



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Identificación de virus en plantas silvestres de tetecho (*Neobuxbaumia tetetzo* F.A.C. Weber. Backeb) por transcriptómica (RNA-Seq)

TESIS

Que para obtener el título de Bióloga



P R E S E N T A

Michelle Leonel Vertiz

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y a La Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por todo el aprendizaje, formación académica y crecimiento personal e intelectual.
- A mi tutor Dr. Rodolfo de la Torre Almaráz por su asesoría, apoyo, comentarios y recomendaciones. Por todas las enseñanzas. Gracias.
- A los miembros del Jurado: Dr. Jorge E. Campos Contreras, Dra. Martha Martínez García, Dr. Saúl Flores Maya y M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes por sus comentarios, tiempo y sugerencias.
- A mis compañeros de laboratorio: Héctor y Cynthia por los buenos momentos, el apoyo y enseñanzas que me han brindado. Los quiero.
- A Sara, Karla, Estefania, Giovanna y Rocio. Ustedes fueron el motor que me impulso muchos días en la carrera, hicieron de mi vida esos años, algo muy ameno.
- A David, la persona de la que he recibido más apoyo durante los últimos años en la carrera y en mi vida, me has hecho muy feliz. Gracias “Paqui”.
- A Tony, eres mi mejor amigo, siempre me pregunto qué habría sido de mi sin tu apoyo y lo más probable es que no me sentiría tan plena como ahora. Te quiero mucho.
- A Seldon, la Fundación estará observando. Gracias por dejarme trascender contigo, aunque fuera por un momento tan breve.
- A Kahli, En la vastedad del espacio y en la inmensidad del tiempo, mi alegría fue compartir un planeta y una época contigo”. Te amo. Gracias por darme tantas razones para ser feliz.

Dedicatoria

Esta tesis va dedicada a mis más grandes amores; a mi madre Leticia, a mi padre Armando, a mi abuela Josefina y a mis hermanas Estefania y Thalia, ustedes son mi apoyo incondicional, son mi fuerza, son la razón por la cual hoy puedo decir que he cumplido una meta en mi vida. Los amo.

Por todo el amor, con respeto y cariño les digo gracias.

Michelle.

Índice

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
REVISIÓN DE LITERATURA	10
Características generales de los virus	10
Definición de virus.....	10
Clasificación taxonómica.....	11
Características e identificación de virus de plantas	11
Morfología de las partículas virales	11
Detección de virus y agentes virales	12
La secuenciación masiva como herramienta para la detección de virus.....	13
La RNAseq para la detección de virus en plantas	13
Virus reportados en Cactáceas	14
Virus reportados en Cactáceas en México	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Recolecta de material	16
Extracción y análisis electroforético de ARN de doble cadena de origen viral	16
Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) 16	
RT- PCR para <i>Potexvirus</i>	17
RT- PCR para <i>Tobamovirus</i>	18
RT- PCR para <i>Nucleorhabdovirus</i>	19
Secuenciación de productos de la RT-PCR	19
Secuenciación Masiva de RNAseq de muestra de N. tetetzo	20
Evaluación y Análisis de Secuencias	20
RESULTADOS	21
Extracción y análisis electroforético de ARN de doble cadena de origen viral	21
Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa	22
RT- PCR para <i>Tobamovirus</i>	22
RT- PCR para <i>Potexvirus</i>	23
RT- PCR para <i>Nucleorhabdovirus</i>	23
Secuenciación, análisis y comparación nucleotídica del genoma viral con secuencias disponibles en el GenBank.	23
Secuenciación Masiva de RNAseq de muestra de N. tetetzo	25

DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	34
PERSPECTIVAS	34
LITERATURA CITADA	36

Lista de Cuadros y Figuras

Cuadro 1. Secuencias de oligonucleótidos específicos utilizados para los ensayos de RT-PCR de la CP de tres especies de <i>Potexvirus</i> presentes en otras cactáceas.....	17
Figura 1. Daños de manchado clorótico en tallo de <i>Neobuxbaumia tetetzo</i>	10
Figura 2. Tipos de morfologías de las cápsides proteicas de virus de plantas.....	12
Figura 3. Análisis electroforético de muestras de tetecho para la detección de ARNdc en gel de poliacrilamida.....	21
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% de RT-PCR de muestras de <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> para detectar <i>Tobamovirus</i>	22
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% de RT-PCR de muestras de <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> para detectar RCNaV.....	22
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1% de RT-PCR de muestras de <i>Neobuxbaumia tetetzo</i> para detectar <i>Nucleorhabdovirus</i>	23
Figura 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (1500 réplicas), para gen de RdRp en <i>Tobamovirus</i>	24
Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (1000 réplicas), para genomas completos.....	26
Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para el gen de la RdRp.....	27
Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para el gen de la CP.....	28
Figura 11. Esquema de la composición genómica de <i>Tobamovirus</i>	30
Figura 12. Esquema de la composición genómica de <i>Nucleorhabdovirus</i>	31

Glosario de Abreviaciones

ADNc: ADN complementario.

ARNm: ARN mensajero

ARNdc: ARN de doble cadena.

CP: (Coat Protein) Proteína de la cápside

CMMoV: *Cactus mild mottle virus*

CMV: *Cucumber mosaic virus*

CVX: *Cactus virus x*

DAS-ELISA: (Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Ensayo Por inmuoadsorcion ligado a enzimas de sándwich de doble anticuerpo

OpVX: *Opuntia virus x*

ORF: (Open Read Frame) marco de lectura abierto

RCNaV: *Rattail cactus necrosis-associated virus*

RdRp: (RNA-dependent RNA-Polimerase) ARN Polimerasa dependiente de ARN

RNAs: (RNA small) ARN pequeño

RT-PCR: (Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction), Reacción en cadena de la Polimerasa asociado a transcriptasa reversa

SchVX: *Schlumbergera virus x*

SOV: *Sammons Opuntia virus*

TMV: *Tobacco mosaic virus*

ZyVX: *Zygocactus virus x*

Resumen

En recorridos por la Reserva de La Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla se han observado plantas de *Neobuxbaumia tetetzo* con la presencia de manchas anulares de naturaleza clorótica, síntomas similares a los causados por virus. Este tipo de daños puede ser observado de manera frecuente en numerosas plantas de la especie. En estudios preliminares se probó la presencia de virus en estas plantas con ensayos de transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), si bien estos ensayos fueron positivos, se sospecha la presencia de un complejo viral de más componentes. Por lo que los objetivos del trabajo fueron identificar y caracterizar a los virus presentes, probablemente asociados al manchado clorótico en *N. tetetzo* con la técnica de RT-PCR y la secuenciación masiva dirigida ARNm o RNAseq. Ensayos de RT-PCR para el gen de la RdRp de *Tobamovirus* rindieron amplicones en el tamaño esperado, la secuenciación nucleotídica parcial de los productos indicó más de 95% de identidad con secuencias de virus reportados en otras especies (RCNaV y Tobamovirus 2) en el GenBank. En base a los anteriores resultados y la posible mezcla de virus en las muestras de *N. tetetzo* se realizó un análisis de secuenciación masiva RNA-Seq para obtener los genomas completos de los posibles virus. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas por RNA-Seq, demostró la probable presencia de un genoma de virus de ARN de cadena sencilla de sentido negativo, perteneciente a la familia Rhabdoviridae y al género *Nucleorhabdovirus*. Ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos diseñados para la CP del *Nucleorhabdovirus* confirmaron la identidad del mismo. Siendo este probablemente un nuevo virus presente solo en la zona de estudio indicada en el trabajo y compartido con otras cactáceas de la zona, dado que su porcentaje de identidad con otros virus del género reportados en el GenBank fue de menos del 50%, pero comparando el viroma con dos especies de *Opuntia sp.* de la zona fue mayor del 84%. Se sugiere aislar y caracterizar individualmente al virus, además de identificar al posible vector transmisor en las cactáceas de la zona de estudio.

Introducción

La Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán se ubica entre los Estados de Puebla y Oaxaca, es un área semiárida considerada relicto de especies silvestres debido a su alto grado de endemismos, sobre todo de especies de plantas vasculares tales como compuestas, cactáceas, leguminosas, bromeliáceas y crasuláceas, la riqueza de especies se considera alta, sobre todo tomando en cuenta la relación entre zonas áridas y las plantas vasculares (Arriaga *et al.*, 2000). Es una de las zonas de mayor concentración de cactáceas columnares del mundo, contienen 45 de las 70 especies de cactáceas columnares reportadas en México, es decir, 64% del total de las especies de México (Valiente-Banuet *et al.*, 1996).

