la raíz, contenido total de compuestos fenólicos, y actividad antioxidante total, en hojas de plantas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectadas con el *Tobacco mosaic virus* (TMV), después de 40 días de la infección viral.

Tratamientos	Contenido total de clorofila (mg g ⁻¹)	Actividad de la fosfatasa ácida de la raíz (μM <i>p</i> -NP g ⁻¹ h ⁻¹)	Contenido total de compuestos fenólicos en hojas (μg ácido galico g ⁻¹)	Actividad total antioxidante en hojas (μM Trolox g ⁻¹)
Testigo	231.9 a	3.9 a	1148.2 a	9466.9 a
TMV	222.8 a	2.2 a	1110.7 a	9071.9 a
Ri	231.5 a	1.3 b	1179.5 a	9459.2 a
Ri + TMV	244.1 a	2.9 a	1140.9 a	9537.1 a
Significance:				
TMV	NS	NS	NS	NS
Ri	NS	NS	NS	NS
Ri x TMV	NS	0.01	NS	NS

Letras distintas en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha=0.05$); n = 5, NS = no significativo.

Colonización micorrízica arbuscular

El total de colonización micorrízica no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con TMV a los 40 días después de la infección. Aunque se esperaría que las plantas no infectadas por el TMV tengan la mayor actividad de la fosfatasa alcalina por la actividad del HMA; sin embargo, no se presentó diferencia entre tratamientos. En general el promedio de colonización fue del 82% independientemente de la infección por el TMV.

Discusión

En este estudio se analizó la inoculación de *Rhizophagus intraradices* (Ri) en plantas de jitomate asociado con la infección por parte del *Tobacco mosaic virus* (TMV). Las plantas infectadas por el TMV presentaron sintomatología típica de la presencia del virus, en los tratamientos con y sin Ri; más aún, la presencia de Ri no disminuyó los síntomas causados por el virus. Lo anterior coincide con Shaul *et al.* (1999) al indicar que en plantas de tabaco colonizadas por el hongo micorrízico e infectadas por el TMV, presentaron mayor sintomatología en comparación con las plantas libres de TMV. La inoculación de *R. intraradices* aumenta la sintomatología del TMV, debido a que el virus se replica en plantas sanas para su perpetuidad.

En la presente investigación, las plantas del tratamiento Ri+TMV presentaron menor área foliar y peso seco total en comparación con los demás tratamientos; sin embargo, el peso seco de tallo y de raíz no mostraron diferencias significativas entre tratamientos, aunque el crecimiento de la planta disminuyó causada por la infección del TMV (Brunt *et al.*, 1996; Rahoutei *et al.*, 2000; Zein *et al.*, 2012). A pesar de que las plantas se encontraban inoculadas con *R. intraradices*, no minimizaron los síntomas de la infección del TMV. Por otro lado, *R.*

intraradices tuvo un efecto contrario a los beneficios que le brinda a la planta cuando se encuentra libre de virus, probablemente por una lenta transferencia de carbono de la planta hacia el hongo, como fue reportado para tres aislados de HMA en plantas de tabaco (Modjo *et al.*, 1987; Gou *et al.*, 1994). Se ha observado que las plantas inoculadas por HMA al presentarse un estrés, no disminuye su crecimiento (Abdel y Chaoxing, 2011). Sin embargo, Daft y Okasanya (1973) encontraron que plantas de tomate colonizadas por *Endogone macrocarpa* var. *geospora* [actualmente reclasificado como *Funneliformis geosporum* (Schüßler y Walker, 2010)] al ser infectadas por el *Tomato aucuba mosaic virus* (TAMV) se observó un incremento en el peso fresco de las hojas y de la raíz. Al parecer en esta investigación la presencia del hongo micorrízico en plantas de jitomate, propicia el desarrollo del virus dentro de la planta, provocando efectos negativos en su desarrollo.

En cuanto al área foliar específica los tratamientos Ri+TMV y TMV no presentaron diferencias significativas con respecto a las plantas testigo. El tratamiento con Ri presentó el menor valor ($157.08 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$) comparado con el tratamiento Ri+TMV que presentó el más alto ($238.9 \text{ cm}^2 \text{ g}^{-1}$).

Alarcón y Ferrera-Cerrato (2003) mencionan que en plantas de cítricos inoculadas con *Glomus Zac-19* no presentaron diferencias significativas en el área foliar específica con las plantas testigo. Sin embargo, en la presente investigación las plantas con HMA fueron las que presentaron el área foliar específica menor y el tratamiento con TMV y Ri+TMV presentaron mayor área foliar específica, indicando que la presencia de virus no tuvo un efecto en esta variable. La literatura menciona que el aumento del área foliar específica tiene correlación con la capacidad fotosintética (Wright y Cannon, 2001) y producción de materia seca la cual es mejorada por los HMA (Aguilera-Gómez *et al.*, 1999). En este experimento, las plantas con el

HMA obtuvieron la menor área foliar específica, observándose el HMA no ayudó al incremento de esta variable.

Por otro lado, el contenido de compuestos fenólicos incrementa en la planta hospedera como resultado de la colonización del HMA (Krishna, 1981; Charitha y Reddy, 2002; Carlsen *et al.*, 2008; Peipp *et al.*, 1997; Harrison y Dixon, 1993) y éstos compuestos son necesarios para un eficiente sistema de defensa de las plantas contra diversos patógenos (Goodman *et al.*, 1967; Peipp *et al.*, 1997; Akhtar y Siddiqui, 2008; Maksimov, 2009). En contraste, en el presente experimento el contenido de compuestos fenólicos totales en presencia o ausencia de *R. intraradices* y del TMV no presentó diferencias significativas en comparación con las plantas testigo.

En cuanto a la actividad antioxidante total no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. La literatura menciona que las plantas de tabaco infectadas con TMV presentan aumentos en la actividad de antioxidantes en los primeros días de la infección pero disminuye cuando empiezan a aparecer los síntomas en las hojas del tabaco (Fodor *et al.*, 1997). Además, Porcel *et al.* (2003) mencionan que la colonización de plantas de soya por *Glomus mosseae* no incrementaron la actividad antioxidante total por estrés externo como la sequía. En este experimento, aunque no se obtuvieron diferencias significativas, las plantas del tratamiento Ri+TMV presentaron mayor actividad antioxidante (0.74%) que las plantas testigo, seguida de las plantas de los tratamientos Ri, y TMV. Por lo que se sugiere que la presencia de Ri o del TMV no interfiere en la actividad antioxidante total.

En cuanto al contenido de clorofila total, no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos; sin embargo, numéricamente el tratamiento Ri+TMV presentó mayor contenido de clorofila en comparación con las plantas testigo, seguido del tratamiento con

TMV y el tratamiento con Ri. La infección del TMV reduce la fotosíntesis (Rahoutei *et al.* 2000) presentándose manchas cloróticas en las hojas infectadas (Dawson *et al.*, 1988; Lehto *et al.*, 2003), disminuyendo el contenido de clorofila (Wolf y Millatiner, 2000). En este trabajo, la inoculación con *R. intraradices* en las plantas infectadas con TMV estimuló el daño en las hojas presentándose menor contenido de clorofila en comparación con el tratamiento TMV.

La actividad enzimática de la fosfatasa ácida de la raíz se ha asociado con una mayor absorción y uso de P (Gómez-Guiñán, 2004; Li *et al.*, 1997). Sin embargo, el tratamiento con *R. intraradices* presentó menor actividad de la fosfatasa ácida en la raíz con respecto a las plantas testigo. Por otro lado, la gran parte de la actividad mineralizadora del P se atribuye a las micorrizas, sin embargo, también la raíz puede sintetizar la enzima fosfatasa (Gómez-Guiñán, 2004). En este trabajo el tratamiento Ri+TMV y las plantas testigo, presentaron mayor actividad enzimática que el tratamiento Ri; en las plantas testigo probablemente la raíz sintetizó a la enzima de la fosfatasa ácida y en el tratamiento Ri+TMV la presencia del virus estimuló a que la raíz junto con el *R. intraradices* sintetizaran a la enzima de la fosfatasa ácida, probablemente la condición hongo-virus toleró la baja disponibilidad de P, activando la enzima fosfatasa ácida influenciando la actividad de la raíz y de los microorganismos en la rizósfera.

Por otra parte, la colonización del HMA no redujo los síntomas causados por el TMV, aunque diversos autores mencionan que uno de los beneficios que tienen las plantas cuando son colonizadas por los HMA es la resistencia hacia patógenos (Roncadori, 1997; Lovera y Cuenca, 2007; Smith y Read, 1997; St-Arnaud y Vujanovic, 2007). Sin embargo, se ha observado que las partes aéreas de plantas colonizadas por HMA se vuelven más susceptibles a los patógenos foliares, e incluso aumenta la sensibilidad a la infección de diferentes virus

(Dehne, 1982). St-Arnaud y Vujanovic (2007) y Daft y Okusanya (1973) mencionan que las plantas colonizadas son más susceptibles a infecciones virales debido al buen estado nutricional, resultado de la simbiosis. Por ejemplo, en plantas de petunia y de fresa inoculadas por el HMA *Endogone macrocarpa* var. *geospora* e infectadas por *Arabid mosaic virus* (AMV) la concentración de virus se encontró en mayor proporción en la raíz y en las hojas (Daft y Okusanya, 1973).

En el presente estudio las plantas infectadas y no infectadas con TMV tuvieron una colonización del HMA estadísticamente similar que va desde 75 al 90% de colonización. En otras investigaciones se ha observado que las plantas en general, infectadas por virus aparentemente estimulan la colonización por HMA, aunque no se menciona la especie de HMA (Schönbeck y Spengler, 1979). En este trabajo el porcentaje de colonización no presentó diferencias significativas, en presencia o ausencia del TMV.

Conclusión

El TMV no fue tan severo con el desarrollo de la planta comparándolo con las plantas testigo; sin embargo, las plantas inoculadas con *R. intraradices* y con TMV presentaron menor desarrollo. Además las plantas con *R. intraradices* presentaron síntomas típicos de la enfermedad causada por el TMV, al igual que las plantas infectadas con TMV. Los resultados obtenidos sugieren que la inoculación de *R. intraradices* incrementa la susceptibilidad a la infección del TMV. Además, la inoculación de *R. intraradices* no favoreció el crecimiento de la planta.

CAPÍTULO V

EVALUACIÓN DE LA POSIBLE TRANSFERENCIA DEL *Tobacco mosaic virus* EN HONGOS MICORRÍZICOS ARBUSCULARES QUE COLONIZAN PLANTAS DE TABACO

Resumen

Este trabajo evaluó el efecto de la inoculación de un consorcio de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y de *Rhizophagus intraradices* en presencia del *Tobacco mosaic virus* (TMV) en el crecimiento, el contenido de clorofila total, la fosfatasa ácida de la raíz, el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante total de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi L.) en condiciones de invernadero. Se estableció un experimento completamente al azar con presencia y ausencia del HMA y con presencia y ausencia del TMV, incluyendo seis tratamientos con cinco repeticiones cada uno. La unidad experimental consistió en cajas de acrílico con tres compartimentos, el Compartimento A consistió de plantas infectadas con TMV, el Compartimento B consistió de plantas libres de virus y la parte media de la unidad experimental consistió solo de sustrato para proporcionar el crecimiento de las hifas de HMA. A los 31 días después de la infección viral, el peso seco total de las plantas del Compartimento A no presentó diferencias significativas entre tratamientos. En el Compartimento B las plantas con *R. intraradices* conectadas con las plantas con *R. intraradices* sin TMV tuvieron significativamente mayor peso seco total en comparación con las plantas con *R. intraradices* conectadas con las plantas con TMV. Las plantas infectadas con el TMV presentaron menor área foliar en comparación con las plantas libres de virus; en el Compartimento B, las plantas que se encontraban conectadas con las plantas colonizadas por *R. intraradices* e infectadas con el TMV, presentaron menor área foliar. El área foliar

específica (g/cm^2) y la relación raíz-parte aérea (g g^{-1}) no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en los Compartimento A y B. La actividad fosfatasa ácida de la raíz ($\mu\text{M } p\text{-NP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) presentó diferencias significativas; las plantas infectadas con TMV y colonizadas con *R. intraradices*, presentaron la menor actividad. En la actividad antioxidante total ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) y contenido total de compuestos fenólicos ($\mu\text{g ácido clorogénico g}^{-1}$), las plantas presentaron mayor actividad antioxidante en el ápice infectadas TMV y plantas sanas. En el Compartimento B se presentó mayor actividad en la parte apical de las plantas colonizadas con el consorcio de HMA y con *R. intraradices* conectadas al Compartimento A, a las plantas libres de virus. En la parte media y apical de las plantas se presentó mayor contenido de clorofila total. Las raíces de las plantas libres de TMV conectadas a las plantas colonizadas con el consorcio e infectadas con el TMV amplificaron la secuencia de 250 pb correspondientes al TMV, aunque no se detectó el virus en las esporas. Se concluye que posiblemente el virus se puede transportar por las hifas de los HMA de una planta enferma hacia una sana.

Palabras claves: *Rhizophagus intraradices*, consorcio micorrízico, tobamovirus, fisiología vegetal, vector, transmisión de virus.

CHAPTER V

EVALUATION OF THE POSSIBLE TRANSFERENCE OF THE *Tobacco mosaic virus* VIA ARBUSCULAR MYCORRHIZAL FUNGI IN TOBACCO PLANTS

Abstract

This research evaluated the effect of inoculating either one consortium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) or *Rhizophagus intraradices*, in combination with the *Tobacco mosaic virus* (TMV) on the growth, the total chlorophyll content, acid root phosphatase, total content of phenolic compounds, and the total antioxidant activity of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi L.) under greenhouse conditions. A completely randomized experiment was set with presence/absence of HMA or TMV, including six treatments with three replicates. Experimental units consisted on acrylic boxes with three compartments: Compartment A comprised plants infected with the TMV, and Compartment B had plants without the virus; the middle compartment consisted on substrate to allow the development of AMF-mycelium. After 31 days of viral infection, the total dry weight did not show significant differences among treatments of Compartment A. In Compartment B, plants inoculated with *R. intraradices* interconnected with mycorrhizal plants without TMV had significantly greater total dry weight when compared to plants inoculated with *R. intraradices* but interconnected with TMV-plants. Plants infected with TMV showed lower leaf area than those plants without the virus; in Compartment B plants interconnected with those TMV-plants inoculated with *R. intraradices* had low leaf area. The specific leaf area (g/cm^2) and the root to shoot ratio (g g^{-1}) did not have significant differences among treatments in Compartments A or B. The acid root phosphatase activity ($\mu\text{M } p\text{-NP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$) showed significant differences; TMV-plants inoculated with *R. intraradices* had the lowest activity. The total antioxidant activity ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$)

and the total content of phenolic compounds (μg ácido clorogénico g^{-1}) were high in apical tissues of plants with or without TMV. In the Compartment B, the highest antioxidant activity was obtained in apical parts of plants inoculated with either the mycorrhizal consortium or *R. intraradices* that were interconnected to plants without TMV at the Compartment A. The middle and the apical parts of plants showed the highest content of total content of chlorophyll. Roots of plants without TMV interconnected to TMV-plants inoculated with the mycorrhizal consortium amplified the sequence of 250 pb corresponded to the TMV, although no TMV virus was detected in spores. As conclusion, it is possible that AMF mycelium may transfer TMV from diseased plants to healthy plants.

Key words: *Rhizophagus intraradices*, mycorrhizal consortium, tobamovirus, plant physiology, vector, virus transmission.