En el Valle de Tehuacán-Cuicatlán se encuentra la cactácea columnar *Neobuxbaumia tetetzo* comúnmente conocida como tetecho o teteche, la cual es una planta que puede medir hasta 15 m de alto y 0.3-0.6 m de ancho, con espinas ligeramente flexibles, delgadas, blancas y translúcidas. *N. tetetzo* es endémica de México y se encuentra distribuida solamente en los estados de Oaxaca y Puebla en el Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Arias *et al.* 1997), debido a su abundancia en esta comunidad llegan a formar densos bosques de hasta 1 200 individuos por hectárea. Por su abundancia esta cactácea es de suma importancia para los pobladores locales, pues son usadas como cercas vivas, materiales para construcción, leña, alimento y plantas ornamentales, además es de gran relevancia ecológica (Godínez-Álvarez, 2001), ya que interactúa con diferentes tipos de polinizadores (Valiente-Banuet *et al.*, 1997a; Valiente-Banuet *et al.*, 1997b). Por lo que es importante el conocimiento de las enfermedades que afectan a estas plantas.

En recorridos por la Reserva de La Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla se observaron plantas de *N. tetetzo* con daños de pudrición blanda, no obstante, también se han observado la presencia de manchas anulares de naturaleza clorótica (Figura 1). Este tipo de daños se observó de manera frecuente en numerosas plantas de la especie. La incidencia de los daños puede representar un porcentaje muy alto en el panorama del paisaje.

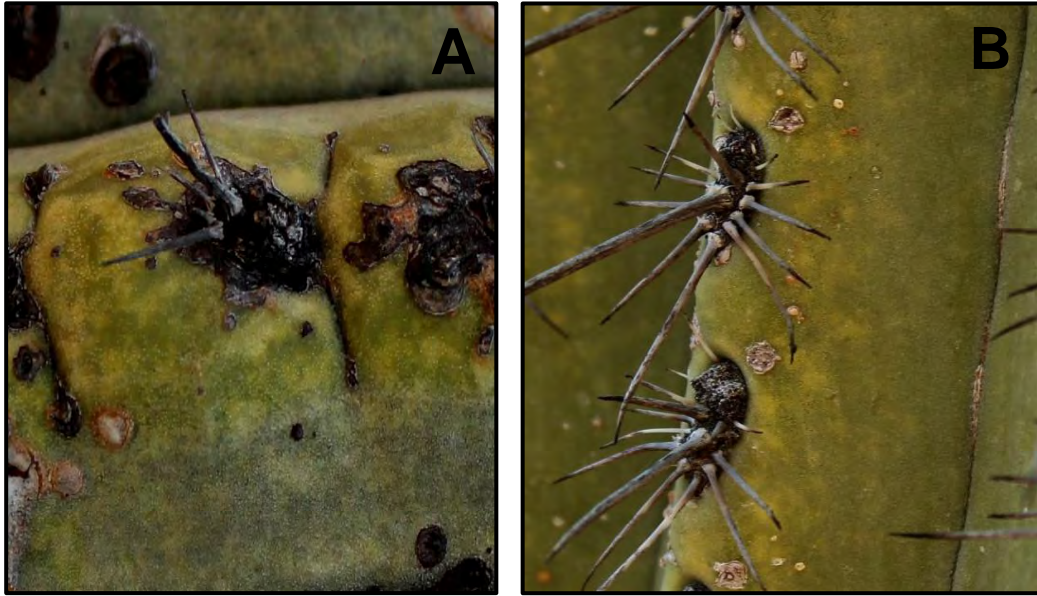


Figura 1. Daños de manchado clorótico en tallo de *Neobuxbaumia tetetzo* (A Y B)

No se conoce el origen de estos síntomas, sin embargo, el análisis visual de las plantas indica que podrían ser causados por virus, así mismo ya se han reportado la presencia de diversos virus asociados a daños similares en organismos de la familia Cactaceae. Hasta el momento no se ha reportado ningún virus en plantas del género *Neobuxbaumia*.

En estudios preliminares en el laboratorio se probó la presencia de virus en estas plantas con ensayos de transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), si bien estos ensayos fueron positivos, se sospecha la presencia de un complejo viral de más componentes, por lo que se utilizó la técnica de secuenciación del transcriptoma o RNA seq, técnica puede utilizarse para la identificación de virus de RNA de estrategias de expresión del tipo ARN mensajero (Chiu, 2013; Malboeuf *et al.*, 2013; Mokili *et al.*, 2012; Roossinck, 2015; Zhang *et al.*, 2013).

Revisión de literatura

Características generales de los virus

Definición de virus

De manera general un virus es un parásito intracelular obligado que posee un genoma compuesto de ADN o ARN. (Flint *et al.*, 2015) Un virus puede también ser definido como un agente infeccioso que no es una célula y que posee material genético en forma de una molécula de ácidos nucleicos (ADN o ARN), usualmente cubierto por una capa proteica

(cápside), que es capaz de dirigir su propia reproducción y que se propaga utilizando la maquinaria dentro de la célula huésped que invade. (Roossinck, 2016)

Clasificación taxonómica

Los virus al igual que otros grupos de organismos se agrupan en Orden, Familia, Género y Especie. Actualmente existen 11 familias y 126 géneros aceptados por The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) el cual es el comité encargado de revisar y aceptar la clasificación de los virus. Otra clasificación propuesta por Baltimore en 1971 engloba 7 grupos, aunque recientemente fue agregado un nuevo grupo. Esta clasificación se basa en las características de los ácidos nucleicos de la partícula viral: I. ADN doble cadena, II. ADN cadena sencilla, III. ARN doble cadena, IV. ARN cadena sencilla de sentido positivo, V. ARN cadena sencilla de sentido negativo, VI. ARN de cadena sencilla retrotranscrito, VII. ADN de cadena sencilla Retrotranscrito (Hulo *et al.*, 2011), VIII. ARN circular de cadena sencilla, el octavo grupo incluye al género Deltavirus y a partículas similares a los virus llamadas Viroides, las cuales actúan como tal, pero no codifican proteínas (Viral Zone, 2017).

Características e identificación de virus de plantas.

Morfología de las partículas virales

Los virus están compuestos de dos partes principales: el genoma, que es un solo tipo de ácido nucleico y una cápside, la cual está hecha de proteínas. Algunas partículas virales están envueltas también por una membrana externa que está hecha de lípidos y proteínas. En el caso de los virus de plantas existen al menos dos tipos de simetría en las cápsides proteicas. El primer tipo de cápside viral es helicoidal (alargada). Los virus alargados vienen en dos variantes principales; varillas rígidas como en la familia *Virgoviridae* a la que es perteneciente virus como el *Tobacco mosaic virus* (Figura 2A) y varillas flexibles, típicas de la familia *Alphaflexiviridae* (Figura 2B). En estas variantes, el ácido nucleico está altamente ordenado: asume la misma conformación helicoidal que la cápside proteica. El segundo tipo de partícula de virus es icosaédrico (esférico) (Figura 2C) y a su vez incluyen dos tipos; baciliformes (Figura 2D) y virus gemelos compuestos por dos icosaedros incompletos unidos (Figura 2E) (Gergerich y Dolja, 2006).

En cuanto a tamaño, los virus más pequeños miden aproximadamente 17 nm de longitud, en contraste con los virus más grandes descubiertos hasta ahora que llegan a medir 1,500 nm de longitud, comparables con bacterias muy pequeñas (Roossinck, 2016)

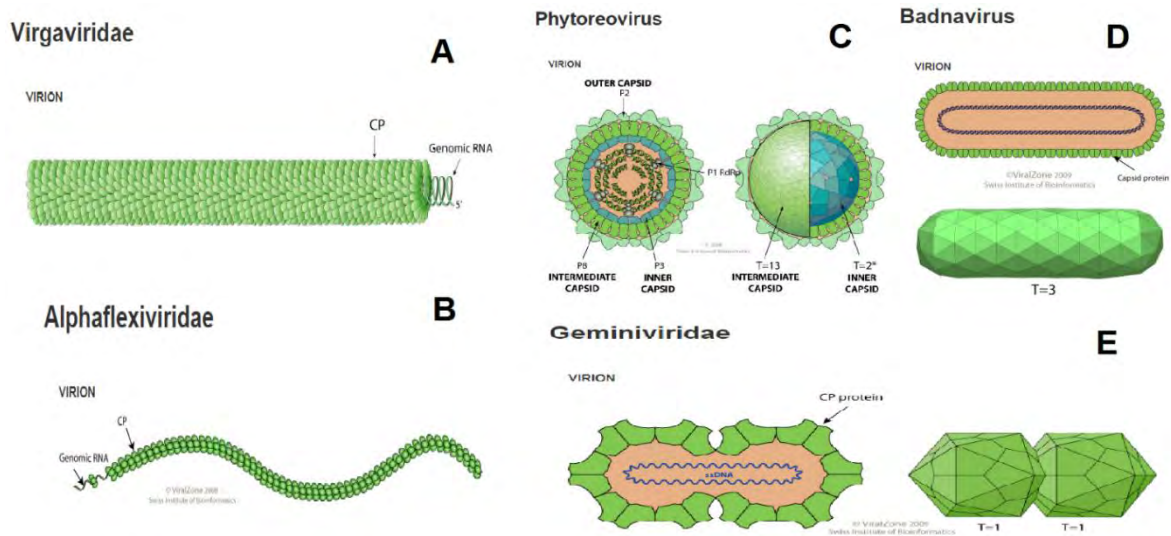


Figura 2. Tipos de morfologías de las cápsidas proteicas de virus de plantas: **A.** Varillas rígidas, como la familia *Virgaviridae*; **B.** Varillas flexibles, como la familia *Alphaflexiviridae*. **C.** Formas icosaédricas como la el género *Phytoreovirus* de la familia *Reoviridae*, las dos variantes en icosaédricas; **D.** Baciliformes como el género *Badnavirus*; y las **E.** Gemelas, como la familia *Geminiviridae*. Tomados de Viralzone, consultado el día 10 de enero del 2018 en: <http://viralzone.expasy.org>.

Detección de Virus y agentes virales

Existen diversas técnicas para la identificación de partículas virales, algunas son directas, como la búsqueda de síntomas en las plantas relacionados a virus o la observación de partículas virales al microscopio electrónico. El problema con estos métodos es la poca información sobre el agente viral que puede extraerse, entre ellas tenemos también el Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) que es uno de los más comunes y prácticos (McLaughlin *et al.*, 1981), sin embargo, es utilizado para la detección de un solo virus y normalmente son varios virus los que infectan a una planta. También existen los métodos moleculares como el uso de la transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) el cual es también un método sensible para detectar virus (Li y

Hartung, 2007) y nos permite reconocer familias, géneros e incluso especies de virus, lo cual es posible al nivel de especificidad de los oligonucleótidos utilizados. Actualmente se ha expandido el uso de técnicas moleculares como lo es la Secuenciación masiva o NGS.

La secuenciación masiva como herramienta para la detección de virus

Tradicionalmente, se usaban técnicas moleculares como el RT-PCR, debido a que los pequeños genomas que presentan los virus pueden utilizarse para obtener una secuencia de referencia, a partir de la cual pueden diseñarse pares de oligonucleótidos para la identificación de virus similares. Sin embargo, esta metodología puede llevar una gran cantidad de tiempo, esfuerzo y gastos. Sobre todo, una de las problemáticas es la variación dentro de las especies de virus, por la que existe la necesidad de rediseñar pares de oligonucleótidos nuevos y una reoptimización frecuente de las condiciones. (Martson *et al.*, 2013). Estos problemas se pueden evitar mediante la utilización de la secuenciación de masiva, una metodología de secuenciación de buen rendimiento, precisión y costo en comparación con la secuenciación de Sanger (Liu *et al.*, 2012). Hay un número creciente de tecnologías de secuenciación masiva en el mercado, todas utilizan metodologías ligeramente diferentes para lograr la amplificación clonal y la secuenciación (Radford, *et al.*, 2012).

Este tipo de métodos sirven particularmente para detectar y caracterizar patógenos sin conocimiento previo de su existencia, o en asociación con el resultado de secuelas/enfermedad, en material primario o cultivado, sin la necesidad de oligonucleótidos específicos (Malboeuf *et al.*, 2013; Marston *et al.*, 2013; Tse *et al.*, 2012).

Uso de RNAseq para la detección de virus en plantas

La secuenciación masiva se ha utilizado para revelar la biodiversidad viral de plantas individuales y dentro de muestras de ARN agrupadas de múltiples plantas para descubrir nuevas especies de virus y los probables agentes causales de enfermedades víricas (Adams *et al.*, 2013).

La RNA-seq es un nuevo método en la secuenciación de ARN para estudiar la expresión de ARNm. Es similar a la secuenciación del transcriptoma en la preparación de la muestra, excepto la enzima (Liu *et al.*, 2012). RNA-Seq utiliza tecnologías de secuenciación profunda recientemente desarrolladas. En general, una población de ARN (total o fraccionado, como poli (A) +) se convierte en una biblioteca de fragmentos de ADNc con adaptadores unidos

a uno o ambos extremos. Cada molécula, con o sin amplificación, luego se secuencian de manera de alto rendimiento para obtener secuencias cortas de un extremo (secuenciación de un solo extremo) o ambos extremos (secuenciación de pares) (Wang *et al.*, 2009).

Dado que la mayoría de virus de plantas están compuestos por ARN, este método representa una buena alternativa para la detección de los mismos. Los virus con genomas poliadenilados pueden detectarse fácilmente, los virus con genomas no poliadenilados no se detectan de forma efectiva (Nagano *et al.*, 2015).

Virus reportados en cactáceas

Anteriormente ya se han reportado la presencia de diversos virus asociados a daños similares en organismos de la familia Cactaceae, se ha reportado la presencia de virus del género *Tobamovirus* (Familia Virgaviridae) como el *Sammons' Opuntia virus* (SOV), que infecta regularmente a *Opuntia basilaris* (Giri y Chessin, 1975), el *Cactus mild mottle virus* (CMMoV) en *Gymnocalycium mihanovichii* (Min *et al.*, 2006), el *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) reportado en *Aporcactus flagelliformis* (Kim *et al.*, 2012).

Otros virus frecuentes son pertenecientes al género *Potexvirus*: como lo son el *Zygocactus virus X* (ZyVX), *Opuntia Virus X* (OpVX), *Cactus Virus X* (CVX) y *Schlumbergera Virus X* (SchVX) los cuales han sido reportados infectando solos o en mezcla. (Izaguirre y Marys, 1996; Koenig *et al.*, 2004; Liou *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2015; Salgado, 2016). El *Potexvirus SchVx* se ha reportado específicamente en *Opuntia ficus-indica* en México (Salgado, 2016).

Virus reportados en Cactáceas en México

En México se han detectado como posibles agentes causales de manchados cloróticos a virus del género *Tobamovirus* en plantas de nopal tunero (*O. streptacantha*) (De la Torre *et al.*, 2007). En *Opuntia albicarpa* se detectó la presencia del *Tobamovirus* RCNaV como posible agente causal de la naturaleza de estos síntomas (De La Torre *et al.*, 2016b). En nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L. MILL), se confirmó la presencia de virus de los géneros *Potexvirus*, *Tobamovirus* y *Carlavirus* (Salgado, 2016), además de manchas cloróticas asociadas a un *Potexvirus* en cultivares en el Estado de Hidalgo (Alonso *et al.*, 2015). Hasta ahora no se han reportado virus afectando a *N. tetetzo*.

Hipótesis

Los daños de manchado clorótico observados en plantas de *Neobuxbaumia tetetzo* en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla están relacionados a la presencia de uno o más virus.

Objetivos

Los objetivos del trabajo fueron identificar y caracterizar a los virus presentes y probablemente asociados al manchado clorótico en *N. tetetzo* con la técnica de RT-PCR por punto final y secuenciación masiva RNAseq.

Materiales y Métodos

Recolecta de Material

El material fue colectado en Zapotitlán de las Salinas, Puebla, dentro de la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, se colectaron muestras de 10 organismos con síntomas de manchado clorótico de *N. tetetzo*. Las muestras tomadas fueron llevadas al laboratorio para su posterior análisis y se mantuvieron a temperatura ambiente para la realización de cada método y posteriormente se mantuvieron a -20°C y -70°C.

Extracción y análisis electroforético de ARN de doble cadena de origen viral.

Se obtuvo ARNdc de origen viral de las plantas con daños por medio del método modificado de Valverde *et al.*, 1990, utilizando 3.5 g de tejido congelado durante un día a -70°C y posteriormente macerado con Buffer STE 1x. Al macerado se agregó SDS 10% y Bentonita 2%, centrifugando a 8000rpm durante 10 min, recuperando la fase acuosa. Ulteriormente se realizaron columnas de celulosa (Sigma-Aldrich) para precipitar la fase acuosa, la celulosa posee la capacidad de adherirse al ARN-dc. La eliminación de sustancias innecesarias como el ADN, ARN de cadena sencilla, clorofilas, etc. se realiza con STE 1x-Etanol al 16%. Para la precipitación del ARN-dc se adiciono Acetato de Sodio 3M y etanol absoluto frío, se centrifugo a 8000 rpm durante 30 minutos y se resuspendió la pastilla en 200 µl de agua doble destilada libre de nucleasas. La alícuota se conservó a -20 °C.

El ARN fue fraccionado por electroforesis en gel de poliacrilamida 6% a 100 volts, por 2:30 hrs. Se incluyó como marcador molecular el ARNdc del *Cucumber mosaic virus* (CMV) tiñendo con bromuro de etidio para determinar el perfil electroforético de posibles virus con genoma de ARN (Valverde *et al.* 1990).

Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

La extracción de ARN fue realizada por el Kit "Quick-RNA Mini Prep Plus" de Zymo Research tomando aproximadamente 200 mg de la epidermis de las plantas con daños.