Introducción

Las plantas superiores son frecuentemente susceptibles al ataque de diversos microorganismos patógenos, entre ellos hongos, bacterias y virus, los cuales son difíciles de controlar ya que pueden residir en las plantas por cortos o largos períodos causando daños severos (Okubara y Paulitz, 2005; St-Arnaund y Vujanovic, 2007). En el caso de enfermedades causadas por virus, los productores de tabaco incrementan el control químico, principalmente para controlar los insectos vectores (Jones, 2006). Sin embargo, no solo los insectos son vectores de virus, también los hongos patógenos del suelo como *Polymyxa* spp., *Spongospora* spp. y *Olpidium* spp. (Arif, 2000; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007; Mochizuki *et al.*, 2008), los cuales se controlan químicamente para evitar las infecciones virales. Las principales especies de hongos vectores de virus son *Polymyxa betae*, *P. graminis*, *Spongospora subterranea*, *Olpidium brassicae*, y *O. bornovanus*, los cuales transmiten los virus *Beet necrotic yellow vein virus*, *Beet soil borne virus*, *Barley mild mosaic virus*, *Barley yellow mosaic virus*, *Potato mop-top virus*, *Melon necrotic spot virus*, *Lettuce big-vein virus*, entre otros (Adams *et al.*, 2001; Rush, 2003; Verchot-Lubicz, 2003; Kanyuka *et al.*, 2003; Nielsen y Larsen, 2004; Hartwright *et al.*, 2010; Aguilar *et al.*, 2010).

Estos hongos no son los únicos que residen en la rizósfera, también se encuentran los hongos simbiotes mutualistas obligados como son los hongos micorrízicos arbusculares los cuales proporcionan a la planta una mejor absorción de agua, resistencia a plagas y enfermedades y favorecen la absorción de nutrientes del suelo (Buée *et al.*, 2009; Koide *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 1993). Hasta el momento no se ha reportado que los hongos simbiotes mutualistas sean vectores de virus fitopatógenos; sin embargo, algunos trabajos mencionan que plantas infectadas por el *Tobacco mosaic virus* (TMV) y colonizadas por el hongo

micorrízico arbuscular (HMA), en las células donde se formaron arbusculos presentan alta concentración de partículas virales (Schönbeck y Spengler, 1979).

Por lo anterior, este trabajo evaluó la posible transferencia del TMV a través de las estructuras del HMA en plantas de tabaco inoculadas con *Rhizophagus intraradices*, o con un consorcio de HMA (*Glomus albidum*, *Claroideoglossum claroideum*, *Rhizophagus intraradices*, *Rhizophagus diaphanus*, *Acaulospora laevis*, *Funneliformis geosporum*, *Glomus sinuosum*, *Acaulospora denticulata* y cuatro especies no identificadas de *Glomus* sp.)

Materiales y métodos

Material vegetal, hongo micorrízico arbuscular y fuente de inóculo del virus

Se utilizaron semillas de tabaco (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi L.) con 100% de pureza y 95% de viabilidad. Las semillas se colocaron en papel absorbente estéril húmedo para su germinación. Después de 14 días de la emergencia, se trasplantaron tres plántulas de tabaco en los dos compartimentos de los extremos de cada unidad experimental. El inóculo micorrízico que se utilizó fue *Rhizophagus intraradices* con un porcentaje de colonización del 87%, consistiendo de 30 g de sustrato (800 esporas en 100 g) el cual se colocó en la unidad experimental correspondiente, al momento del trasplante. También se utilizó una mezcla de diferentes géneros de HMA llamada consorcio, obtenido de macetas trampa con plantas de sorgo, creciendo en arena de río como sustrato. Las macetas trampa se encontraban en el invernadero del área de microbiología. Estas muestras se trajeron de los estados de Morelos (frijol), Zacatecas (frijol), Tabasco (limón persa), Yucatán (papaya) y Veracruz (liquidámbar) (Cuadro 5.1), utilizando 30 g del sustrato colocándolo en la unidad experimental al momento del trasplante. En el cuadro 5.1 se describen los géneros que se encuentran en el consorcio.

Cada unidad experimental consistió de una maceta de acrílico (3 mm de espesor), con tres compartimentos. El compartimento de la raíz de las plantas mide 10 x 10 x 10 cm de largo, alto y ancho, y se encuentran separados por un puente de suelo que mide 10 x 10 x 5 cm de largo, alto y ancho delimitado por malla con 34 μm de apertura la cual está cubierta por otra malla no calibrada en ambos lados del puente. Las mallas permiten el paso de las hifas de los HMA, pero no de las raíces. Este puente se interpone entre las plantas asociadas para evitar la transferencia del virus a través de las raíces (Figura 5.1) (Bethlenfalvay *et al.*, 1991). El sustrato que se utilizó fue arena de río y suelo agrícola (2:1v/v), el cual se colocó en autoclave a 120° C por 3 horas, repitiendo este paso tres veces, con intervalo de un día de descanso.

La arena de río es inerte con una porosidad del 40.83%, mientras que el suelo agrícola presentó una textura franco arenosa con un pH alcalino de 8.1, pobre en N con 0.16% y P 30 ppm y con 3.3% de materia orgánica.

El experimento se estableció en condiciones de invernadero con temperatura promedio diurna de 25.24° C y nocturna de 17.11° C, fotoperíodo de 16 h y humedad relativa de 34%. Se utilizó un HOBO (modelo número 8, Temp, RH, LI, EXT, 1996 ONSET) para la obtención de las condiciones ambientales. La fertilización de las plantas se realizó con la solución nutritiva Long Asthon modificando la concentración de P a 11 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Hewitt, 1966) dos veces por semana (Apéndice I-1.1).

Cuadro 5.1 Característica de los géneros que conforman el consorcio utilizado en el experimento.

Inoculante	Hongos micorrízicos arbusculares*	Número de esporas en 100 g	Cantidad de inoculante en la mezcla del consorcio (g)
<i>Rhizophagus intraradices</i>	<i>Rhizophagus intraradices</i>	3,380	300
Consortio Zac-19	<i>Glomus albidum</i> , <i>Claroideoglomus claroideum</i> y <i>Rhizophagus diaphanus</i>	1,718	300
Consortio Tabasco (Naranja)	<i>Acaulospora laevis</i> y <i>Glomus</i> sp. 1	1,000	300
Consortio Mérida (Papaya-Marisol 1)	<i>Funneliformis geosporum</i> y <i>Glomus sinuosum</i>	812	300
Consortio Veracruz	<i>Acaulospora denticulata</i> , <i>Glomus</i> sp. 2, <i>Glomus</i> sp. 3, <i>Glomus</i> sp. 4	1,033	300

*Los nombres científicos corresponden a la nueva clasificación de Schüßler y Walker (2010).

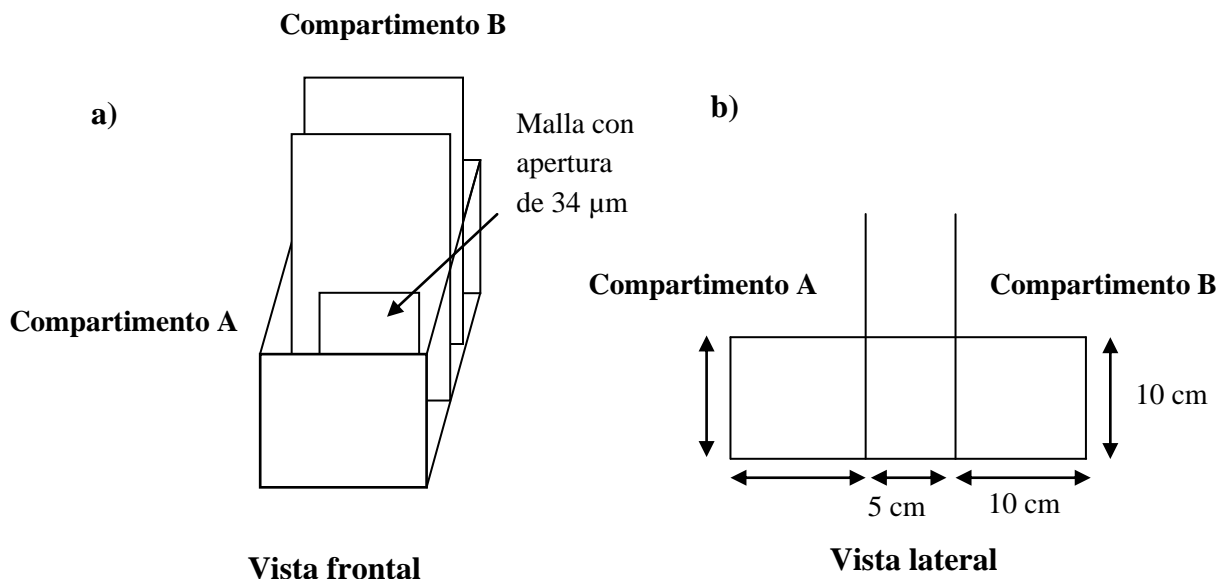


Figura 5.1. Esquema de la unidad experimental. a) Vista frontal. b) Vista lateral. Compartimentos A, plantas con virus según el tratamiento y Compartimento B, plantas libres de virus.

Después de 77 días del trasplante se llevó a cabo la infección con el virus en las plantas. Una hoja de planta de jitomate previamente infectada con el TMV se colocó en una bolsa de plástico que contenía buffer de fosfatos [0.1 M fosfato de potasio monobásico (3.4 g L^{-1}), fosfato de potasio dibásico (4.34 g L^{-1}), fosfato de sodio dibásico (4.34 g L^{-1}) y dietilditiocarbamato de sodio (DIECA) (4.34 g L^{-1})] ajustado a pH 7.2 y aplicando en una relación 1:10 (tejido:buffer). El tejido foliar infectado con el TMV dentro de la bolsa de plástico fue macerado, y posteriormente se mantuvo a 4° C hasta ser usado en las plantas de tabaco.

En las hojas de las plantas de tabaco a inocular se colocó aproximadamente 0.5 g de carburo de silicio (Bos, 1983) como abrasivo para realizar pequeñas heridas al tejido foliar y con ello facilitar la entrada de las partículas virales a la célula. La inoculación del virus se realizó con un hisopo que se sumergió en la suspensión viral obtenida de las hojas

previamente maceradas, y frotándolo sobre la superficie de las hojas a infectar. Las hojas de las plantas testigo fueron frotadas únicamente con buffer de fosfatos.

Los tratamientos se distribuyeron en las unidades experimentales quedando de la siguiente manera:

Unidad experimental 1: Compartimento A plantas testigo (sin HMA y sin TMV), Compartimento B plantas testigo (sin HMA y sin TMV).

Unidad experimental 2: Compartimento A colonizadas por el consorcio (CONS1-A), Compartimento B plantas colonizadas por el consorcio (CONS1-B).

Unidad experimental 3: Compartimento A plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* (Ri2-A); Compartimento B plantas colonizadas por *R. intraradices* (Ri2-B).

Unidad experimental 4: Compartimento A plantas infectadas por el TMV (TMV3-A); Compartimento B plantas libres de TMV (SV3-B).

Unidad experimental 5: Compartimento A plantas colonizadas por el consorcio e infectada por el TMV (CONS+TMV4-A); Compartimento B plantas colonizadas por el consorcio libre de virus (CONS+SV4-B).

Unidad experimental 6: Compartimento A plantas colonizadas por *R. intraradices* e infectadas por el TMV (Ri+TMV5-A); Compartimento B plantas colonizadas por *R. intraradices* libres de virus (Ri+SV5-B).

Evaluación del crecimiento de la planta

Después de 30 días de la infección por el TMV se tomó una planta de cada compartimento y de cada tratamiento para determinar el área foliar (cm^2), peso seco de la hoja, de la parte aérea y de raíces por separado, así como el peso seco total (g). Para determinar el peso seco de la parte aérea y de la raíz, los tejidos se colocaron en estufa a 70°C durante 48 h, y posteriormente pesados en balanza analítica (Ohaus® ScoutTMPro). Además, se estimó el área foliar específica (área foliar/peso seco de hoja, $\text{cm}^2 \text{g}^{-1}$) y la relación raíz-parte aérea (peso seco de raíz/peso seco de parte aérea, g g^{-1}).

Contenido de clorofila total

El contenido de clorofila total se determinó con acetona al 80%. Se tomaron tres muestras de hoja (ápice, parte media y parte basal) de una planta tomada de cada compartimento y de cada tratamiento. Cada muestra fue de 0.1 g de tejido foliar y se tomó a los 30 días después de la infección del TMV. Se tomaron lecturas de absorbancia a 470, 645 y 662 nm con un espectrofotómetro (Hewlett Packard^R modelo 8453), para posteriormente determinar el contenido de clorofila total (mg g^{-1}) (Dere *et al.*, 1998).

Determinación de la fosfatasa ácida en raíz

La actividad de la fosfatasa ácida radical se determinó con la técnica de Tabatabai (1982). Se tomó una planta de cada compartimento de cada uno de los tratamientos. Se maceró 0.1 g de raíz en 1 mL de buffer universal modificado pH 5.5 (100 mM THAM, 100 mM ácido maleico, 5 mM ácido cítrico, y 100 mM ácido bórico). Se tomaron 400 μL del extracto obtenido y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL, los cuales se centrifugaron a 13,000

rpm por 15 min. Se tomaron 150 μL del supernadante y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL al cual se agregaron 200 μL de *p*-nitrofenil-fosfato (*p*-NPP) 3 mM. Los tubos se incubaron a 37°C durante 45 min y se adicionaron 100 μL de 0.5 M CaCl_2 y 400 μL de 0.5 M NaOH agitando vigorosamente, y se centrifugó a 13,000 rpm por 15 min. Finalmente, se obtuvieron las lecturas de absorbancia a 420 nm utilizando un espectrofotómetro (Biotek® modelo Synergy 2). La concentración de la fosfatasa ácida fue determinada a partir de una curva estándar de *p*-nitrofenol y expresada en masa de peso fresco por hora ($\mu\text{moles } p\text{-NP g}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Contenido total de fenólicos y determinación de la actividad antioxidante total

El contenido total de compuestos fenólicos se determinó con la prueba de Folin-Ciocalteu utilizando una curva estándar de ácido clorogénico (Singleton y Rossi, 1965; Soong y Barlow, 2004; Cartmill *et al.*, 2007). Los extractos fueron obtenidos macerando tejido fresco en un mortero con metanol al 80% y centrifugando por 15 min a 15,000 rpm. La mezcla de reacción consistió de 30 μL del extracto más 90 μL de Na_2CO_3 y 150 μL del reactivo Folin-Ciocalteu en una microplaca de 96 pozos. Después de 30 minutos, se tomó la absorbancia a 725 nm con un espectrofotómetro (Biotek® modelo Synergy 2). Los resultados fueron expresados como microgramos de equivalentes de ácido clorogénico por gramo de tejido fresco ($\mu\text{g ácido clorogénico g}^{-1}$).

La actividad antioxidante total (AT) se determinó por neutralización del radical libre de 1,1-diphenyl-2-picryldrazyl (DPPH), utilizando Trolox como compuesto antioxidante (Re *et al.*, 1999; Mathäus, 2002; Cartmill *et al.*, 2007). La mezcla de reacción consistió en 15 μL del extracto más 270 μL de solución DPPH en microplacas de 96 pozos. A los 15 minutos de

incubación de las microplacas se tomaron lecturas de absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro (Biotek® modelo Synergy 2). Los resultados fueron expresados como micromoles de equivalentes de Trolox por gramo de tejido fresco ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$).

Colonización micorrízica arbuscular

La colonización micorrízica de la raíces se realizó con dos métodos, 1) mediante la tinción vital de la fosfatasa alcalina del hongo, y 2) mediante el método tinción con azul de tripano.

Para la evaluación de esta variable se tomaron tres muestras de raíz de cada compartimento y de cada tratamiento. La colonización micorrízica de las raíces con tinción vital de la fosfatasa alcalina del hongo se realizó a los 30 días después de la infección por el virus. El proceso de tinción vital (Pearse, 1968; Tisserant *et al.*, 1993) consistió en la exposición de las raíces en un medio de reacción (0.05 M) de buffer Tris/ácido cítrico (pH 9.2), 0.05% sorbitol, y modificando la concentración de celulosa y pectinasa, colocando solo 5 unidades de celulosa mL^{-1} y 5 unidades de pectinasa mL^{-1} durante una hora, se enjuagaron las raíces y se agregó el reactivo para la detección de la fosfatasa alcalina [(Tris/ácido cítrico (pH 9.2), 1 mg mL^{-1} de azul rápido, 1 mg mL^{-1} de ácido α -naftil fosfato, 0.5 mg mL^{-1} de MgCl_2 y 0.8 mg mL^{-1} de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)] durante toda la noche. Se eliminó el reactivo para fosfatasa alcalina y se agregó hipoclorito de sodio (1%) por 7 minutos, y las raíces se contra-tiñeron por 12 horas y en oscuridad a temperatura ambiente en una solución de fucsina ácida (0.1% en glicerol al 50%), y el exceso de colorante se eliminó con glicerol al 50%. Posteriormente, se estimó microscópicamente el porcentaje de colonización total mediante la determinación de la

frecuencia del micelio interno con reacción positiva de la fosfatasa alcalina presentes en las raíces.