Para determinar la presencia de posibles virus que se han reportado con mayor frecuencia en la familia Cactácea (*Tobamovirus* y *Potexvirus*), se realizaron ensayos de transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) con diversos pares de oligonucleótidos específicos para cada género. Así mismo recientemente se determinó la presencia de un *Nucleorhabdovirus* en plantas de nopal en la misma zona (Datos no publicados) por lo que se usaron oligonucleótidos específicos para estos virus diseñados

en el laboratorio. Los ensayos de RT-PCR se realizaron utilizando como templado ARN extraído a partir del Kit “Quick-RNA Mini Prep Plus” de Zymo Research. La RT-PCR se realizó en un solo paso (One Step High Fidelity Superscrip III, Invitrogen, Carlsbad, CA), adicionando por cada muestra en un tubo de PCR: 1.025 µL de agua libre de nucleasas, 2.5 µL de solución amortiguadora (Buffer) 2x, 0.5 µL de PVP 40 (10%), 0.5 µL de la mezcla de oligonucleótidos, 0.025 µL de inhibidor de RNAsa, 0.15 µL de RT/taq Mix y 0.3 µL de la extracción de ácidos nucleicos. La mezcla fue colocada en un termociclador (BIORAD T100 Thermal Cycler), usando diferentes programas de amplificación dependiendo de los oligonucleótidos utilizados.

RT-PCR para *Potexvirus*.

Se utilizaron 2 pares de oligonucleótidos: Potex R1: 5'-TCA GTR TTD GCR TCR AAR GT-3' /Potex F5; 5'-CAY CAR GCM AAR GAY GA-3' y Potex R2: 5'-AGC ATR GCN SCR TCY TG-3' /Potex F5, los cuales amplifican segmentos del gen de la replicasa (RdRp) muy conservados para el género de los *Potexvirus* con un amplicon esperado de 735pb y 584pb respectivamente (Van der Vlugt y Berendesen, 2002). El programa de amplificación fue de la siguiente manera: Un solo ciclo de 50°C por 32 min; un solo ciclo de 94°C por 3 min. Posteriormente 35 ciclos de las siguientes condiciones: Desnaturalización a 94°C por 30 s, apareamiento a 51.5°C por 1 min y extensión a 68°C por 1 min. Finalmente, un solo ciclo de 68°C durante 5 min (Hold a 14°C/∞). Así mismo fueron utilizados cuatro pares de oligonucleótidos específicos para la proteína de la cápside (CP) de los *Potexvirus Cactus Virus X* (CVX), *Opuntia Virus X* (OpVX), *Schlumbergera Virus X* (SchVX) (Cuadro 1) (Salgado, 2016, De La Torre *et al.*, 2016a) y *Zygocactus Virus X* (ZyVX), el último fue diseñado en el laboratorio y está en proceso de publicación.

Cuadro 1. Secuencias de oligonucleótidos específicos utilizados para los ensayos de RT-PCR de la CP de tres especies de *Potexvirus* presentes en otras cactáceas.

Especie de <i>Potexvirus</i>	Nombre	Secuencia	Tamaño
<i>Cactus Virus X</i>	CVX CP Forward	5'-ATG TCT ACT GGA GTC CAG TC-3'	500 pb
	CVX CP Reverse	5'-CTA CTC AGG GCC TGG GAG AAA TTG-3'	
<i>Opuntia Virus X</i>	OpVX CP Forward	5'-ATG GCC TCC ACT CCA CAG ACC-3'	500pb
	OpVX CP Reverse	5'-GAG TAG TGT CTT ATT CAG GAC CTG-3'	
<i>Schlumbergera Virus X</i>	2875s	5'-CACACTCGAGCTTCACAATAATCCAAGGC-3'	860pb

2876As

5'-CACAGTCGACAAACAGAAGGCTTGACTCG-3'

RT-PCR para *Tobamovirus*

Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos degenerados que amplifican regiones muy conservadas en el gen de la replicasa (RdRp) de los *Tobamovirus*. Para un primer ensayo de RT-PCR se utilizaron los oligonucleótidos TobRT up1: 5'-GARTAYSCIGCIYTICARAC-3' y TobRT do2: 5'-BGCYTCRAARTTCCA-3' con el siguiente programa de amplificación. Un solo ciclo de 50°C por 32 min; un solo ciclo de 94°C por 3 min. Posteriormente 5 ciclos de las siguientes condiciones: Desnaturalización a 95°C por 30 s, apareamiento a 43°C por 30 s y extensión a 68°C por 15 s, consecutivamente 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 s, apareamiento a 46°C por 30 s y extensión a 68°C por 15 s. Finalmente, un solo ciclo de 68°C durante 2 min (Hold a 14°C/∞). El cual rindió un amplicón de 540pb. (Dovas *et al.*, 2004)

El segundo par de oligonucleótidos TobN up3: 5'-GGCGYTGCARACIATHGTITAYCA-3', TobN do4 5'-GTRTTICCIATRAAIGTIGTIACRTC-3' y TobN do4G: 5'-GCCGATRAAGGTGGTGACRTC-3' (Dovas *et al.*, 2004) fue utilizado para un PCR anidado adicionando por cada muestra en un tubo de PCR: 2.75 µL de agua libre de nucleasas, 0.5µL de solución amortiguadora (Buffer) 10x, 0.15 µL de Cloruro de Magnesio (MgCl₂) 50 mm, 0.1 µL de dNTP'S 10 mm, 0.4 µL de la mezcla de oligonucleótidos, 0.1µL de RT/taq Mix y 1 µL del producto obtenido en la fase anterior, con el siguiente perfil de programación: Un ciclo de 95°C por 3 min, 2 ciclos de desnaturalización a 95°C por 20 s, apareamiento a 52°C por 15 s y extensión a 72°C por 5 s, consecutivamente 26 ciclos con desnaturalización a 95°C por 20 s, apareamiento a 61°C por 30 s y extensión a 68°C por 15 s. Finalmente un ciclo de 72°C por 2 min (Hold a 14°C/∞). Rindiendo un amplicón de 400pb (Dovas *et al.*, 2004).

Por otro lado, fueron realizados ensayos con dos pares de oligonucleótidos para el gen de la cápside (CP) de dos especies de *Tobamovirus*: *Rattail Cactus Necrosis-associated Virus* (RCNaV) VP2880S 5'-CACACTCGAGAAAATGAAGTGGTCGTTAAAG-3' y VP2881As 5'-CACACGTGACGTGGGCCCTACCCGGGGTAAG-3' (De La Torre *et al.*, 2016b) y Tobamovirus 2 Nopal F/ Tobamovirus 2 Nopal R diseñados en el laboratorio (Datos no publicados).

Los productos de RT-PCR se fragmentaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El peso molecular se calculó por comparación con el marcador de peso molecular

Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Invitrogen). Las condiciones para la electroforesis fueron de 100 V por 30 minutos.

RT-PCR para *Nucleorhabdovirus*

Fueron utilizados los oligonucleótidos; *Nucleorhabdovirus* 506F y *Nucleorhabdovirus* 1103R diseñados en el laboratorio (Datos no publicados) los cuales son específicos para una nueva especie de *Nucleorhabdovirus* (Rhabdoviridae) presente en plantas de nopal de la zona de estudio, con el siguiente programa de amplificación. Un solo ciclo de 50°C por 30 min; un solo ciclo de 95°C por 2 min. Posteriormente 35 ciclos de las siguientes condiciones: Desnaturalización a 95°C por 10 s, apareamiento a 55°C por 15 s y extensión a 68°C por 1 min. Finalmente, un solo ciclo de 68°C durante 5 min (Hold a 14°C/∞). El cual rindió un amplicon de 500pb.

Los productos de RT-PCR se fragmentaron en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. El peso molecular se calculó por comparación con el marcador de peso molecular Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Invitrogen). Las condiciones para la electroforesis fueron de 100 V/400 MA por 30 minutos.

Secuenciación de productos de la RT-PCR

Los productos de la RT-PCR que se encontraron dentro del peso esperado fueron cortados y purificados utilizando el Kit "Gene Jet Extraction Kit" (ThermoFisher Scientific). Posteriormente se determinó la secuencia directa de nucleótidos de los amplicones de interés utilizando un secuenciador Genetic Analyzer 3100 XL (Applied Biosystems) de 16 capilares que utiliza el método BIG DYE (Terminator fluorescence based sequencing) para el análisis de secuencia (Sanger *et al.*, 1977) en el Laboratorio de Bioquímica Molecular de la UBIPRO, FES IZTACALA, UNAM.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas y comparadas con las disponibles en la base de datos del GenBank disponible en NCBI (National Center for Biotechnology Information) por medio de BLAST (Basic Local Alignment Search Total) (Altschul *et al.*, 1990).

Secuenciación Masiva de RNAseq de muestra de *N. tetetzo*.

Debido a las evidencias de virus presente en las muestras analizadas con los primeros ensayos de diagnóstico (RT-PCR) se realizó la secuenciación masiva de RNA-Seq de muestras de *Neobuxbaumia tetetzo* con el propósito de obtener genomas completos de todos los posibles virus presentes en la misma.

La muestra fue obtenida mediante el Kit Quick-RNA Mini Prep Plus de Zymo Research y fue enviada a la Unidad Universitaria de Secuenciación Masiva de DNA-UNAM, (UUSMD) en el Instituto de Biotecnología (IBT) UNAM, campus Cuernavaca, Morelos, donde se realizó la secuenciación masiva de ARN dirigido a ARNm (RNA-seq) por extremos pareados (*paired-end*), con un tamaño de biblioteca de 300 pb, y tamaño de lecturas (*reads*) de 75 pb. La secuenciación masiva se realizó con la plataforma ILLUMINA Next-seq 500. Se evaluó la integridad y concentración del ARN total de la muestra mediante un microchip de 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara CA) el cual utiliza el algoritmo de RIN (*RNA integrity number*), que arroja un número entre 1 a 10, siendo el 10 un ARN bastante íntegro y concentrado, en base a la degradación y concentración de bandas de ARN ribosomal correspondientes al 18S y 28S, que son separadas por electroforesis (Schroeder *et al.*, 2006).

Evaluación y análisis de lecturas

Se evaluó la calidad de los datos obtenidos (lecturas o *reads*) por medio del software FASTQC (Andrew, 2010). Los *reads* se analizaron por comparación con genomas completos (Mapeo a referencia) obtenidos del GenBank con el software Geneious 7.1 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). Por otra parte se realizó un ensamble de *novo*, con el software Trinity que hace uso de gráficas de Bruijn (Haas *et al.*, 2013) para el armado de *contigs* más grandes que fueron analizados mediante BLAST y BLASTX (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997) para la búsqueda de otros virus. Posteriormente se construyeron árboles filogenéticos por máxima verosimilitud, con el genoma completo y con los genes RdRp y CP, de los genomas virales obtenidos por RNA-seq, y virus reportados en el GenBank, ajustando el modelo por medio del software jModelTest 2.0 ver 0.1.1 (Darriba *et al.*, 2012), y PhyML 3.0 (Guindon y Gascuel 2003) para generar los árboles.

Resultados

Extracción y análisis electroforético de ARN de doble cadena de origen viral.

El análisis electroforético de ARNdc en gel de poliacrilamida 6% mostró la presencia de una banda en muestras de *N. tetetzo*. La banda se observa aproximadamente entre las dos bandas más pesadas del patrón de CMV (6.2 kb y 6.8 kb respectivamente) que probablemente pertenezca a la forma replicativa de un ARNdc de origen viral de aproximadamente 6.4 kb que correspondería al patrón típico de un *Tobamovirus* (Figura 3)

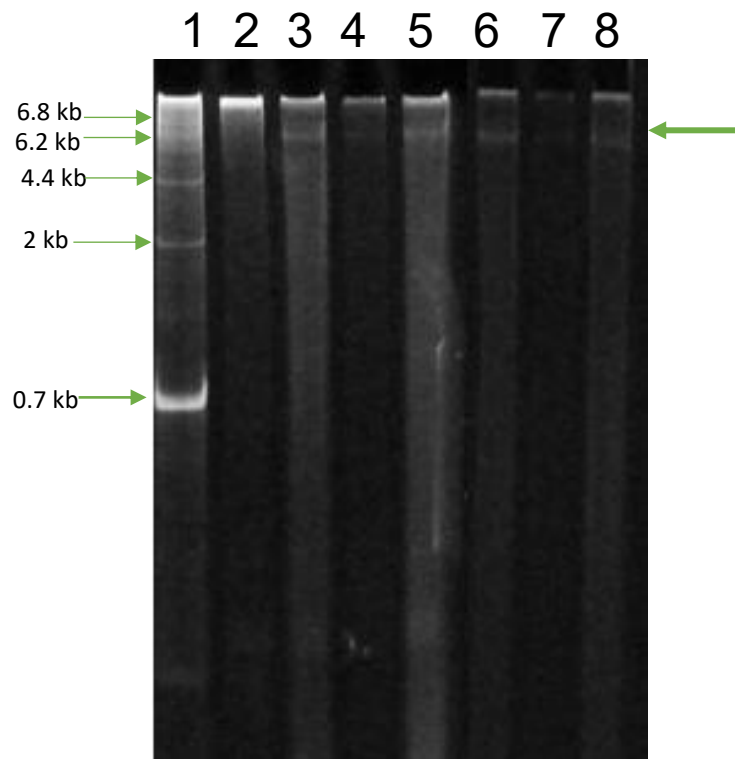


Figura 3. Análisis electroforético de muestras de tetecho para la detección de ARNdc en gel de poliacrilamida al 6%. (100 V 2:30h) Electroforesis en gel de Poliacridamida al 6% (100 V/1:30hrs.) de extracción de ARNdc.; Carril 1- Patrón electroforético de ARNdc del *Cucumber Mosaic virus* (CMV). Carril 2 a 8- ARNdc de *Neobuxbaumia tetetzo*. (40πl de reacción/10μl de amortiguador de carga). Se observa una banda perteneciente probablemente al genoma de un *Tobamovirus* (6.4kb)

Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

RT- PCR para *Tobamovirus*

Con esta técnica se demostró la presencia de un virus del género *Tobamovirus* al obtenerse amplicones dentro del peso esperado para los oligonucleótidos reportados por *Dovas et al.* en 2004, de 400pb (Figura 4). Así mismo fueron obtenidos amplicones dentro del peso esperado (1000pb) para los oligonucleótidos específicos de la CP para RCNaV (Figura 5).

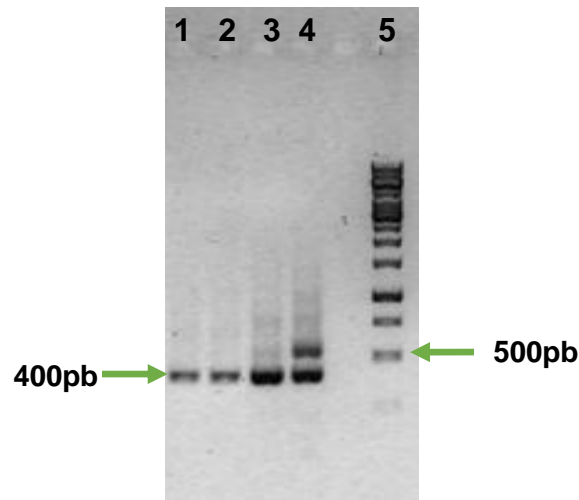


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa 1% (100 V, 30 min) de RT-PCR de muestras de *Neobuxbaumia tetetzo* para detectar *Tobamovirus*. Se usaron los oligonucleótidos TobNup3, TobNdo4 y TobNdo4G para el gen de la RdRp de *Tobamovirus* que rindieron un amplicon de 400pb. Carril 1-3 Muestras de *Neobuxbaumia tetetzo*. Carril 4 Control *Opuntia parviclada*. Carril 5 1kb DNA Ladder.

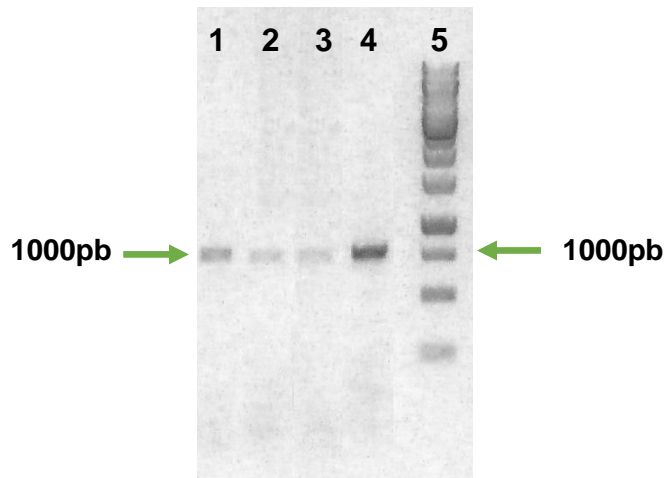


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% (100 V, 30 min) de RT-PCR de muestras de *Neobuxbaumia tetetzo* para detectar RCNaV. Se usaron los oligonucleótidos VP2880S y VP2881As para el gen de la CP del *Tobamovirus* RCNaV que rindieron un amplicon de 1000pb. Carril 1-3 Muestras de *Neobuxbaumia tetetzo*. Carril 4 Control *Opuntia parviclada*. Carril 5 1kb DNA Ladder.

RT-PCR para *Potexvirus*

No se obtuvieron amplicones para los ensayos con los oligonucleótidos específicos para el género *Potexvirus*, al realizar la confirmación con oligonucleótidos específicos para la CP de cuatro especies del género (*Cactus Virus X*, *Opuntia Virus X*, *Schlumbergera Virus X* y *Zygocactus Virus X*), tampoco se obtuvieron resultados positivos.

RT-PCR para *Nucleorhabdovirus*

Los ensayos realizados con los oligonucleótidos específicos diseñados en el laboratorio para un posible nuevo *Nucleorhabdovirus* (no reportado) mostraron resultados positivos al encontrarse amplicones dentro del peso esperado de aproximadamente 500pb (Figura 6) y confirmaron su presencia con la secuencia resultante.