Por otra parte, se utilizó la técnica propuesta por Phillips y Hayman (1970), mediante la tinción por azul de tripano. Las raíces libres de suelo, se colocaron en frascos de vidrio esterilizables conteniendo KOH al 10%, las raíces se dejaron toda la noche con el KOH. Al día siguiente se retiró el KOH y se enjuagaron con abundante agua destilada, se continuó con el blanqueo adicionando H₂O₂, en suficiente cantidad para cubrir a las raíces; se dejó el H₂O₂ por 10 minutos, pasado este tiempo, se enjuagaron con agua destilada. Se siguió con la acidificación con HCl al 10%, por 10 minutos y se decantó, sin enjuagar, se procedió a la tinción con azul tripano, 0.05% en lactoglicerol durante toda la noche. Una vez teñidas las raíces se decoloraron con lactoglicerol.

Una vez terminada la tinción se prepararon laminillas (portaobjetos) colocando 20 segmentos radicales de aproximadamente un centímetro de longitud y se cubrieron con cubreobjetos, se observaron tres pasajes equidistantes por laminilla en un microscopio óptico a un aumento de 40X (González-Chávez, 1993). Se determinó el porcentaje total por las estructuras fúngicas dentro de la raíz.

Detección de virus en hojas y raíz de las plantas de tabaco, y en esporas del HMA por RT-PCR

La extracción del ARN total se realizó por el método de Trizol®, modificado del protocolo original. Se agregaron 700 µL de Trizol® en tubos eppendorf de 1.5 mL y se conservaron a 4°C. Por otro lado, se maceró 0.1 g de tejido vegetal o bien, 300 esporas de los HMA, en nitrógeno líquido (N). El tejido ya macerado se colocó dentro de los tubos con

Trizol® con ayuda de una espátula estéril, se agitaron los tubos vigorosamente y se incubaron por 10 minutos en hielo. Se adicionaron 200 µL de cloroformo al tubo con el tejido macerado y se agitaron vigorosamente, para centrifugarlos a 14,000 rpm por 15 minutos a 4° C. Se colectó la fase acuosa (superior) de cada tubo y se transfirieron cuidadosamente a tubos eppendorf estériles de 1.5 mL. Se adicionaron 500 µL de isopropanol a cada tubo mezclando suavemente y se incubó en hielo por 10 minutos, después se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos a 4°C. Una vez centrifugados se desecharon los sobrenadantes, se observó en el fondo de cada tubo una pastilla de consistencia gelatinosa. Para el lavado del ARN se agregaron a cada tubo 1 mL de etanol al 75% disolviendo cuidadosamente la pastilla que se observó en el fondo. Posteriormente se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos a 4°C, se desecharon cuidadosamente los sobrenadantes y se colocaron los tubos hacia abajo para su secado sobre papel absorbente estéril. Una vez que los tubos se encontraron secos se re-suspendieron las pastillas de cada uno en 30 µL de agua de estéril libre de RNasas, y ya re-suspendidas las pastillas se almacenaron a -20° C.

Para determinar si se extrajo adecuadamente el ARN se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Por este método se observan dos bandas que corresponden a las subunidades pequeña y grande de los ribosomas. Para realizar la electroforesis en un matraz Erlenmeyer se disolvieron 0.3 g de agarosa en 30 mL de buffer TBE 1X para tener una concentración de agarosa al 1%. Se introdujo el matraz en un horno de microondas a la máxima temperatura hasta que la solución llegó a punto de ebullición. Se retiró el matraz del horno y se agitó hasta disolver perfectamente el agar y tener una solución totalmente transparente; posteriormente, se agregó al matraz 0.5 µL de bromuro de etidio para teñirlo. Una vez disuelto completamente el agar se dejó enfriar y se vació sobre el portagel de la cámara de electroforesis, se colocó el

peine en el portagel, y se retiró una vez solidificado el gel. Se agregaron 200 mL de buffer TBE 1X a la cámara de electroforesis hasta cubrir el gel.

Por otro lado, en un trozo de plástico de 5 cm por 1 cm, se colocaron 3 μ L de buffer de carga y 5 μ L de la muestra de ARN haciendo una mezcla homogénea para cargar los pozos del gel. Una vez que se llenaron los pozos se cerró la cámara de electroforesis y se colocaron los cables de corriente (rojo) y tierra (negro) de la cámara de electroforesis a la fuente de poder, programándola a 80 V por 30 minutos. Terminado el tiempo se observó el gel en el transiluminador.

Para la realización de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR por sus siglas en inglés) se utilizaron los iniciadores diseñados por De La Torre-Almaraz *et al.* (2007), los cuales fueron TMV/CPF (5'-GCIYTIGGIAAYCARTTYCARACICAR CA-3') y TMV/CPR (5'-IGCRTCIARIGTYTCIGCIGTIGTIGGRTT-3') y que amplificaron un fragmento de 250 pb. El primer paso fue realizar una pre-RT general por cada muestra, en tubos para PCR se colocaron 1 μ L de iniciador F, 1 μ L de iniciador R, 3 μ L de ARN de la muestra y 7 μ L de agua teniendo un volumen final de 12 μ L, los tubos se colocaron en un termociclador a 72° C por 10 minutos. Por otro lado, se mezcló en un tubo eppendorf de 1.5 mL, por cada muestra 4 μ L de buffer RT 5X, 2 μ L de DTT 0.1 M, 1 μ L de dNTPs 10mM, 1 μ L de M-MLV, teniendo un volumen final de 8 μ L, esta mezcla se añadió a cada tubo para PCR que anteriormente se colocaron en el termociclador. De nuevo se colocaron los tubos en el termociclador a 37°C por 60 minutos y a 70° C por 10 minutos para realizar la retrotranscripción. Después de este paso se realizó una mezcla para la PCR. Por cada muestra se agregó 2.5 μ L de buffer PCR 5X, 1.25 μ L de MgCl₂ 30 mM, 0.5 μ L de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP's), 1.0 del primer F,

1.0 μL del primer R 17.25 μL de agua, 0.5 μL de la Taq polimerasa 5U y finalmente 1 μL de cDNA. Cada muestra se colocó en el termociclador con el siguiente programa, desnaturalización 2 minutos a 95° C, apareamiento 2 minutos 56° C y extensión 2 minutos a 72° C con 31 ciclos. Una vez finalizado todos los ciclos se realizó un gel de agarosa al 1% para observar la amplificación de cada muestra. La electroforesis se realizó a 65 volts por 70 minutos.

Para la extracción de ARN de esporas e hifas del Consorcio y de *Rhizopagus intraradices* se realizó un tratamiento preliminar con la intención de esterilizar la superficie de las esporas. En tubos eppendorf se colocaron las esporas de cada tratamiento, a cada tubo se le agregó 700 μL de una solución de Tween 20 al 0.05% (v/v) con Cloramina T al 2% por 10 minutos. Después se enjuagó tres veces con agua destilada estéril colocándolas en la centrífuga por 30s a 12,000 rpm, se repitió dos veces este paso. Posteriormente se dejaron por una noche en una solución estéril de 200 mg L^{-1} de estreptomina y 100 mg L^{-1} de gentamicina (Bécard y Fortin, 1988). Antes de realizar la extracción de ARN total, se enjuagaron las esporas tres veces con agua destilada estéril. La extracción se realizó por el método de Trizol®, como se describió anteriormente.

Diseño experimental

El experimento se analizó como factorial 3x2 en un diseño completamente al azar, con tres niveles de inoculación micorrízica (consorcio, *R. intraradices* y sin hongo) y dos niveles de infección con virus (con y sin TMV), con un total de seis tratamientos con cinco repeticiones cada uno. Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha=0.05$) utilizando el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 2002).

Resultados

Los síntomas de infección viral se manifestaron a los 10 días después de la infección (ddi) y se hicieron más evidentes a los 15 ddi. Los síntomas causados por el TMV se expresaron en los tratamientos TMV3-A, CONS+TMV4-A y Ri+TMV5-A. Los síntomas causados por el virus consistieron en manchas amarillas en las hojas y en ápices de las plantas; posteriormente, las manchas se presentaron en el resto de la planta. A los 30 ddi las plantas infectadas por el TMV presentaron en su totalidad decoloración en las hojas, síntomas típicos de la infección por el TMV evidenciando la presencia del virus en toda la planta. A los 30 ddi se tomaron las muestras para la evaluación de las variables.

Evaluación del crecimiento de la planta

Las plantas del tratamiento Ri+TMV5-A del Compartimento A, presentaron diferencias significativas (LSD, $\alpha=0.05$) con las plantas del tratamiento Ri2-A. En el Compartimento B, el tratamiento Ri2-B presentó el mayor peso seco y el tratamiento Ri+SV5B el menor peso (Cuadro 4).

En general, el peso seco total de las plantas disminuyó significativamente (LSD, $\alpha=0.05$) en los tratamientos Ri+TMV5-A y Ri+SV5-B en comparación con los tratamientos Ri2-A y Ri2-B. Las plantas testigo de los dos compartimentos no presentaron diferencias significativas (LSD, $\alpha=0.05$) respecto a las plantas de los tratamientos CONS1-A y CONS1-B, Ri2-A y Ri2-B, TMV3-A y SV3-B (Cuadro 5.2).

En cuanto al área foliar, las plantas de los tratamientos CONS1-A, CONS1-B y Ri2-A presentaron la mayor área foliar, con una diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) con las plantas de los tratamientos Ri+TMV5-A y Ri+SV5-B las cuales tuvieron la menor área foliar;

los tratamientos TMV3-A y CONS+TMV4-A, también tuvieron menor área foliar con una diferencia significativa con CONS1-A. Sin embargo, TMV3-A y CONS+TMV4-A no presentaron diferencias significativas con las plantas testigo (Cuadro 5.3).

En relación al área foliar específica, los tratamientos del Compartimento A no presentaron diferencias significativas en comparación con las plantas testigo. En el Compartimento B, los tratamientos CONS+SV4-B y Ri+SV5-B presentaron la mayor área foliar específica y el tratamiento Ri2-B presentó el menor valor, sin embargo, los tratamientos mencionados no tuvieron diferencia significativa con las plantas testigo (Cuadro 5.4).

Cuadro 5.2. Efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el peso seco (g) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.

Tratamiento Compartimento A	Peso seco total (g)	Tratamiento Compartimento B	Peso seco total (g)
Testigo	1.63 ab	Testigo	2.08 abc
CONS1-A	2.4 ab	CONS1-B	2.42 ab
Ri2-A	2.63 a	Ri2-B	2.99 a
TMV3-A	1.28 ab	SV3-B	1.74 abc
CONS+TMV4-A	1.58 ab	CONS+SV4-B	1.14 bc
Ri+TMV5-A	1.13 b	Ri+SV5-B	0.62 c
Significancia:			
	TMV	NS	
	HMA	NS	
	HMA x TMV	NS	

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). n = 5. NS= no significativo. Simbología de tratamientos: CONS1-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento A; CONS1-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento B; Ri2-A = plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* en el compartimento A; Ri2-B = plantas colonizadas por *R. intraradices* en el compartimento B; TMV3-A = plantas infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; SV3-B = plantas libres de *Tobacco mosaic virus* en el compartimento B; CONS+TMV4-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA e infectadas por el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; CONS+SV4-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA, libres de virus en el compartimento B; Ri+TMV5-A = plantas colonizadas por *R. intraradices* infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; Ri+SV5-B = plantas colonizadas por *R. intraradices*, libres de virus en el compartimento B.

Cuadro 5.3. Efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el área foliar (cm²) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.

Tratamiento Compartimento A	Área foliar (cm ²)	Tratamiento Compartimento B	Área foliar (cm ²)
Testigo	326.4 ab	Testigo	344.4 ab
CONS1-A	396.7 a	CONS1-B	483.7 a
Ri2-A	422.1 a	Ri2-B	424.4 ab
TMV3-A	193.0 b	SV3-B	394.7 ab
CONS+TMV4-A	180.5 b	CONS+SV4-B	318.3 ab
Ri+TMV5-A	151.2 b	Ri+SV5-B	169.1 b
Significancia:			
TMV	0.01		
HMA	NS		
TMV x HMA	NS		

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). n = 5. NS= no significativo. Simbología de tratamientos: CONS1-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento A; CONS1-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento B; Ri2-A = plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* en el compartimento A; Ri2-B = plantas colonizadas por *R. intraradices* en el compartimento B; TMV3-A = plantas infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; SV3-B = plantas libres de *Tobacco mosaic virus* en el compartimento B; CONS+TMV4-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA e infectadas por el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; CONS+SV4-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA, libres de virus en el compartimento B; Ri+TMV5-A = plantas colonizadas por *R. intraradices* infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; Ri+SV5-B = plantas colonizadas por *R. intraradices*, libres de virus en el compartimento B.

Cuadro 5.4. Efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el área foliar específica de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.

Tratamiento Compartimento A	Área foliar específica (g cm ²)	Tratamiento Compartimento B	Área foliar específica (g cm ²)
Testigo	412.4 a	Testigo	397.26 ab
CONS1-A	381.1 a	CONS1-B	439.84 ab
Ri2-A	332.3 a	Ri2-B	284.74 b
TMV3-A	477.2 a	SV3-B	487.84 ab
CONS+TMV4-A	286.5 a	CONS+SV4-B	601.68 a
Ri+TMV5-A	323.6 a	Ri+SV5-B	557.52 a
Significancia:			
	TMV	NS	
	HMA	NS	
	TMV x HMA	NS	

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). n = 5. NS= no significativo. Simbología de tratamientos: CONS1-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento A; CONS1-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento B; Ri2-A = plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* en el compartimento A; Ri2-B = plantas colonizadas por *R. intraradices* en el compartimento B; TMV3-A = plantas infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; SV3-B = plantas libres de *Tobacco mosaic virus* en el compartimento B; CONS+TMV4-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA e infectadas por el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; CONS+SV4-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA, libres de virus en el compartimento B; Ri+TMV5-A = plantas colonizadas por *R. intraradices* infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; Ri+SV5-B = plantas colonizadas por *R. intraradices*, libres de virus en el compartimento B.

La relación raíz-parte aérea, en los tratamientos del Compartimento A y del Compartimento B no presentaron diferencias significativas en comparación con las plantas testigo. Sin embargo, en el Compartimento A, los tratamientos CONS+TMV4-A y Ri+TMV5-

A presentaron mayor relación raíz-parte aérea comparado con el testigo. En el Compartimento B, los tratamientos CONS+SV4-B y Ri+SV5-B junto con las plantas testigo presentaron los valores más altos en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5. Efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la relación raíz-parte aérea (g g^{-1}) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.

Tratamiento Compartimento A	Relación raíz-parte-aérea (g g^{-1})	Tratamiento Compartimento B	Relación raíz-parte-aérea (g g^{-1})
Testigo	0.079 a	Testigo	0.162 a
CONS1-A	0.084 a	CONS1-B	0.073 a
Ri2-A	0.071 a	Ri2-B	0.053 a
TMV3-A	0.161 a	SV3-B	0.12 a
CONS+TMV4-A	0.666 a	CONS+SV4-B	0.148 a
Ri+TMV5-A	0.114 a	Ri+SV5-B	0.139 a
Significance:			
TMV	NS		
HMA	NS		
TMV x HMA	NS		

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). n = 5. NS= no significativo. Simbología de tratamientos: CONS1-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento A; CONS1-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento B; Ri2-A = plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* en el compartimento A; Ri2-B = plantas colonizadas por *R. intraradices* en el compartimento B; TMV3-A = plantas infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; SV3-B = plantas libres de *Tobacco mosaic virus* en el compartimento B; CONS+TMV4-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA e infectadas por el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; CONS+SV4-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA, libres de virus en el compartimento B; Ri+TMV5-A = plantas colonizadas por *R. intraradices* infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; Ri+SV5-B = plantas colonizadas por *R. intraradices*, libres de virus en el compartimento B.