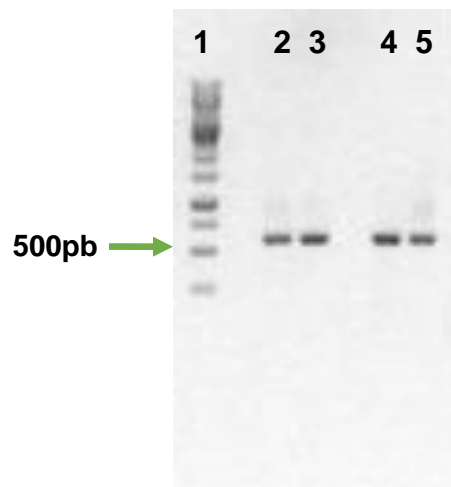


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa 1% (100 V, 30 min) de RT-PCR de muestras de *Neobuxbaumia tetetzo* para detectar *Nucleorhabdovirus*. Se usaron oligonucleótidos para el gen de la CP (no publicados) que rindieron un amplicon de aproximadamente 500pb. Carril 1 1kb DNA Ladder. Carril 2-5 Muestras de *Neobuxbaumia tetetzo*.

Secuenciación, análisis y comparación nucleotídica del genoma viral con secuencias disponibles en el GenBank.

Las secuencias parciales de los amplicones de la replicasa RdRp obtenidas a partir de RT-PCR presentaron un porcentaje de identidad de entre 86% y 97% con el *Tobamovirus* RCNaV y del 94% al 98% con *Tobamovirus* 2 (Salgado, 2016) disponibles en el GenBank con los siguientes números de acceso: RCNaV (KY348772, KU854932, KY348773) y *Tobamovirus* 2 (MF434821), lo cual indica la presencia de al menos un *Tobamovirus*. En el caso de los oligonucleótidos específicos para la proteína de la cápside de RCNaV, a pesar

de que los resultados fueron positivos al encontrarse amplicones dentro del peso esperado (1000pb), no fue posible la secuenciación del mismo.

La construcción de árboles filogenéticos con las secuencias nucleotídicas directas de la RdRp obtenidas y con las disponibles en el GenBank confirmaron la identidad y relación filogenética entre los virus del mismo género con otras secuencias reportadas en el GenBank y las secuencias disponibles obtenidas en otras cactáceas, siendo la cercanía del genoma viral mayor con el *Tobamovirus* RCNaV y el *Tobamovirus* 2 (Figura 7).

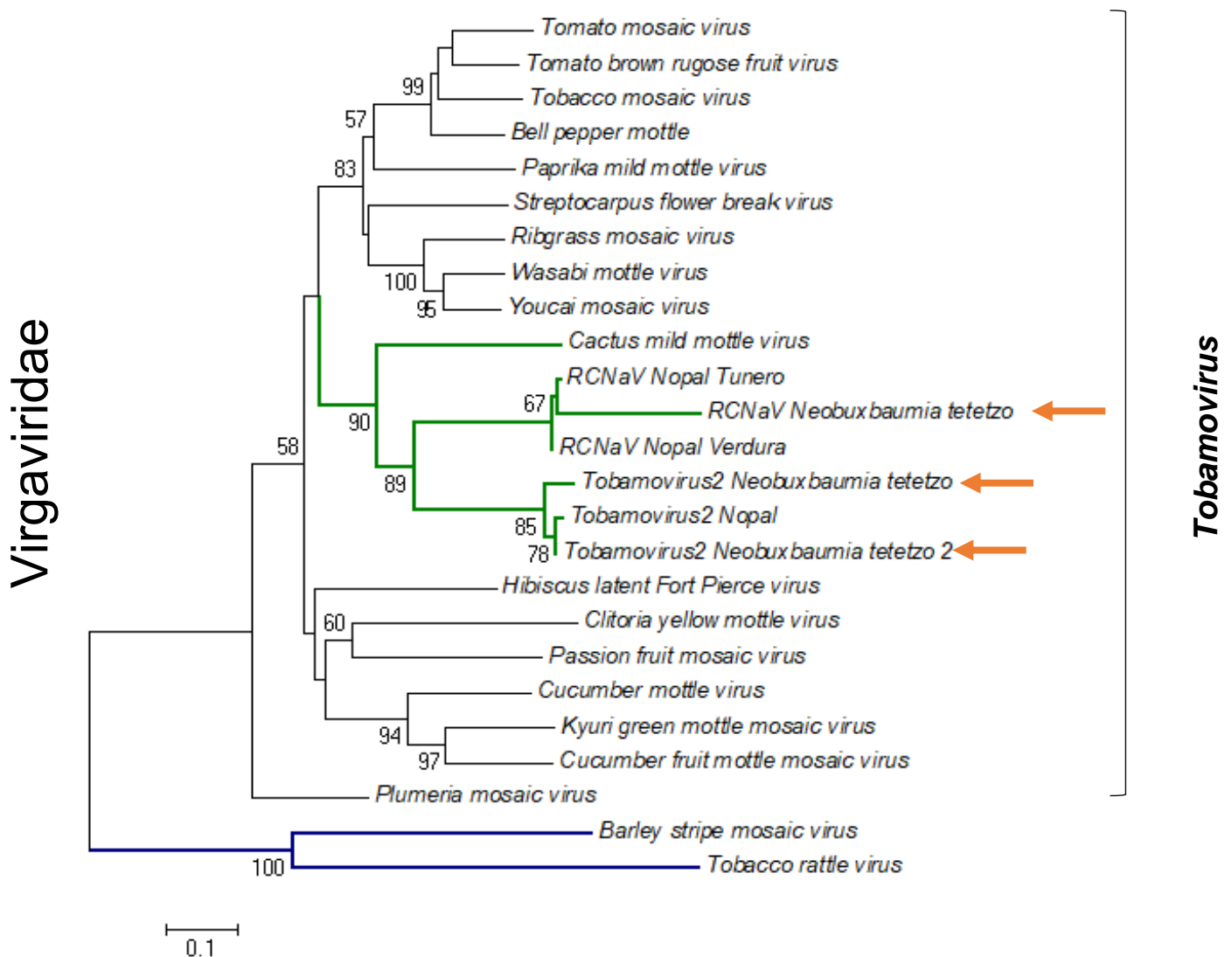


Figura 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (1500 réplicas), para gen de RdRp (K80+G) en *Tobamovirus*, se observa la separación de los virus en dos grupos. Los virus encontrados en cactáceas en color verde y dos controles externos del género *Tobravirus* y *Hordeivirus* en azul, pertenecientes también a la familia Virgaviridae. Además, de la separación de los distintos virus reportados en cactus (nopales) en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán y los identificados en tetecho señalados con una flecha.

Secuenciación Masiva de RNAseq de muestra de *N. tetetzo*.

La profundidad de lecturas del genoma fue de 75x ciclos con 11 millones de lecturas. Se obtuvieron aproximadamente 30 millones de lecturas con un tamaño promedio de 75 pb cada una. La calidad en general por cada base medida con el software FASTQC (Andrew, 2010), de acuerdo a la escala de Phred fue superior a 20 (que indica una probabilidad de 1 en 100, de bases incorrectas).

A partir del análisis de mapeo usando como referencia genomas virales de *Potexvirus* y *Tobamovirus* presentes en nopal, no se encontraron secuencias que alinearan. El ensamblado con Trinity de *contigs* y su análisis de mapeo con referencia con el software Geneious ver. 7.1 y BLASTX, demostraron la presencia de un *Nucleorhabdovirus*, relacionado con dos genomas de *Nucleorhabdovirus* detectado en el laboratorio en dos especies de *Opuntia* (*Opuntia depressa* y *Opuntia pilifera*) (no publicado), con un porcentaje de identidad de 84% con el genoma del virus detectado en *Opuntia depressa* y de 95% con *Opuntia pilifera*, para la RdRp (RNA dependent RNA polimerase) de 89% con *O. depressa* y 96% con *O. pilifera*. Para el gen de la proteína de la cápside (CP) de 90% y 96% respectivamente.

La construcción de árboles filogenéticos con las secuencias nucleotídicas del virus obtenido y secuencias disponibles en el GenBank, inicialmente para la comparación del genoma completo (13,141pb) para dos géneros distintos de virus (*Nucleorhabdovirus* y *Cytorhabdovirus*) confirmó la identidad y relación filogenética entre los virus del mismo género con otras secuencias reportadas en el GenBank y las secuencias disponibles obtenidas en las dos especies de *Opuntia sp.* (Figura 8). Así mismo esta relación se mantuvo en el árbol realizado para el gen de la RdRp (L). (Figura 9). Finalmente, la construcción del árbol filogenético usando el gen de la proteína de la cápside (CP), demostró una vez más la cercanía del genoma viral con los obtenidos en *Opuntia pilifera* y *Opuntia depressa*. (Figura 10).