En cuanto a la fosfatasa ácida de la raíz, el tratamiento Ri2-A del Compartimento A, presentó diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) teniendo mayor actividad de la fosfatasa ácida que las plantas testigo; mientras que las plantas del tratamiento Ri+TMV5-A del Compartimento A, presentaron la menor actividad. Por el contrario, las plantas de los tratamientos del Compartimento B no presentaron diferencias significativas con las plantas testigo, las cuales presentaron mayor fosfatasa ácida seguido del tratamiento Ri+SV5-B y del tratamiento SV3-B, mientras que el tratamiento con menor fosfatasa ácida fue Ri2-B (Cuadro 5.6).

Actividad antioxidante, contenido total de compuestos fenólicos, contenido de clorofila total

Se tomaron tres muestras de la planta (ápice, parte media y parte basal) para la evaluación de la actividad antioxidante. En el Compartimento A, los tratamientos CONS1-A y Ri2-A presentaron diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) respecto a los demás tratamientos teniendo mayor actividad de antioxidante total en el ápice de la planta. Los tratamientos TMV3-A y CONS+TMV4-A presentaron la menor actividad antioxidante total.

En el compartimento B, el tratamiento con mayor actividad de antioxidante fue Ri2-B en la parte apical de la planta, mientras que los tratamientos CONS+SV4-B y Ri+SV5-B presentaron la menor actividad antioxidante (Cuadro 5.7). En general, se observó que en el Compartimento A la menor actividad antioxidante total se presentó en la parte basal de las plantas de todos los tratamientos. En el Compartimento B, la menor actividad antioxidante se observó en la parte media y basal de la planta de todos los tratamientos (Cuadro5.7).

Cuadro 5.6. Efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la fosfatasa ácida de la raíz ($\mu\text{M } p\text{-NP } \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.

Tratamiento Compartimento A	Fosfatasa ácida de la raíz ($\mu\text{M } p\text{-NP } \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)	Tratamiento Compartimento B	Fosfatasa ácida de la raíz ($\mu\text{M } p\text{-NP } \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$)
Testigo	2.57 ab	Testigo	2.55 a
CONS1-A	2.29 ab	CONS1-B	2.23 a
Ri2-A	2.62 a	Ri2-B	2.14 a
TMV3-A	2.16 ab	SV3-B	2.36 a
CONS+TMV4-A	2.12 ab	CONS+SV4-B	2.19 a
Ri+TMV5-A	2.07 b	Ri+SV5-B	2.45 a
Significancia:			
TMV	NS		
HMA	NS		
TMV x HMA	NS		

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). n = 5. NS= no significativo. Simbología de tratamientos: CONS1-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento A; CONS1-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento B; Ri2-A = plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* en el compartimento A; Ri2-B = plantas colonizadas por *R. intraradices* en el compartimento B; TMV3-A = plantas infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; SV3-B = plantas libres de *Tobacco mosaic virus* en el compartimento B; CONS+TMV4-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA e infectadas por el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; CONS+SV4-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA, libres de virus en el compartimento B; Ri+TMV5-A = plantas colonizadas por *R. intraradices* infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; Ri+SV5-B = plantas colonizadas por *R. intraradices*, libres de virus en el compartimento B.

Por otra parte, en el Compartimento A se observó que los tratamientos CONS1-A y Ri2-A presentaron el mayor contenido de compuestos fenólicos en la parte apical de la planta,

mientras que en la parte basal se observó una diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) en el tratamiento Ri+TMV5-A, al mostrar menor contenido total de compuestos fenólicos en la parte basal de la planta (Cuadro 5.8). Los tratamientos del Compartimento A, CONS1-A, Ri2-A, CONS+TMV4-A y TMV3-A en la parte media y apical de la planta, no presentaron diferencias significativas con las plantas testigo (Cuadro 5.8). En el Compartimento B se observó que el tratamiento Ri2-B presentó el mayor contenido total de compuestos fenólicos en la parte apical de la planta, y los tratamientos SV3-B, CONS+SV4-B y Ri+SV5-B tuvieron el menor contenido de compuestos fenólicos en la parte basal y parte media de la planta de la planta. Los tratamientos CONS1-B en la parte apical y media de la planta no presentaron diferencias significativas respecto a las plantas testigo, mientras que los tratamientos SV3-B, CONS+SV4-B y Ri+SV5-B en la parte apical y media de la planta, presentaron diferencias significativas (LSD, $\alpha = 0.05$) respecto a las plantas testigo (Cuadro 5.8).

Cuadro 5.7. Efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la actividad antioxidante total ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.

Actividad antioxidante total ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$)							
Tratamiento Compartimento A	Toma de muestra foliar de la planta			Tratamiento Compartimento B	Toma de muestra foliar de la planta		
	Ápice	Medio	Basal		Ápice	Medio	Basal
Testigo	1364.87 ab	1007.44 bc	736.11 ced	Testigo	1035.75 cd	1039.29 cd	566.24 ef
CONS1-A	1484.02 a	854.07 cd	470.68 defg	CONS1-B	1532.39 b	1079.4 cd	613.42 ef
Ri2-A	1611.42 a	836.38 cd	580.39 def	Ri2-B	2168.23 a	1316.51 bc	723.13 de
TMV3-A	396.36 efg	139.79 g	150.4 g	SV3-B	603.98 ef	570.95 ef	372.77 efg
CONS+TMV4-A	216.46 fg	124.45 g	112.65 g	CONS+SV4-B	396.95 efg	110.29 g	47.77 g
Ri+TMV5-A	332.07 efg	493.69 defg	184.61 fg	Ri+SV5-B	400.49 efg	281.35 fg	81.98 g
Significancia:				Significancia:			
	TMV	0.01			HMA	NS	
	HMA	NS			PP	0.01	
	PP	0.01			HMA x PP	NS	
	TMV x HMA x PP	NS					

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). $n = 5$. NS= no significativo. Simbología de tratamientos: CONS1-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento A; CONS1-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento B; Ri2-A = plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* en el compartimento A; Ri2-B = plantas colonizadas por *R. intraradices* en el compartimento B; TMV3-A = plantas infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; SV3-B = plantas libres de *Tobacco mosaic virus* en el compartimento B; CONS+TMV4-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA e infectadas por el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; CONS+SV4-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA, libres de virus en el compartimento B; Ri+TMV5-A = plantas colonizadas por *R. intraradices* infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; Ri+SV5-B = plantas colonizadas por *R. intraradices*, libres de virus en el compartimento B. PP = parte de la planta.

Cuadro 5.8. Efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el contenido total de compuestos fenólicos (μg ácido clorogénico g^{-1}) de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.

Contenido total de compuestos fenólicos (μg ácido clorogénico g^{-1})							
Tratamiento Compartimento A	Toma de muestra foliar en la planta			Tratamiento Compartimento B	Toma de muestra foliar en la planta		
	Ápice	Medio	Basal		Ápice	Medio	Basal
Testigo	441.42 ab	367.77 abc	355.96 abcd	Testigo	399.87 bcd	382.92 bcde	316.07 def
CONS1-A	457.4 a	369.16 abc	262.85 cd	CONS1-B	478.8 bcd	400.57 bcd	286.47 efg
Ri2-A	469.63 a	369.58 abc	320.52 bcd	Ri2-B	582.47 a	450.87 bcd	354.71 cdef
TMV3-A	354.22 abcd	370.48 abc	360.2 abcd	SV3-B	274.52 fg	280.22 fg	208.17 g
CONS+TMV4-A	362.7 abcd	282.38 cd	257.5 cd	CONS+SV4-B	340.88 def	204.14 g	211.78 g
Ri+TMV5-A	290.85 cd	385.63 abc	231.93 d	Ri+SV5-B	284.88 efg	281.54 fg	193.99 g
Significancia:				Significancia:			
	TMV	NS			HMA	NS	
	HMA	NS			PP	0.01	
	PP	0.01			HMA x PP	NS	
	TMV x HMA x PP	NS					

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). $n = 5$. NS= no significativo. Simbología de tratamientos: CONS1-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento A; CONS1-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento B; Ri2-A = plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* en el compartimento A; Ri2-B = plantas colonizadas por *R. intraradices* en el compartimento B; TMV3-A = plantas infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; SV3-B = plantas libres de *Tobacco mosaic virus* en el compartimento B; CONS+TMV4-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA e infectadas por el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; CONS+SV4-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA, libres de virus en el compartimento B; Ri+TMV5-A = plantas colonizadas por *R. intraradices* infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; Ri+SV5-B = plantas colonizadas por *R. intraradices*, libres de virus en el compartimento B. PP = parte de la planta.

Cuadro 5.9. Efecto de la infección del *Tobacco mosaic virus* (TMV) o de la inoculación de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el contenido del contenido de clorofila total de plantas de tabaco, establecidas en sistemas de dos compartimentos (A y B) con interacción a través de las hifas de los HMA, después de 30 días de la infección viral.

Tratamiento Compartimento A	Contenido de clorofila total (mg g ⁻¹)						
	Toma de muestra foliar en la planta			Toma de muestra foliar en la planta			
	Ápice	Medio	Basal	Tratamiento Compartimento B	Ápice	Medio	Basal
Testigo	1.11 abcd	0.65 cde	0.39 de	Testigo	0.91 cdefgh	0.54 fgh	0.22 h
CONS1-A	1.6 a	1.5 a	1.12 abcd	CONS1-B	1.94 ab	1.31 abcdef	0.7 defgh
Ri2-A	0.67 cde	0.92 abcd	0.17 e	Ri2-B	1.69 abc	1.15 cdef	0.34 gh
TMV3-A	1.07 abcd	1 abcd	0.75 bcde	SV3-B	0.65 efgh	1.04 cdefg	1.56 abc
CONS+TMV4-A	1.28 abc	1.61 a	1.33 abc	CONS+SV4-B	0.96 cdefgh	2.02 a	1.42 abcde
Ri+TMV5-A	0.63cde	1.41 ab	1.01 abcd	Ri+SV5-B	0.74 defgh	1.46 abcd	1.18 bcdef
Significancia:				Significancia:			
TMV	NS			HMA	0.01		
HMA	0.01			PP	NS		
PP	NS			HMA x PP	NS		
TMV x HMA x PP	NS						

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). n = 5. NS= no significativo. Simbología de tratamientos: CONS1-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento A; CONS1-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA en el compartimento B; Ri2-A = plantas colonizadas por *Rhizophagus intraradices* en el compartimento A; Ri2-B = plantas colonizadas por *R. intraradices* en el compartimento B; TMV3-A = plantas infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; SV3-B = plantas libres de *Tobacco mosaic virus* en el compartimento B; CONS+TMV4-A = plantas colonizadas por el consorcio de HMA e infectadas por el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; CONS+SV4-B = plantas colonizadas por el consorcio de HMA, libres de virus en el compartimento B; Ri+TMV5-A = plantas colonizadas por *R. intraradices* infectadas con el *Tobacco mosaic virus* en el compartimento A; Ri+SV5-B = plantas colonizadas por *R. intraradices*, libres de virus en el compartimento B. PP = parte de la planta.

En el Compartimento A se observa que el tratamiento CONS1-A tuvo mayor contenido de clorofila y en el tratamiento Ri2-A se observó el menor contenido de clorofila total. El tratamiento TMV3-A, Ri2-A, Ri+TMV5-A no presentaron diferencias significativas con el tratamiento CONS1-A, donde se observó el mayor contenido de clorofila total.

En el Compartimento B, el tratamiento CONS+SV4-B presentó el mayor contenido de clorofila total en la parte media de la planta, seguido del tratamiento CONS1-B en la parte apical de la planta, teniendo diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) con las plantas testigo con el menor contenido de clorofila total. El tratamiento Ri2-B presentó más contenido de clorofila en la parte apical de las plantas teniendo diferencia significativa con la parte media y basal de la planta. En el tratamiento SV3-B la parte basal presentó mayor contenido de clorofila total teniendo diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) que la parte apical y media de la planta (Cuadro 5.9).

Detección de TMV en hojas y raíz de plantas de tabaco y en esporas de HMA por RT-PCR

En la figura 4 se observa la calidad del ARN extraído de las hojas de tabaco. En todos los tratamientos se observan tres bandas que corresponden al ARNr de subunidad grande, ARNr de subunidad pequeña, ARN de la planta degradado y ARN viral (Figura 5.2).

Mediante RT-PCR utilizando primers específicos a TMV, en los tratamientos CONS+TMV4-A, CONS+SV4-B, Ri+TMV5-A y TMV3-A amplificaron un fragmento de 250 pb, el cual corresponde al TMV (Figura 5.3).

Por otro lado, se realizó la extracción de ARN de la raíces de las plantas de tabaco para verificar que el virus también se encontraba en la raíz. Se observaron las bandas del ARNr de subunidad grande, ARNr de subunidad pequeña y el ARN de la planta degradado (Figura 5.4).

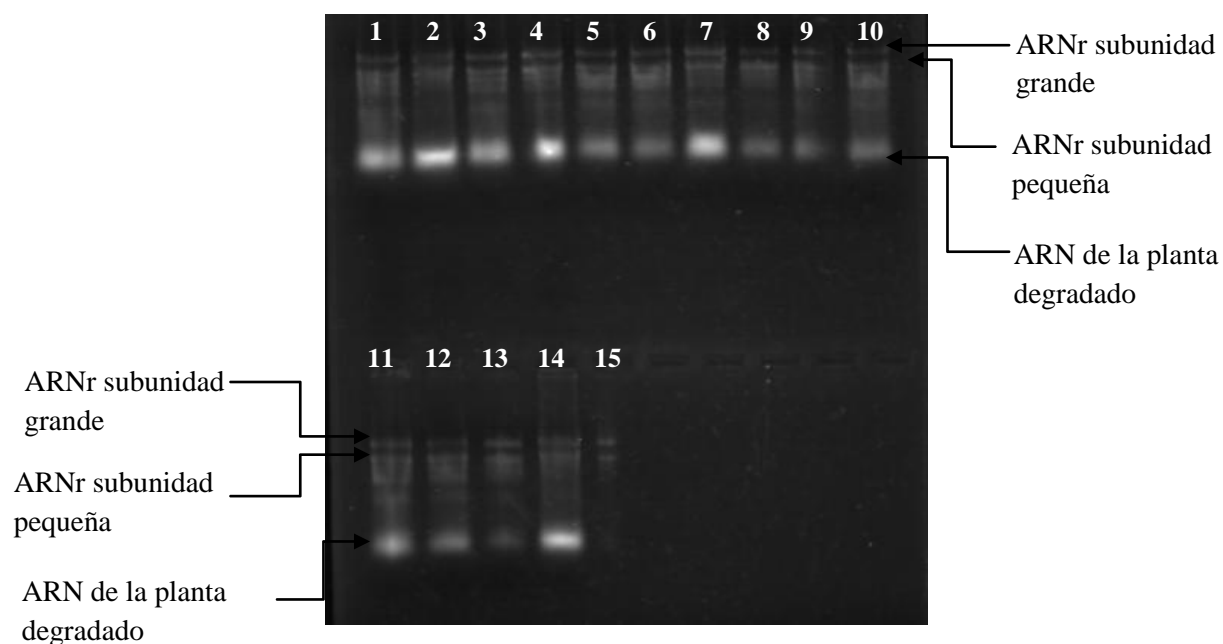


Figura 5.2. Calidad del ARN de hojas de planta de tabaco. Pozo 1 CONS+TMV4-A; Pozo 2 CONS+SV4-B; Pozo 3 Ri+TMV5-A; Pozo 4 Ri+SV5-B; Pozo 5 TMV3-A; Pozo 6 SV3-B; Pozo 7 CONS1-A; Pozo 8 CONS1-B; Pozo 9 Ri2-A; Pozo 10 Ri2-B; Pozo 11 plantas testigo compartimento A; Pozo 12 plantas testigo Compartimento B; Pozo 13 control negativo; Pozo 14 Control positivo.

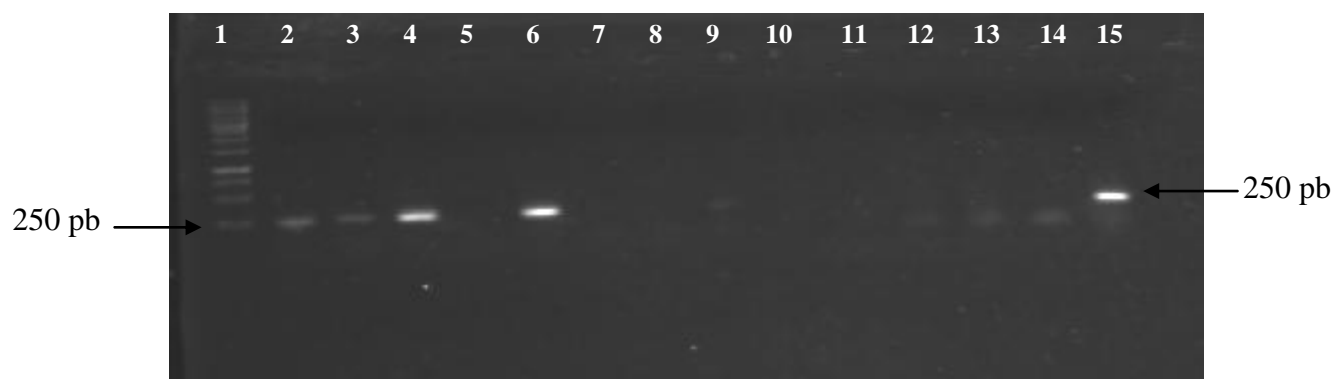


Figura 5.3. Productos de RT-PCR obtenidos con iniciadores específicos para *Tobacco mosaic virus* en hojas de tabaco, electroforesis. Pozo 1 marcador de peso molecular 1 kb; Pozo 2 CONS+TMV4-A; Pozo 3 CONS4-B; Pozo 4 Ri+TMV5-A; Pozo 5 Ri+SV5-B; Pozo 6 TMV3-A; Pozo 7 SV3-B; Pozo 8 CONS1-A; Pozo 9 CONS1-B; Pozo 10 Ri2-A; Pozo 11 Ri2-B; Pozo 12 plantas testigo Compartimento A; Pozo 13 plantas testigo Compartimento B; Pozo 14 control negativo; pozo 15 control positivo.

Una vez que se realizó la RT-PCR para las muestras de raíz, se observó que los tratamientos CONS+TMV4-A, CONS+SV4-B, Ri+TMV5-A y TMV3-A amplificaron un fragmento de 250 pb, el cual corresponde al TMV (Figura 5.5).

Por otro lado, se realizó la extracción de ARN de esporas del consorcio de HMA y de *R. intraradices*, y posteriormente se realizó la RT-PCR teniendo como resultado que en las muestras de esporas no amplificó el fragmento de 250 pb correspondiente al TMV (Figura 5.6).

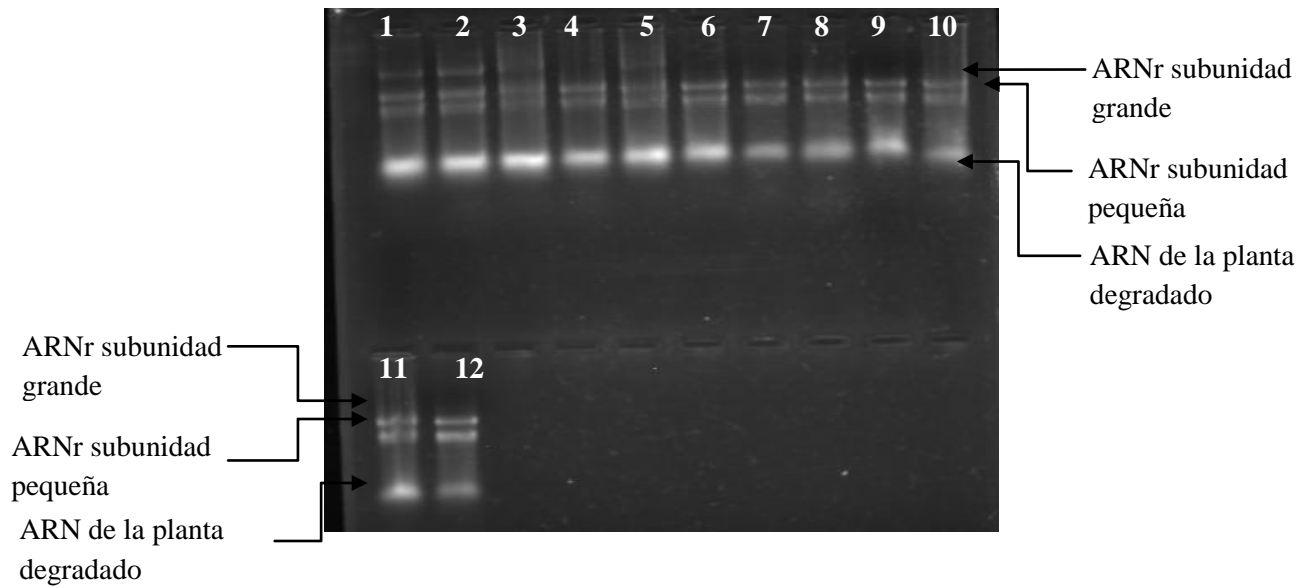


Figura 5.4. Calidad del ARN de raíces de planta de tabaco. Pozo 1 CONS+TMV4-A; Pozo 2 CONS+SV4-B; Pozo 3 Ri+TMV5-A; Pozo 4 Ri+SV5-B; Pozo 5 TMV3-A; Pozo 6 SV3-B; Pozo 7 CONS1-A; Pozo 8 CONS1-B; Pozo 9 Ri2-A; Pozo 10 Ri2-B; Pozo 11 plantas testigo negativo compartimento A; Pozo 12 plantas testigo negativo Compartimento B.

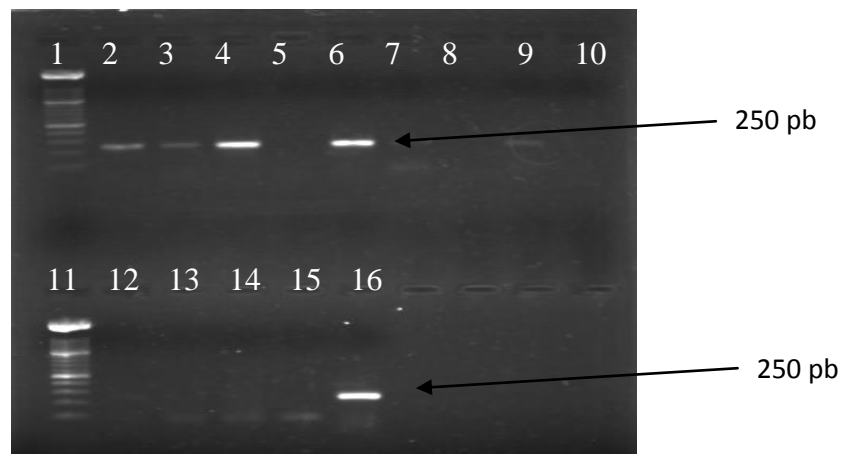


Figura 5.5. Productos de RT-PCR obtenidos con iniciadores específicos para *Tobacco mosaic virus* en raíces de tabaco, electroforesis. Pozo 1 y 11 marcador de peso molecular de 1 kb; Pozo 2 CONS+TMV4-A; Pozo 3 CONS+SV4-B; Pozo 4 Ri+TMV5-A; Pozo 5 Ri+SV5-B; Pozo 6 TMV3-A; Pozo 7 SV3-B; Pozo 8 CONS1-A; Pozo 9 CONS1-B; Pozo 10 Ri2-A; Pozo 12 Ri2-B; Pozo 13 plantas testigo Compartimento A; Pozo 14 plantas testigo Compartimento B; Pozo 15 control negativo; pozo 16 control positivo.

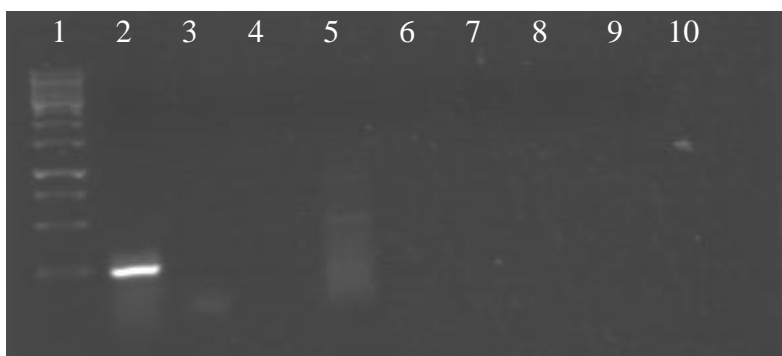


Figura 5.6. Productos de RT-PCR obtenidos con iniciadores específicos para *Tobacco mosaic virus* en esporas de la rizosfera de tabaco, electroforesis. Pozo 1 marcador molecular 1 Kb, pozo 2 control (+), pozo 3 control (-); Pozo 4 CONS+TMV4-A; Pozo 5 esporas e hifas que se encuentran en la parte media de la unidad experimental de los tratamientos CONS+TMV4-A y CONS+SV4-B; Pozo 6 CONS+SV4-B; Pozo 7 Ri+TMV5-A; Pozo 8 esporas e hifas que se encuentran en la parte media de la unidad experimental de los tratamientos Ri+TMV5-A y Ri+SV5-B; Pozo 9 Ri+SV5-B.

Colonización micorrízica

El porcentaje de colonización total por la técnica de tinción con azul tripano en el Compartimento A, los tratamientos CONS1-A y Ri2-A tuvieron mayor porcentaje, con diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) con los tratamientos CONS+TMV4-A y Ri+TMV5-A los cuales tuvieron menor porcentaje de colonización. En el Compartimento B, el tratamiento Ri2-B presentó el porcentaje más alto teniendo diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) con el tratamiento CONS1-B que tuvo 59.3% y con los tratamientos CONS+SV4-B y RiSV5-B que presentaron el porcentaje más bajo (29.6 y 39.6% respectivamente) (Cuadro 5.10).

Cuadro 5.10. Porcentaje de colonización por el hongo micorrízico arbuscular (HMA) en raíces de plantas de tabaco infectadas con el *Tobacco mosaic virus* (TMV) después de 30 días de la infección.

Colonización micorrízica por tinción azul de tripano (%)			
Tratamiento	Compartimento A	Tratamiento	Compartimento B
Testigo	0 c	Testigo	0 d
CONS1-A	78 a	CONS1-B	59.3 b
Ri2-A	72.6 a	Ri2-B	76 a
TMV3-A	0 c	SV3-B	0 d
CONS+TMV4-A	34.6 b	CONS+SV4-B	29.6 c
Ri+TMV5-A	29.6 b	Ri+SV5-B	39.6 c
Significancia:		Significancia:	
TMV	0.01		
HMA	0.01	HMA	0.01
TMV x HMA	NS		

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). n = 3.

En el Compartimento A, los tratamientos con mayor actividad de la fosfatasa alcalina del hongo fueron CONS+TMV4-A y Ri+TMV5-A presentando diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) con los tratamientos CONS1-A y Ri2-A los cuales presentaron la menor actividad de la fosfatasa alcalina. En el Compartimento B, el tratamiento Ri+SV5-B tuvo mayor actividad de fosfatasa alcalina presentando diferencia significativa (LSD, $\alpha = 0.05$) con los tratamientos CONS+SV4-B, Ri2-B y CONS1-B (Cuadro 5.11).

Cuadro 5.11. Colonización por el hongo micorrízico arbuscular (HMA) por el método de la actividad de la fosfatasa alcalina, en raíces de plantas de tabaco infectadas con el *Tobacco mosaic virus* (TMV) después de 30 días de la infección.

Colonización micorrízica con reacción positiva de la fosfatasa alcalina (%)			
Tratamiento	Compartimento A	Tratamiento	Compartimento B
Testigo	0 c	Testigo	0 c
CONS1-A	35 b	CONS1-B	32 b
Ri2-A	29.6 b	Ri2-B	32.6 b
TMV3-A	0 c	SV3-B	0 c
CONS+TMV4-A	50.6 a	CONS+SV4-B	37.6 b
Ri+TMV5-A	44 a	Ri+SV5-B	50 a
Significancia:			
TMV	0.01		
HMA	0.01	HMA	0.01
TMV x HMA	0.01		

Letras diferentes en la misma columna son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha = 0.05$). n = 3.
 CONS = consorcio de HMA; Gi = *Glomus intraradices*.

Discusión

Esta investigación analizó la posible transferencia del *Tobacco mosaic virus* (TMV) a través de las hifas de HMA de una planta infectada con este virus a una planta sana. Independientemente de la inoculación de los HMA, se observó que las plantas de tabaco infectadas con el TMV en el compartimento A, presentaron síntomas típicos de la enfermedad causada por el virus, mientras que sus correspondientes plantas en el compartimento B, no presentaron síntomas. Sin embargo, se observó disminución del

crecimiento de las plantas en los tratamientos CONS+SV4-B y Ri+SV5-B, los cuales se encuentran conectados a los tratamientos del Compartimento A con infección del TMV. El peso seco total de los tratamientos CONS1-A, Ri2-A, TMV3-A, CONS+TMV4-A y Ri+TMV5-A fue similar a las plantas testigo. Sin embargo, el tratamiento Ri2-A presentó significativamente mayor peso con respecto al tratamiento Ri+TMV5-A. Abdel-Fattah (2001) menciona que *R. intraradices* es un hongo muy eficiente para incrementar el crecimiento de la planta, lo cual no se observó en el presente experimento. En esta investigación las plantas de tabaco tratadas con este hongo tuvieron menor crecimiento, al síntoma asociado al TMV (Reinert *et al.*, 1988), similar al registrado en los tratamientos Ri2-B y Ri+SV5-B.

El área foliar en el Compartimento A, los tratamientos no presentaron diferencias significativas con las plantas testigo, sin embargo, los tratamientos CONS1-A y Ri2-A presentaron mayor área foliar y una diferencia significativa con los demás tratamientos que se encontraban infectadas por el TMV, causando deformación de las hojas y reduciendo el crecimiento de la planta (Rahoutei *et al.*, 2000; Brunt *et al.*, 1996; Zein *et al.*, 2012). En el Compartimento B se observó que las plantas de los tratamientos conectadas a las plantas con TMV tuvieron menor área foliar comparado con las plantas conectadas a las plantas sin TMV del Compartimento A.

Por otro lado, el área foliar específica en el Compartimento A no mostró diferencia significativa entre los tratamientos, mientras que en el Compartimento B las plantas de los tratamientos conectados con las plantas del Compartimento A con TMV tuvieron mayor área foliar específica, aunque no presentaron diferencias significativas con las plantas testigo. La presencia del TMV no fue significativa para esta variable, como se observó en

las variables peso seco y área foliar de los tratamientos de los compartimentos A y B. Aunque se observó el TMV no fue significativo, entre el área foliar y el peso seco de la hoja, siendo una estrategia para maximizar el área de intercambio de la luz, que en este experimento la infección por el TMV no fue significativo, por unidad de masa de hojas (Wright y Cannon, 2001).

Otra variable que no presentó diferencias significativas en los Compartimentos A y B fue la relación raíz-parte aérea, mostrando que la presencia del TMV no fue un factor determinante entre el peso seco de la raíz y el peso seco de la parte aérea. Un ejemplo es en el caso de tomate, cuando presenta un estrés hídrico la relación raíz-parte aérea no presentó diferencias significativas, sin embargo, en maíz provoca disminución de las hojas (Vianello y Sobrado, 1991;).

La mineralización del fósforo orgánico está mediada por las enzimas fosfatasas, las cuales se sintetizan por las raíces (Tarafdar y Claassen, 1988; Krämer y Green, 2000; Gómez-Guiñán, 2004). En este trabajo se observó que las plantas inoculadas con *R. intraradices* sin TMV tuvo mayor actividad de la fosfatasa ácida mientras que en las plantas inoculadas con *R. intraradices* e infectadas con el TMV, presentaron la menor actividad. Se puede sugerir que la enzima disminuyó su actividad en presencia del TMV, ya que el virus al infectar a la planta en la parte aérea se dirige sistemáticamente a la raíz lo que hace que la raíz se enfoque al ataque del virus y no se activa la enzima (Hull, 2002). En el Compartimento B no se presentaron diferencias significativas, posiblemente porque las plantas no estuvieron directamente relacionadas con el virus.