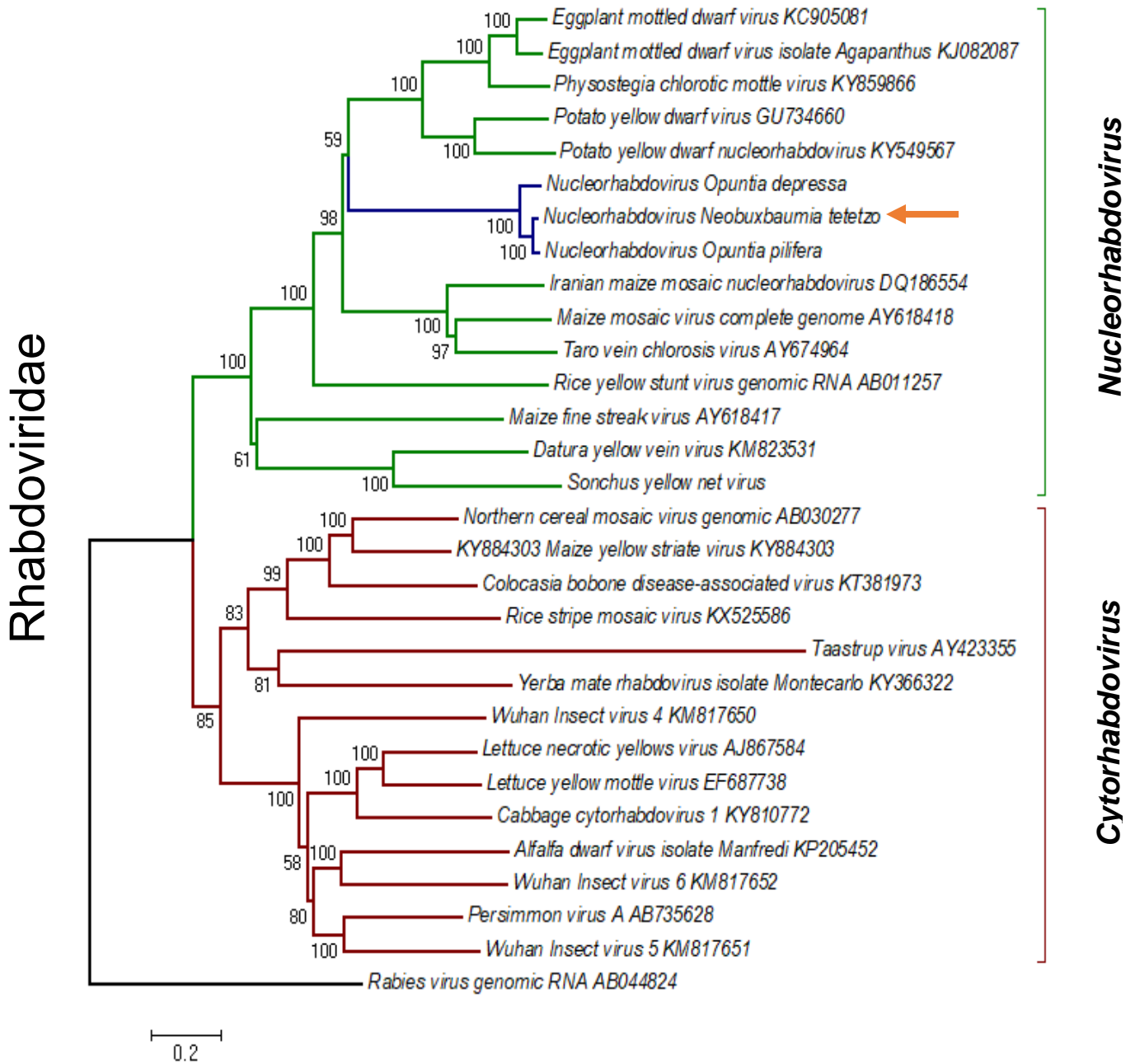


Figura 8. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (1000 réplicas), para genomas completos (JC69+G) en *Nucleorhabdovirus* y *Cytorhabdovirus*, se observa la separación de los géneros de virus (dos grupos) y un control externo del género Lyssavirus. Además, de la separación de los distintos virus reportados en cactus (nopales) en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán y el identificado en tetecho señalado con una flecha.

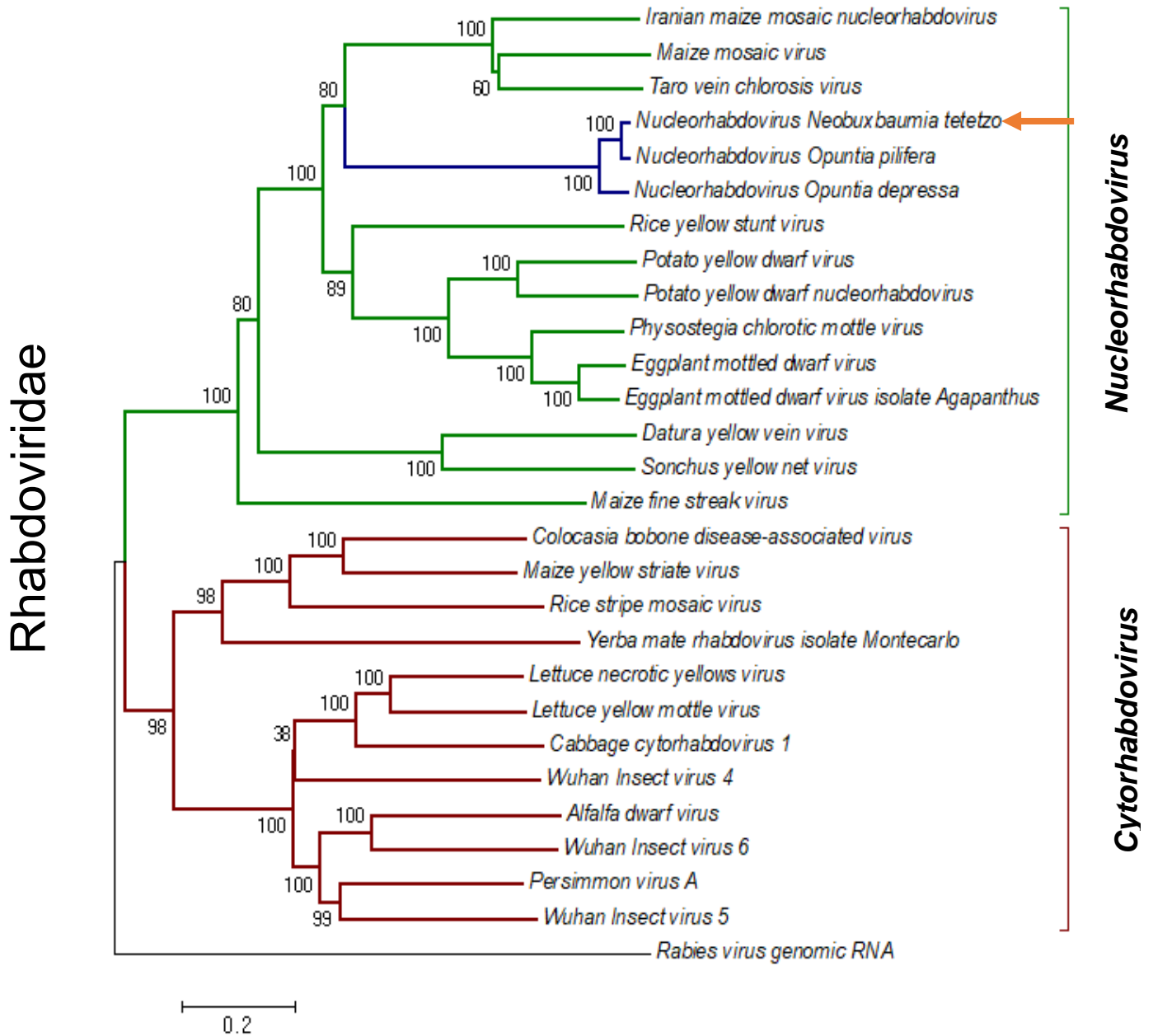


Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (1000 réplicas), para el gen de la RdRp (JC69+G) en *Nucleorhabdovirus* y *Cytorhabdovirus*, se observa la separación de los géneros de virus (dos grupos) y un control externo del género Lyssavirus. Además, de la separación de los distintos virus reportados en cactus (nopales) en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla y el identificado en tetecho señalado con una flecha.