Por otro lado, cuando las plantas se infectan con virus responden con el incremento de la producción de antioxidantes y compuestos fenólicos, en los primeros estadios de la

infección del virus (Fodor *et al.*, 1997) o al ataque de algún otro patógeno (Goodman *et al.*, 1967; Peipp *et al.*, 1997; Akhtar y Siddiqui, 2008; Maksimov, 2009) o simbiote como por ejemplo los HMA, que al colonizar la raíz de la planta incrementa la producción de antioxidantes (Vosátka y Albrechtová, 2009).

En este trabajo se observó que las plantas inoculadas con el consorcio de HMA y por *R. intraradices* libres de TMV, presentaron mayor actividad de antioxidante total y de compuestos fenólicos en el Compartimento A, mientras que en el Compartimento B, los tratamientos tuvieron resultados similares. Las plantas infectadas con el TMV presentaron menor actividad antioxidante total y de compuestos fenólicos, aunque en la literatura menciona que la presencia de algún patógeno incrementa la actividad antioxidante y compuestos fenólicos (Fodor *et al.*, 1997; Porcel *et al.*, 2003), las plantas con TMV del Compartimento A y las plantas del Compartimento B presentaron menor actividad antioxidante total y compuestos fenólicos. La inoculación de HMA aumentó la actividad antioxidante, días después de la inoculación, disminuyendo después de siete días de inoculación como se observó en trabajos anteriores Blilou *et al.*, 2000, Ramírez y Rodríguez, 2012). Sin embargo, la combinación de TMV y HMA disminuyó la actividad antioxidante y contenido total de compuestos fenólicos probablemente porque la presencia de HMA y TMV modifican la expresión génica al cambiar los sistemas de desarrollo de la planta y generar cambios especiales de metabolismo y morfogénesis como lo mencionan Allen *et al.* (1995); Bohnert y Sheveleva (1998).

Por otro lado, la infección de las plantas por el TMV resulta en alteraciones morfológicas y fisiológicas, asociado con síntomas como clorosis y necrosis foliar con

cambios en la estructura y función de los cloroplastos (Rahoutei *et al.*, 2000), reduciendo con ello, la fotosíntesis de la planta infectada (Zaitlin y Hull, 1987; Dawson *et al.*, 1988; Lehto *et al.*, 2003; Wolf y Millatiner, 2000).

En el presente experimento se observó que las plantas del Compartimento A que se encontraban inoculadas con el consorcio de HMA y con *R. intraradices* e infectadas con el TMV no presentaron diferencias significativas con las plantas libres de virus, en el contenido de clorofila total. En el Compartimento B, se observó resultados similares de los tratamientos del Compartimento A. Esto sugiere que el virus no afectó la cantidad de clorofila total, aunque diversos estudios han mostrado que la infección viral disminuye la cantidad de clorofila y la actividad fotosintética (Wolf y Millatiner, 2000). Sin embargo, Lucas *et al.* (1993) menciona que la infección del TMV solo afecta a las hojas que se encuentran de jóvenes a maduras. Tal vez por esta razón las plantas infectadas con el TMV mostraron resultados similares con las plantas libres de virus o por el incremento de la nutrición de las plantas micorrizadas (Dehne, 1982).

La infección por el TMV tuvo efectos significativos en la colonización micorrízica arbuscular estimada con el método por la actividad de la fosfatasa alcalina del hongo, como por tinción por azul de tripano. Después de 30 días de la infección del TMV la colonización micorrízica con azul de tripano presentó mayor porcentaje en las plantas libres de TMV en el compartimento A, observándose en el Compartimento B, resultados similares. Puede deberse a que en las raíces de las plantas infectadas con TMV, evitan la colonización por parte de los HMA. Aunque no se ha reportado, el virus podría limitar el desarrollo del hongo dentro de la raíz. Por el otro lado, se observó que la colonización por la reacción de la fosfatasa alcalina, en las plantas con virus del Compartimento A mostraron mayor

colonización, así mismo se observó en el Compartimento B. Probablemente, la presencia del TMV indujo que los HMA aumentaran de manera indirecta la actividad metabólica del hongo en la transferencia del P hacia el hospedero (Schonbeck y Dehne, 1981; Krämer y Green, 2000; Gómez-Guiñán, 2004) por la presencia del TMV.

Las variables peso seco total, área foliar, área foliar específica, actividad antioxidante total, contenido total de compuestos fenólicos y la colonización micorrízica determinada por el método de tinción con azul de tripano y por la fosfatasa alcalina del hongo presentaron resultados con la misma tendencia, esto es que las plantas inoculadas con los HMA e infectadas con el TMV no tuvieron diferencias significativas respecto al testigo, sin embargo, numéricamente fueron los de mayor valor, en el Compartimento A. En el Compartimento B, las plantas conectadas con plantas infectadas con TMV, numéricamente presentaron mayor valor.

En cuanto a la extracción de ARN total de la raíz, se observó que los tratamientos CONS+TMV4-A, CONS+SV4-B, Ri+TMV5-A y TMV3-A amplificaron para TMV. El tratamiento CONS+SV4-B, que se encontraba en el Compartimento B libre de virus, amplificó el segmento de 250 pb que corresponden al TMV. Estas plantas se encontraban conectadas a las plantas con TMV del Compartimento A. Hasta el momento los HMA no se han reportado como posible vector de virus, como los hongos parásitos del orden Chytridiales y Plasmodiophorales, donde se encuentran los géneros *Polymyxa* spp., *Spongospora* spp. y *Olpidium* spp. (Campbell, 1996; Rush, 2003; Rochon *et al.*, 2004; Merz *et al.*, 2005; Navarro *et al.*, 2005; Sasaya y Koganezawa, 2006; Verchot-Lubicz *et al.*, 2007). Estudios anteriores han reportado que plantas de tomate, petunia y fresa colonizadas con HMA incrementa el número de partículas virales (Daft y Okusanya, 1973) y más

recientemente se ha observado alta concentración de partículas virales en las células con presencia de arbusculos de *Glomus* sp. (Jabaji-Hare y Stobbs, 1984) e inclusiones virales en los tubos germinativos de algunas esporas de HMA (Kuga *et al.*, 2008). La presencia del HMA solo es una vía de transmisión del TMV a través de la superficie las hifas hacia plantas sanas, debido a que los resultados obtenidos en esta investigación, se observa que las muestras de ARN total de las esporas del consorcio de HMA amplificaron para el TMV, y las raíces de las plantas sanas conectadas a las plantas con TMV por medio del consorcio de HMA, también amplificaron la banda de 250 pb que corresponden al TMV. Lo que sugiere que las partículas pudieron transmitirse vía superficie de las hifas.

Conclusión

La colonización de las plantas de tabaco por parte del consorcio de HMA o por *R. intraradices* no atenuaron los síntomas que causó la infección del TMV. Las variables peso seco total, área foliar, área foliar específica, actividad antioxidante total, contenido total de compuestos fenólicos y la colonización micorrízica por el método de tinción con azul de tripano, presentaron mayor valor en las plantas sin TMV en los tratamientos del Compartimento A y Compartimento B.

Las esporas del consorcio de HMA que se encontraban en la rizósfera de las plantas infectadas con el TMV, amplificaron la banda de 250 pb que corresponden al TMV. Las raíces de las plantas sanas, que se encontraban conectadas con el consorcio de HMA, a las plantas infectadas con el TMV amplificaron la banda de 250 pb correspondientes al TMV. Por lo que, el consorcio de HMA transfirió al TMV a través de sus hifas de una planta enferma a una planta sana.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son simbioses obligados mutualistas que proporcionan beneficios a las plantas que colonizan, por ejemplo, la absorción y

translocación de P y otros nutrientes minerales del suelo. También se ha observado que las plantas colonizadas por los HMA son más resistentes a plagas y enfermedades. Sin embargo, en el presente estudio, la inoculación de los HMA en las plantas de jitomate o de tabaco no disminuyó los síntomas causados por la enfermedad del TMV. En el desarrollo de la planta se observó que el peso seco de las plantas, el área foliar, la actividad antioxidante total, el contenido total de compuestos fenólicos y el contenido total de clorofila, disminuyeron en presencia del TMV. El porcentaje de colonización micorrízica total, fue mayor en las plantas libres de virus; sin embargo, la estimación de la colonización micorrízica a través de la tinción vital de la fosfatasa alcalina del hongo, mostró que el porcentaje de colonización fue mayor en raíces de plantas infectadas con el TMV.

En el caso de plantas sanas de tabaco conectadas a plantas enfermas por medio de los HMA, se observó que el peso seco, el área foliar, la actividad antioxidante total, el contenido total de fenólicos y el contenido total de clorofila, disminuyeron aun en ausencia de la infección del TMV. Por otro lado, la extracción del ARN total para la detección del TMV, mostró que las raíces de las plantas infectadas con el TMV amplificaron la banda de 250 pb correspondiente al TMV. Sin embargo, también se observó que las raíces de las plantas sanas colonizadas con el consorcio de HMA que estaban conectadas a las plantas enfermas por el TMV, amplificaron también la banda de 250 pb correspondiente al TMV. Lo anterior sugiere que el TMV pudo moverse a través de las hifas de los HMA de las raíces de las plantas infectadas con TMV hacia las raíces de las plantas sanas. No obstante, a través del método molecular utilizado en este trabajo, no se logró detectar la presencia del TMV en esporas de los HMA.

Este estudio demostró que el micelio de los HMA al colonizar una planta enferma puede contribuir en la trasmisión del TMV a una planta sana, y causar por ello, la sintomatología típica del virus. No obstante, se requiere profundizar sobre este tema, realizando futuras investigaciones para entender mejor la función del HMA en plantas enfermas con virus. Estos resultados son muy preliminares para decir de manera contundente, si los HMA son transmisores o vectores de virus fitopatógenos; sin embargo, se logró diagnosticar la transferencia del virus de los HMA hacia plantas sanas.

Este trabajo es uno de los primeros reportes en México, acerca de la interacción HMA y TMV en plantas de jitomate y tabaco.

LITERATURA CITADA

- Abdel AAH, Chaoxing H. 2011. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition, antioxidant enzymes activity and fruit yield of tomato grown under salinity stress. *Scientia Horticulturae* 127: 228–233.
- Abdel-Fattah GM. 2001. Measurement of the viability of arbuscular-mycorrhizal fungi using three different stains; relation to growth and metabolic activities of soybean plants. *Microbiological Research*. 156: 359–367.
- Adams MJ. 2002. The mosaic viruses of winter barley: problems and prospects. *In: Proceedings of the BCPC Conference: Pests and Diseases, 2002*. Farnham, UK: British Crop Protection Council, 105–120.
- Adams MJ., Antoniw JF., Mullins JGL. 2001. Plant virus transmission by plasmodiophorid fungi is associated with distinctive transmembrane regions of virus-encoded proteins. *Archives of Virology*. 146: 1139–1153.
- Agrios GN. 1996. *Fitopatología*. Ed. Limusa 2da Edición. México. 837 p.
- Agrios GN. 2004. *Plant pathology*. 5th Edition.. Ed. Academic Press Inc. USA. 952 p
- Aguilar MI., Guirado ML, Melero-Vara JM., Gómez J. 2010. Efficacy of composting infected plant residues in reducing the viability of Pepper mild mottle virus, Melon necrotic spot virus and its vector, the soil-borne fungus *Oplidium bornovanus*. *Crop Protection*. 29: 342–348.
- Aguilera-Gómez L., Davies, FT., Olalde-Portugal V., Duray SA. Phavaphutanon L. 1999. Influence of phosphorus and endomycorrhiza (*Glomus intraradices*) on gas exchange and plant growth of chile ancho pepper (*Capsicum annuum* L. cv. San Luis). *Photosynthetica*. 36: 441-449.

- Akhtar MS., Siddiqui ZA. 2008. Arbuscular mycorrhizal fungi as potencial bioprotectants against plant pathogens. *In: Mycorrhizae: Sustainable agriculture and forestry.* Siddiqui ZA., Akhtar MS., Futai K. (eds.). Ed. © Springer Science 61-97.
- Alarcón A., Ferrera-Cerrato R. 1999. Manejo de la micorriza arbuscular en sistemas de propagación de plantas frutícolas. *Terra* 17: 179-191.
- Alarcón A., Ferrera-Cerrato, R. 2003. Aplicación de fósforo e inoculación de hongos micorrízicos arbusculares en el crecimiento y estado nutricional de *Citrus volkameriana* Tan & Pasq. *Terra*. 21: 91-99.
- Allard HA. 1916. Some properties of the virus of the mosaic disease of tobacco. *Journal Agricultural Research*. 6: 649–674.
- Allen MT., Yetter RA., Dryer FL. 1995. The decomposition of nitrous oxide at $1.5 \leq P \leq 10.5$ atm and $1103 \leq T \leq 1173$ K. *International Journal of Chemical Kinetics*. 27: 883-909.
- Arif M. 2000. Fungally transmitted rod-shaped plant viruses: biology, transmission and molecular pathology. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 3: 1194-1212.
- Badge JL., Kashiwazaki S., Lock S. Foster GD. 1997. A *Bymovirus* PCR primer and partial nucleotide sequence provides further evidence for the recognition of rice necrosis mosaic virus as a *bymovirus*. *European Journal of Plant Pathology*. 103: 721–724.
- Balaguera HE., Álvarez-Herrera JG. y Rodríguez JD. 2008. Efecto del déficit de agua en el trasplante de plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Agronomía Colombiana*. 26: 246-255.
- Barker S., Tagu D., Delp G. 1998. Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*. 116: 1201-1207.

- Barr DJS. 1980. An outline for the reclassification of the Chytridiales, and for a new order, the Spizellomycetales. *Canadian Journal of Botany* 58: 2380–2394.
- Bass C., Hendley R., Adams MJ., Hammond-Kosack KE., Kanyuka K. 2006. The *Sbml* locus conferring resistance to soil-borne cereal mosaic virus maps to a gene-rich region on 5DL in wheat. *Genome* 49:1140-1148.
- Bécard BG., Fortin JA. 1988. Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist*. 108: 211-218.
- Bethlenfalvay GJ., Reyes-Solis MG., Camel SB., Ferrera-Cerrato R. 1991. Nutrient transfer between the root zones of soybean and maize plants connected by a common mycorrhizal mycelium. *Physiologia Plantarum*. 82: 423-432.
- Bever JD., Schultz PA. Pringle A., Morton JB. 2001. Arbuscular mycorrhizal fungi: more diverse than meets the eye, and the ecological tale of why. *BioScience* 51:923-931.
- Bhyravbhatla B., Watowich SJ., Caspar DL. 1998. Refined atomic model of the four-layer aggregate of the tobacco mosaic virus coat protein at 2.4 Å resolution. *Biophysical Journal*. 74: 604-615.
- Blilou I., Bueno P., Ocampo JA., García-Garrido JM. 2000. Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*. *Mycological Research*. 104: 722-725.
- Bohnert HJ., Sheveleva E. 1998. Plant stress adaptations – making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology*. 1: 267-274.
- Bonfante P., Anca I. 2009. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: A network of interactions. *Annual Review of Microbiology*. 63:363-383.

- Bos L. 1983. Introduction to plant virology. Longman Group Limited. United Kingdom. 160 p.
- Brunt AA., Crabtree K., Dallwitz J., Gibbs MJ., Watson AL., Zurcher JE. 1996. Tobamoviruses. Plant Viruses Online: description and Lists from the VIDE database. 16th January 1997.
- Buée M., De Boer W., Martin F., van Overbeek L., Jurkevitch E. 2009. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. Plant Soil. 321:189–212.
- Campbell RN. 1996. Fungal transmission of plant viruses. Annual Review Phytopathology. 34:87–108.
- Cao Y. 1994. Flora of China. *Nicotiana* Linnaeus. 17: 331–332. Accessed online: <http://flora.huh.harvard.edu/china/PDF/PDF17/nicotiana.pdf>. (Consultado, 15 de abril, 2013).
- Carlsen SCK., Understrup A., Fomsgaard IS., Mortensen AG., Ravnskov S. 2008. Flavonoids in roots of white clover: interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and a pathogenic fungus. Plant Soil. 302: 33-43.
- Cartmill AD., Alarcón A., Valdez-Aguilar LA. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance tolerance of *Rosa multiflora* cv. Burr to bicarbonate in irrigation water. Journal of Plant Nutrition. 30: 1517-1540.
- Charitha DM., Reddy MN. 2002. Phenolic acid metabolism of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) plants inoculated with VAM fungus and *Rhizobium*. Plant Growth Regulation. 37: 151-156.

- Clover GRG., Ratti C., Rubies-Autonell C., Henry CM. 2002. Detection of European isolates of *Oat mosaic virus*. *European Journal of Plant Pathology* 108: 87–91.
- Congressional Research Service. 2003. U.S. Tobacco Production, Consumption, and Export Trends. Report for Congress prepared by Jasper Womach, Agriculture Policy Specialist Resources, Science, and Industry Division, Congressional Research Service, Library of Congress. Accessed 27 June 2012 online: <http://www.nationalaglawcenter.org/assets/crs/RL30947.pdf>. (Consultado, 15 de abril, 2013).
- Cruz Y., García M., León Y., Hernández J. 2012. Influencia de las micorrizas arbusculares en combinación con diferentes dosis de fertilizante mineral en algunas características morfológicas de las plántulas de tabaco. *Cultivos Tropicales*. 33: 23-26.
- Daft MJ., Okusanya BO. 1973. Effect of *Endogone* mycorrhiza on plant growth. V. Influence of infection on the multiplication of viruses in tomato, petunia and strawberry. *New Phytologist*. 72:975–983.
- D'Ambria V., Mutto S. 1976. The ultrastructure of *Polymyxa betae* zoospore exit-tube differentiation. *Canadian Journal of Botany*. 55:831-839.
- Davies FT., Porter JR., Linderman, RG. 1993. Drought resistance of micorrhizal pepper plants – Independent of leaf phosphorus concentration, response in gas exchange and water relations. *Plant Physiology* 87: 45-53.
- Dawson WO., Bubrick P., Grantham GL. 1988. Modifications of the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. *Phytopathology*. 78:783-789.

- De La Torre-Almaraz R., Salazar-Segura M., Ruiz-Medrano R. 2007. Ocurrencia de un tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia*. 41: 763-773.
- Dehne HW. 1982. Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72:1115-1119.
- Dere S., Günes T., Sivaci R. 1998. Spectrophotometric determination of chlorophyll a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*. 22:13-17.
- Douds DD., Millner PD. 1999. Biodiversity of arbuscular mycorrhizal fungi in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74:77-93.
- Driskel BA., Hunger RM., Payton ME., Verchot-Lubicz J. 2002. Response of hard red winter wheat to *Soilborne wheat mosaic virus* using novel inoculations methods. *Phytopathology*. 92: 347-354.
- Esquinas-Alcazar J., Nuez VF. 2001. Situación taxonómica, domesticación y difusión del tomate. *In: El cultivo del tomate*. Nuez, F. (Ed.). Ediciones Mundi-Prensa. Pp. 13-42.
- Fodor J., Gullner G., Adam A., Barna B., Kömives T., Király Z. 1997. Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco. *Plant Physiologist*. 114: 1443-1451.
- Fritz M., Jakobsen I., Lyngkjaer M. F., Thordal-Christensen H., Pons-Kuehnemann J. 2006. Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*. *Mycorrhiza*. 16:413-419.

- García-Arenal F., García JA. 1994. Estructura y expresión del genoma de los virus de las plantas. *In: Patología Vegetal. Tomo I. Pp: 37-73.* Eds. Llácer G., López M. M., Trapero A. y Bello A. Sociedad Española de Fitopatología. Ed. M. V. Phytomas-España. 695 p.
- Gargouri R., Joshi RL., Bol JF., Astier-Manifacier S., Haenni AL. 1989. Mechanism of synthesis of turnip yellow mosaic virus coat protein subgenomic RNA *in vivo*. *Virology.* 171: 386-393.
- Garza LJ. 1985. Las hortalizas cultivadas en México, características botánicas. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 4 p.
- Gera A., Deom CM., Donson J., Shaw JJ., Lewandowski DJ., Dawson WO. 1995. Tobacco mosaic tobamovirus does not require concomitant synthesis of movement protein during vascular transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* 8: 784-787.
- Gerdemann JW., Trappe JM. 1974. Endogonaceae in the Pacific Northwest. *Mycologia Memoirs.* 5: 1-76.
- Gernns H, von Alten H, Poehling HM. 2001. Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen — Is a compensation possible? *Mycorrhiza.* 11: 237-243.
- Giovanetti M., Sbrana C. 1998. Meeting a non-host: the behavior of AM fungi. *Mycorrhiza,* 8: 123-130.
- Gómez-Guiñán Y. 2004. Actividad de las fosfatasas ácidas y alcalinas (extracelulares e intracelulares) en hongos de la rizosfera de *Arachis hypogaea* (Papilionaceae). *Revista de Biología Tropical.* 52: 287-295.

- González-Chávez MC. 1993. La endomicorriza vesículo-arbuscular. *In*: Manual de agromicrobiología. Ferrera-Cerrato R., González-Chávez M. C., Rodríguez-Mendoza MN. Editorial Trillas. Pp. 53-91.
- Goodman RN., Kiraly Z., Zaitlin M. 1967. The biochemistry and physiology of infections plant disease. Eds. D. Van Nostrand, Company Inc., Princeton, New Jersey. Pp 354.
- Gou BZ., An ZQ., Hendrix JW. 1994. A mycorrhizal pathogen (*Glomus macrocarpum* Tul. & Tul.) of tobacco: effects of long- and short-term cropping on the mycorrhizal fungal community and stunt disease. *Applied Soil Ecology*. 1:269-276.
- Harborne J.B. 1998. Phytochemical methods, a guide to modern techniques of plant analysis. 3rd ed. Chapman and Hall. London, UK pp. 227-234.
- Harley JL., Smith SE. 1983. Mycorrhizal Symbiosis. Academic, London.
- Harrison MJ., Dixon RA. 1993. Isoflavonoid accumulation and expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 6: 643-654.
- Hartwright LM., Hunter PJ., Walsh JA. 2010. A comparison of *Olpidium* isolates from a range of host plants using internal transcribed spacer sequence analysis and host range studies. *Fungal Biology*. 114: 26 – 33.
- Henry CM. 1996. Rhizomania – its effect on sugar beet in the UK. *British Sugar Beet Review*. 69: 24–26.
- Hewitt EJ. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Tech. Commun.* 22. Commonwealth Agricultural Bureau. Farnham, United Kingdom. pp: 187-246.

- Hiruki C. 1967. Host specificity in transmission of *Tobacco stunt virus* by *Olpidium brassicae*. *Virology* 33:131-136.
- Hull, R. 2002. *Matthews' Plant Virology*. 4th Ed. Academic Press. Great Britain. 1001 p.
- Jabaji-Hare SH., Stobbs LW. 1984. Electron microscopic examination of tomato roots infected with *Glomus* sp. and *Tobacco mosaic virus*. *Phytopathology*. 74: 277-279.
- Jacobi V., Peerenboom E., Schenk PM., Antoniw JF., Steinbiss HH., Adams MJ. 1995. Cloning and sequence analysis of RNA-2 of a mechanically transmitted UK isolate of *Barley mild mosaic bymovirus* (BaMMV). *Virus Research*. 37:99-111.
- Johansson F., Paul L., Finlay R. 2004. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. Federation of European Microbiological Societies, *Microbiology Ecology*. 48: 1-13.
- Jones RAC. 2006. Control of plant virus diseases. *Advances in Virus Research*. 67: 205-244.
- Kanyuca K., Ward E., Adams M. 2003. *Polymyxa graminis* and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Molecular Plant Pathology*. 4:393–406.
- Kanyuka K., McGrann G., Alhudaib K., Hariri D. Adams MJ. 2004. Biological and sequence analysis of a novel European isolate of *Barley mild mosaic virus* that overcomes the barley *rym5* resistance gene. *Archives of Virology* 149: 1469–1480
- Karagiannidis N., Bletsos F., Stavropoulos N. 2002. Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. *Scientia Horticulturae*. 94: 145-156.

- Karp G. 1998. *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. McGraw-Hill Interamericana. México, D. F. 746 p.
- Kennelly M. 2007. Wilt, nematode, and virus Diseases of tomato. *Plant Pathologist*. Department of Plant Pathology. K-State Research and Extension, Publication L-723. <http://www.ksre.ksu.edu/library/plant2/1723.pdf>. Consultado, 15 de abril, 2013.
- Kim NR., Hong JS., Song YS., Chung BN., Park JW., Ryu KH. 2012. The complete genome sequence of a member of a new species of tobamovirus (rattail cactus necrosis-associated virus) isolated from *Aporcactus flagelliformis*. *Archives of Virology*. 157: 185–187.
- Koide RT., Goff MD., Dickie IA. 2000. Component growth efficiencies of mycorrhizal and nonmycorrhizal plants. *New Phytologist* 148:163-168.
- Krämer S., Green DM. 2000. Acid and alkaline phosphatase dynamics and their relationship to soil microclimate in a semiarid woodland. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 179-188.
- Krishna KR. 1981. Studies on the mechanism of improved plant growth due to vesicular-arbuscular mycorrhiza. PhD Dissertation, University of Agricultural Sciences, Bangalore. India, 139 p.
- Kuga Y., Saito K., Nayuki K., Peterson R.L., Saito M. 2008. Ultrastructure of rapidly frozen and freeze-substituted germ tubes of an arbuscular mycorrhizal fungus and localization of polyphosphate. *New Phytologist* 178: 189–200.
- Lehto K., Tikkanen M., Hiriart J-B., Paakkari V., Aro E-M. 2003. Depletion of the photosystem II core complex in mature tobacco leaves infected by the *flavum* strain of *Tobacco mosaic virus*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*. 16:1135-1144.

- Letcher PM., Powell MJ., Barr DJ., Churchill PF., Wakefield WS., Picard KT. 2008. Rhizophlyctidales - is a new order in Chytridiomycota. *Mycological Research*. 112: 1031-1048.
- Letcher PM., Powell MJ., Chambers JG., Longcore JE., Churchill PF., Harris PM. 2005. Ultrastructural and molecular analysis of the Chytridiaceae (Chytridiales). *Canadian Journal of Botany*. 83: 1561-1573.
- Letcher PM., Powell MJ., Churchill PE., Chambers JG. 2006. Ultrastructural and molecular phylogenetic delineation of a new order, the Rhizophydiales (Chytridiomycota). *Mycological Research*. 110: 898-915.
- Lewandowski DJ. 2000. Tobamovirus. Pp. 889-894. In: van Regenmortel MHV., Fauquet CM., Bishop DHL., Carstens EB., Estes MK., Lemon SM., Maniloff J., Mayo MA., McGeoch DJ., Pringle CR., Wickner RB. (eds.), *Virus Taxonomy – Classification and Nomenclature of Viruses, 7th Report of the ICTV*, Academic Press, San Diego.
- Li M., Osaki M., Honma M., Tadano T. 1997. Purification and characterization of phytase induced in tomato roots under phosphorus deficient conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*. 43: 179-190.
- Linderman RG. 1994. Role of VAM fungi in biocontrol. Pp. 1-27. *In: Mycorrhizae and Plant Health*. Pflieger FL., Linderman RG., (Eds.) American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Lingua G., D'Agostino G., Massa N., Antosiano M., Berta G. 2002. Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. *Mycorrhiza*. 12: 191–198.

- Littlefield LJ., Delfosse P., Whallon J. H., Hassan ZM., Sherwood JL., Reddy DV. 1997. Anatomy of sporosori of *Polymyxa graminis*, the vector of Indian peanut clump virus in roots of *Sorghum bicolor*. Canadian Journal of Plant Pathology 19:281-288.
- Littlefield LJ., Whallon JH., Doss PJ., Hassan ZM. 1998. Postinfection development of *Polymyxa graminis* in roots of *Triticum aestivum*. Mycologia 90:869-882.
- Liu J, Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town CD., Harrison MJ. 2007. 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.
- Lot H., Campbell RN., Souche S., Milne RG., Roggero P. 2002. Transmission by *Olpidium brassicae* of *Mirafiori lettuce virus* and *Lettuce big-vein virus*, and their roles in lettuce big-vein etiology. Phytopathology. 92:288–293.
- Lovera M, Cuenca G. 2007. Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y potencial micorrízico del suelo de una sabana natural y una sabana perturbada de la Gran Sabana, Venezuela. Interciencia. 32: 108-114.
- Lucas GB., Hare WW. 1959. The inhibition of tobacco mosaic virus by proteins from bovine milk and blood serum. Phytopathology. 49:544-545.
- Lucas WJ., Olesinski AA., Hull RJ., Haudenshield J., Deom CM., Beachy RN., Wolf S. 1993. Influence of the tobacco mosaic virus 30-kDa movement protein on carbon metabolism and photosynthate partitioning in transgenic tobacco plants. Planta 19: 88-96.
- Maksimov IV. 2009. Abscisic acid in the plants–pathogen interaction. Russian Journal of Plant Physiology. 56: 742–752.

- Mallor C., Luis-Arteaga M., Álvarez J. M., Montaner C. Floris E. 2006. Resistance to melon necrotic spot virus in *Cucumis melo* L. 'Doublon' artificially inoculated by the fungus vector *Olpidium bornovanus*. *Crop Protection*. 25: 426-431.
- Mallora C., Luis-Arteaga M., Alvarez J., Montaner C., Floris E. 2006. Resistance to Melon necrotic spot virus in *Cucumis melo* L. 'Doublon' artificially inoculated by the fungus vector *Olpidium bornovanus*. *Crop Protection* 25:426–431.
- Martínez GE.; Barrios Sanromá G.; Rovesti L., Santos Palma R. 2006. Manejo Integrado de Plagas. Manual Práctico. Centro Nacional de Sanidad Vegetal (CNSV), Cuba. Pp. 1.
- Matthäus B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 3444-3452.
- Merz U., Walsh JA., Bouchek-Mechiche K., Oberhänsli Th., Bitterlin W. 2005. Improved immunological detection of *Spongospora subterranea*. *European Journal of Plant Pathology*. 111:371–379.
- Micheli A., Izaguirre-Ávila R. 2005. Tabaco y tabaquismo en la historia de México y de Europa. *Revista de Investigación Clínica*. 57: 608-613.
- Mochizuki R., Ohnishi J., Ohki T., Kanda A. Tsuda S. 2008. Amino acid substitution in the coat protein of Melon necrotic spot virus causes loss of binding to the surface of *Olpidium bornovanus* zoospores. *Journal of General Plant Pathology*. 74:176–181.
- Modjo HS., Hendrix JW., Nesmith WC. 1987. Mycorrhizal fungi in relation to control of tobacco stunt disease with soil fumigants. *Soil Biology and Biochemistry*. 19: 289-295.
- Monger WA., Clover GRG. Foster GD. 2001. Molecular identification of *Oat mosaic virus* as a *Bymovirus*. *European Journal of Plant Pathology*. 107: 661–666.

- Moriones E., Luis M. 1994. Métodos de control de las virosis. *In*: Patología Vegetal. Tomo I. Pp: 333-377. Eds. Llácer G., López M. M., Trapero A. y Bello A. Sociedad Española de Fitopatología. Ed. M. V. Phytomas-España. 695 p.
- Morton JB. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature and identification. *Mycotaxon*. 32: 267-324.
- Namba K., Pattanayek R., Stubbs G. 1989. Visualization of protein-nucleic acid interactions in a virus. Refined structure of intact tobacco mosaic virus at 2.9 Å resolution by X-ray fiber diffraction. *Journal of Molecular Biology*. 208: 307-325.
- Navarro JA., Botella F., Marhuenda A., Sastre P., Sánchez-Pina A. M., Pallas V. 2005. Identification and partial characterisation of *Lettuce big-vein associated virus* and *Mirafiori lettuce big-vein virus* in common weeds found amongst Spanish lettuce crops and their role in lettuce big-vein disease transmission. *European Journal of Plant Pathology* 113:25–34.
- Nielsen SL., Larsen J. 2004. Two *Trichoderma harzianum*-based bio-control agents reduce tomato root infection with *Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh., f. sp. *subterranea*, the vector of *Potato mop-top virus*. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 111: 145-150.
- Okubara PA., Paulitz TC. 2005. Root defense responses to fungal pathogens: A molecular perspective. *Plant Soil* 274:215–226.
- Pearse AGE. 1968. *Histochemistry: theoretical and applied*. Churchill Livingstone: London.
- Peerenboom E., Jacobi V., Antoniw JF., Schlichter U., Cartwright EJ., Steinbiss HH., Adams MJ. 1996. The complete nucleotide sequence of RNA-2 of a fungally-

- transmitted UK isolate of barley mild mosaic bymovirus and identification of amino acid combinations possibly involved in fungus transmission. *Virus Research* 40:149-159.
- Peipp H., Maier W., Schmidt J., Wray V., Strack D. 1997. Arbuscular mycorrhizal fungus induced changes in the accumulation of secondary compounds in barley roots. *Phytochemistry*. 44: 581-587.
- Peterson L., Massicote H., Melvi-Lle L. 2004. *Mycorrhizas: Anatomy and cell biology*. Ottawa: NRC Research press. 173.
- Phillips JM., Hayman DS. 1970. Improved procedures for cleaning roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* 55:158-161.
- Porcel R., Barea JM., Ruiz-Lozano JM. 2003. Antioxidant activities in mycorrhizal soybean plants under drought stress and their possible relationship to the process of nodule senescence. *New Phytologist*. 157:135-143.
- Pozo M., Azcon-Aguilar C. 2007. Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:393–398.
- Qiang-Sheng W., Ying-Ning Z., Ren-Xue X., Ming-Yuan W. 2007. Five *Glomus* species affect water relations of *Citrus tangerine* during drought stress. *Botanical Studies*. 48: 147-154.
- Quilambo O. 2003. The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal Biotechnology*, 2: 539-546.

- Rahoutei J., Garcia-Luque I., Baron M. 2000. Inhibition of photosynthesis by viral infection: Effect on PSII structure and function. *Physiologia Plantarum*. 110: 286-292.
- Ramírez GM., Rodríguez A. 2012. Mecanismos de defensa y respuestas de las plantas en la interacción micorrícica: una revisión. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 14: 271-284.
- Ratti C., Budge G., Ward L., Clover G., Rubies-Autonell C. Henry C. 2004. Detection and relative quantitation of *Soil-borne cereal mosaic virus* (SBCMV) and *Polymyxa graminis* in winter wheat using real-time PCR (TaqMan®). *Journal of Virological Methods* 122:95–103.
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 26:1231-1237.
- Reavy B., Arif M., Cowan GH., Torrance L. 1998. Association of sequences in the coat protein/readthrough domain of potato mop-top virus with transmission by *Spongospora subterranea*. *Journal of General Virology* 79: 2343–2347.
- Redecker D., Morton JB., Bruns TD. 2000. Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 276-284.
- Reinert RA., Rufty RC., Eason G. 1988. Interaction of *Tobacco etch* or *Tobacco vein mottling virus* and ozone on biomass changes in Burley tobacco. *Environmental Pollution*. 53: 209-218.

- Rochon D., Kakani K., Robbins M., Reade R. 2004. Molecular aspects of plant virus transmission by *Olpidium* and *Plasmodiophorid* vectors. *Annual Review of Phytopathology* 42:211–241
- Rodríguez RR., Tabares JM., Medina San Juan J. 2001. Cultivo moderno del tomate. 2ª. Ed. Ediciones Mundi-Prensa. España. 255 p.
- Roncadori RW. 1997. Interactions between arbuscular mycorrhizas and plant parasitic nematodos in agro-ecosystems. *In: Multitrophic interactions in terrestrial systems.* A. C. Gange, and V. K. Brown (Eds.). Oxford: Blackwell Science, pp. 101-113.
- Rush CM. 2003. Ecology and epidemiology of *benyvirus*es and plasmodiophorid vectors. *Annual Review Phytopathology* 41:567–592.
- Sachse C., Chen JZ., Coureux PD., Stroupe ME., Fandrich M., Grigorieff N. 2007. High-resolution electron microscopy of helical specimens: a fresh look at tobacco mosaic virus. *Journal of Molecular Biology.* 371: 812-835.
- SAS Institute Inc. 2002. The SAS system for windows, version 9.0. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina. USA.
- Sasaya T., Koganezawa H. 2006. Molecular analysis and virus transmission tests place *Olpidium virulentus*, a vector of *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Tobacco stunt virus*, as a distinct species rather than a strain of *Olpidium brassicae*. *Journal of General Plant Pathology.* 72:20–25.
- Sayama M., Momota Y., Takenaka S. 2006. Fluorescent staining of resting spores of *Polymyxa betae* as a fungal vector of rhizomania disease of sugar beet in soil. *Journal of General Plant Pathology* 72:190–192.

- Scholthof K-B. 2000. Lessons in plant pathology: tobacco mosaic virus. The Plant Health Instructor. Available at <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TobaccoMosaic.aspx>. Consultado 15 de enero, 2013.
- Scholthof K-B., Adkins S., Czosnek H., Palukaitis P., Jacquot E., Hohn T., Hohn B., Saunders K., Candresse T., Ahlquist P., Hemenway C., Foster G. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 12: 938-954.
- Schönbeck F., Dehne HW. 1979. The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. 4. Fungal parasites on aerial plant parts, *Oidium brassicae*, TMV. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz*. 86: 103-107.
- Schonbeck F., Dehne HW. 1981. Mycorrhiza and plant health. *Gesunde pflanzen*, 33:186-190.
- Schönbeck F., Spengler G. 1979. Detection of TMV in mycorrhizal containing cells of the tomato using the immunofluorescence. *Phytopathologische Zeitschrift*. 94: 84-86.
- Schüßler A., Schwarzott D. Walker C. 2001. A new phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105: 1413–1421.
- Schüßler A., Walker C. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester, England. Electronic version freely available online at: www.amf-phylogeny.com. 22 de noviembre, 2012.
- 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*. 12:1000-1007.

- Sidney LS. 2012. A history of the taxonomy and systematics of arbuscular mycorrhizal fungi belonging to the phylum Glomeromycota. *Mycorrhiza*. 22:247–258.
- Simmons D. R., James T. Y., Meyer A. F., Longcore J. E. 2008. Lobulomycetales, a new order in the Chytridiomycota. *Mycological Research*. 113: 450-460.
- Šindelářová M., Šindelář L., Wilhelmová N., Procházková D. 2005. Changes in key enzymes of viral-RNA biosynthesis in chloroplasts from PVY and TMV infected tobacco plants. *Biologia Plantarum*. 49: 471-474.
- Singleton VL., Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16:144-147.
- Smith SE., Read DJ. 1997. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic Press, San Diego, CA. 605 p.
- Song YS., Min BE., Hong JS., Rhie MJ., Kim MJ., Ryu KH. 2006. Molecular evidence supporting the confirmation of Maracuja mosaic virus as a species of the genus *Tobamovirus* and production of an infectious cDNA transcript. *Archives of Virology*. 151: 2337-2348.
- Soong Y-Y., Barlow PJ. 2004. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chemistry*. 88:411-417.
- St-Arnaud, M. and V. Vujanovic. 2007. Effects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis on plant diseases and pests. *In: Mycorrhizae in crop production*. Hamel, C. y C. Plenchette (Eds.). 67-122 pp. Ed. Haworth Food and Agricultural Products Press. Binghampton, New York, USA.

- Stürmer LS., Bellei MM. 1994. Composition and seasonal variation of spore populations of arbuscular mycorrhizal fungi in dune soils on the island of Santa Catalina, Brazil. *Canadian Journal of Botany*. 72: 359-363.
- Tabatabai MA. 1982. Soil enzymes. In: Page AL, Miller RH, Keeney DR (Eds). *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and Microbiological properties. Second edition. Agronomy*). ASA-SSSA Publishers. Madison, Wisconsin. USA. Pp: 903-947.
- Tahat MM., Kamaruzaman S., Radziah O., Kadir J., Masdek HN. 2008. Response of (*Lycopersicum esculentum* Mill.) to different arbuscular mycorrhizal fungi species. *Asian journal of plant sciences*. 7: 479-484.
- Tarafdar JC., Claassen N. 1988. Organic phosphorus compounds as a phosphorus source for higher plants through the activity of phosphatase produced by plant roots and microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 5: 308-312.
- That MM, Kamaruzaman S., Othman, R. 2010. Mycorrhizal fungi as a biocontrol agent. *Plant Pathology Journal*. 9: 198-207.
- Tisserant B., Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S., Gollotte A. 1993. *In: planta* histochemical staining of fungal alkaline phosphatase activity for analysis of efficient arbuscular mycorrhizal infections. *Mycological Research*. 97:245-250.
- Tolin SA. 2008. Tobacco viruses. *In: Encyclopedia of Virology*. Pp. 60-67.
- Treseder KK., Allen MF. 2000. Mycorrhizal fungi have a potential role in soil carbon storage under elevated CO₂ and nitrogen deposition. *New Phytologist* 147:189-200.
- Trotta A., Varese GC., Gnani E., Fusconi A., Sampo S., Berta G. 1996. Interactions between the soil-borne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and

- the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants. *Plant Soil*. 185: 199–209.
- Usugi T., Kashiwazaki S., Omura T., Tsuchizaki T. 1989. Some properties of nucleic acids and coat proteins of soil-borne filamentous viruses. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 55: 26-31.
- Vaira AM., Milne RG. 2008. Ophiovirus. *In: Encyclopedia of Virology*. Pp. 447-454
- Valadez LA. 1998. Producción de hortalizas. Ed. Limusa. 298 p.
- Van Der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, Wiemken A, Sanders IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72.
- Van Geyt JPC, Lange W, Oleo M, De Bock ThSM. 1990. Natural variation within the genus *Beta* and its possible use for breeding sugar beet: a review. *Euphytica* 49:57–76.
- Van Hoof L. 2011. Tobacco. http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/vanhoof_loge/classification.htm. Consultado, 10 de abril, 2013.
- Van Loon, L. C. 1985. Pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*. 4: 111-116.
- Varela L., Trejo D. 2001. Los hongos micorrizógenos arbusculares como componentes de la biodiversidad del suelo en México. *Acta Zoologica México* 1:39-51.
- Vasanthakrishna M., Bagyaraj DJ. 1993. Selection of efficient VA mycorrhizal fungi for inoculation *Casuarina equisetifolia*. *Arid Soil Research and Rehabilitation*. 7: 377-380.

- Vela A. 1972. Una estirpe del virus del mosaico del tabaco procedente de *Digitalis thapsi* L. *Microbiología Española*. 25: 211-224.
- Verchot J., Driskel BA., Zhu Y., Hunger RM. Littlefield LJ. 2001. Evidence that soilborne wheat mosaic virus moves long distance through the xylem in wheat. *Protoplasma* 218: 57-66.
- Verchot-Lubicz J. 2003. Soilborne viruses: advances in virus movement, virus induced gene silencing, and engineered resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 62: 55–63.
- Verchot-Lubicz J., Rush CM., Payton M. Colberg T. 2007. *Beet necrotic yellow vein virus* accumulates inside resting spores and zoosporangia of its vector *Polymyxa betae* *BNYVV* infects *P. betae*. *Virology Journal Research* 4:37.
- Vianello I. y Sobrado M. 1991. Respuestas contrastantes del maíz tropical ante la sequía en el período vegetativo o reproductivo. *Turrialba* 41: 403-411.
- Vierheilig H. 2004. Regulatory mechanisms during the plant - Arbuscular mycorrhizal fungus interaction. *Canadian Journal of Botany*. 82: 1166-1176.
- Vosátka M., Albrechtová J. 2009. Benefits of arbuscular mycorrhizal fungi to sustainable crop production. In: *Microbial strategies for crop improvement*. Khan, M.S., Zaidi, A. Musarrat, J. (Eds.), Springer Verlag Berlin Heidelberg. Pp. 205-225.
- Walker C. 1992. Systematics and taxonomy of the arbuscular endomycorrhizal fungi (Glomales) a possible way forward. *Agronomie* 12: 887-897.
- Westover K., Kennedy A., Kellys S. 1997. Patterns of rizosphere microbial community structure associated with co-occurring plant species. *Journal of Ecology*. 85: 863-873.

- Whipps JM. 2004. Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*. 82:1198-1227.
- Wolf S., Millatiner A. 2000. Effect of *Tobacco mosaic virus* movement protein on photosynthesis in transgenic tobacco plants. *Journal of Plant Physiology*. 156:253-258.
- Wright IJ., Cannon K. 2001. Relationships between leaf lifespan and structural defences in a low-nutrient sclerophyll flora. *Functional Ecology*. 15: 351-359.
- Young MI. 1998. Biophysical interactions at the root-soil interface: a review. *Journal of Agricultural Science Cambridge*. 130: 1-7.
- Zaitlin M, Hull R. 1987. Plant virus-host interactions. *Annual Review Plant Physiology*. 38: 291–315.
- Zaitlin M. 1998. The discovery of the causal agent of the tobacco mosaic disease. *In: Plant Biology*. Kung SD, and Yang SF. (eds). World Publishing Co., Ltd. Hong Kong.pp.: 105-110.
- Zein SN., El-khalik A., Samaa K., Eman AAH., Azzam CR. 2012. Characterization of *Tobacco mosaic tobamovirus* (TMV-S) isolated from sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Egypt. *International Journal of Virology*. 8: 27-38.

APÉNDICE I

Cuadro AI-1.1. Composición de la solución Long Ashton modificada (Capítulo IV y V).

Solución “stock”	Cantidad de reactivo en peso (g L ⁻¹)	Cantidad de solución stock para preparar 1L (mL)
KNO ₃	80.0	5.0
MgSO ₄ 7H ₂ O	73.6	5.0
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	188.8	5.0
NaH ₂ PO ₄ 4H ₂ O	36.8	1.34 para 11 µg mL ⁻¹
Elementos traza		1.0
Solución de citratos (Se adiciona antes de la fertilización)		5.0

Solución “stock” elementos traza

- Aforar a 1000 mL con agua destilada

MnSO ₄ H ₂ O	1.69
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.29
H ₃ BO ₃	3.10
NaCl	5.90
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0.088

Solución stock de citratos:

- Aforar a 1000 mL con agua desionizada destilada.
- Agitar por unos minutos y llevar a autoclave para completa la disolución.
- Almacenar en refrigeración.

Citrato férrico (FeC ₆ H ₅ O ₇)	4.9
Ácido cítrico (H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ H ₂ O)	4.9

Hewitt (1966)



Figura AI-1.2. Buffer de inoculación y carborundum para la infección vía mecánica del *Tobacco mosaic virus* (TMV) en plantas de jitomate.



Figura AI-1.3. Plantas de jitomate (*Lycopersicon esculentum* L.) infectadas con el TMV. A) Plantas de jitomate a los 15 días; B) hoja con TMV a los 40 días.



Figura AI-1.4. Plantas de jitomate a los 40 días después de la infección con el TMV; 1 = Planta con *Rhizophagus intraradices* y con TMV; 2 = Planta con TMV; 3 = Planta con *R. intraradices*; 4 = Planta testigo.

APÉNDICE II



Figura AII-2.1. Plantas de tabaco. A-1) Tratamiento 1: Compartimento A y B, plantas inoculadas con el consorcio de HMA, con puente de suelo; A-2) Tratamiento 2: Compartimento A y B, plantas inoculadas con *Rhizophagus intraradices*, con puente de suelo; A-3) Tratamiento 3: -Compartimento A y B, plantas testigo, sin inoculación de HMA y sin TMV, con puente de suelo; B-1) Tratamiento 4: Compartimento A, plantas inoculadas con el consorciode HMA e infectadas con el TMV; Compartimento B, plantas inoculadas con el consorciode HMA, con puente de suelo; B-2) Tratamiento 5: Compartimento A, plantas inoculadas con *R. intraradices* e infectadas con el TMV, Compartimento B, plantas inoculadas con *R. intraradices*, con puente; B-3) Tratamiento 6: Compartimento A y B plantas infectadas con el TMV, con puente de suelo.