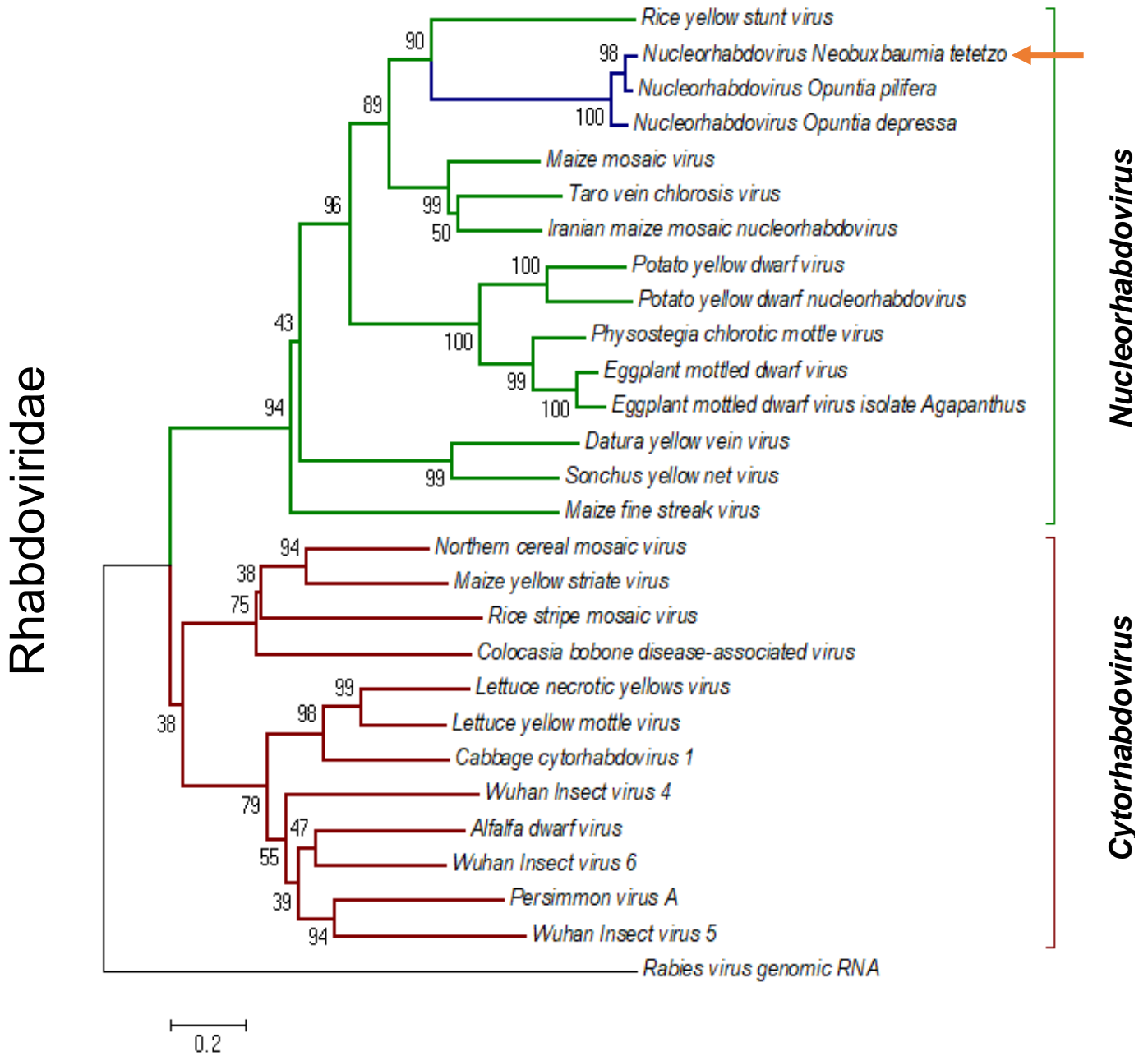


Figura 10. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (1000 réplicas), para el gen de la CP (JC69+G) en *Nucleorhabdovirus* y *Cytorhabdovirus*, se observa la separación de los géneros de virus (dos grupos) y un control externo del género Lyssavirus. Se observa la cercanía del genoma obtenido del *Nucleorhabdovirus* obtenido de tetecho señalado con una flecha con los otros dos reportados en nopales en la Reserva de la Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla.

Discusión

Considerando los datos del presente trabajo, se determinó que la posible causa de los daños de manchado clorótico en *Neobuxbaumia tetetzo* puede estar asociado a la presencia de uno o más virus. El análisis de ARNdc de origen viral, demostró la presencia de material genético de origen viral de un posible *Tobamovirus*, el cual fue confirmado con los ensayos de RT-PCR dirigidos al gen de la RdRp y su posterior secuenciación. Lo anterior fue comprobado con los porcentajes de identidad de las secuencias obtenidas comparadas con secuencias del GenBank, el cual fue de 97% para el RCNaV que concuerda con lo reportado por De La Torre *et al.* 2016b y con Salgado, 2016 en cactáceas de nopal de la especie *Opuntia albicarpa* y *Opuntia ficus-indica* respectivamente y de más de 95% para el Tobamovirus 2 identificado también en plantas de varias especies de nopal por Salgado (Datos no publicados).

Con el análisis de secuenciación masiva de RNA-seq no fue posible la identificación de las dos posibles especies de *Tobamovirus* que si fueron identificados y confirmados por medio de la RT-PCR, esto puede deberse a que su genoma no es poliadenidado, lo cual es una característica necesaria para la detección de las partículas virales (Nagano *et. al.*, 2015; Wang *et al.*, 2009) sino que posee en su extremo 3' una estructura de tipo tARN (Figura 11) (Viral Zone, 2017). No obstante anteriormente ha sido posible la detección de *Tobamovirus* en cactáceas con esta técnica, como lo reporta Salgado en 2016 en plantas de nopal (*Opuntia sp.*), esto puede deberse a distintas causas, entre ellas se especula que la concentración del virus en la planta puede ser un factor determinante, dado que en el trabajo mencionado las cactáceas eran de origen comercial, las cuales están expuestas a las prácticas de cultivo manuales como las podas o a herramientas de trabajo, el hombre se convierte en una importante fuente de diseminación de este tipo de virus (Kalb, 2004, Kenyon *et al.*, 2014), es posible que estos factores aumenten drásticamente la concentración del virus a comparación de las cactáceas silvestres que tienen muy poco contacto con hombre, como lo es el tetecho. En tetecho la fuente de contaminación con este género de virus puede ser a través de semillas, debido a que no existe transmisión por ninguna clase de vectores (ICTV, 2017) y la transmisión mecánica es poco factible. Las semillas de una planta pueden ser infectadas externamente por *Tobamovirus* (Genda *et al.*, 2011). Los residuos en el suelo de una planta contaminada o de semillas con virus suelen ser las fuentes primarias de infección, como sucede en plantas de pimiento y tomate con

virus como el TMV o ToMV (Kenyon *et al.*, 2014, Kalb, 2004) también pertenecientes al género *Tobamovirus*.

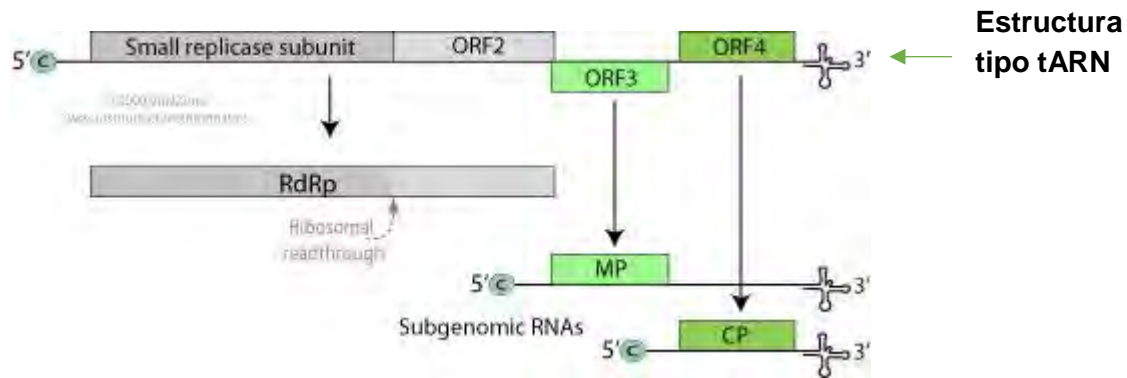


Figura 11. Esquemas de la composición genómica de *Tobamovirus*, Se observan los distintos marcos de lectura que poseen cada género, y los componentes subgenómico generados durante su replicación y traducción (Tomado del ViralZone, Consultado el 28 de Agosto del 2018).

Con el análisis de secuenciación masiva de RNA-seq fue posible la identificación de un *Nucleorhabdovirus* al obtener la secuencia completa de su genoma. El genoma posee RNA de cadena sencilla de sentido negativo y consiste en 13,141pb. Por medio de los ensamblajes de los datos obtenidos de RNA-seq en Geneious 7.1 se identificaron 6 marcos de lectura abiertos o ORFs (open read frame ORF por sus siglas en inglés) (Figura 12). El ORF “N” codifica la nucleoproteína que encapsida el genoma del virus, el cual tiene una longitud de 1593pb, el segundo ORF “P” codifica una fosfoproteína, la cual se une a la nucleocápside viral y posiciona la polimerasa en la plantilla para la transcripción y la replicación, tiene una longitud de 951pb. El marco de lectura abierto “3” es el factor codificante para la proteína del movimiento y consiste en 852pb. El ORF “M” codifica la proteína de la cubierta o Matrix y consiste en 735pb. La cuarta ORF codifica una glicoproteína que ayuda a la transmisión de este tipo de virus, la cual se realiza a través insectos vectores (Whitfield *et al.*, 2015, ICTV, 2017) con 1,899pb. Por último, el marco de lectura abierto “L” posee 5,856pb y codifica la ARN polimerasa (Figura 12).

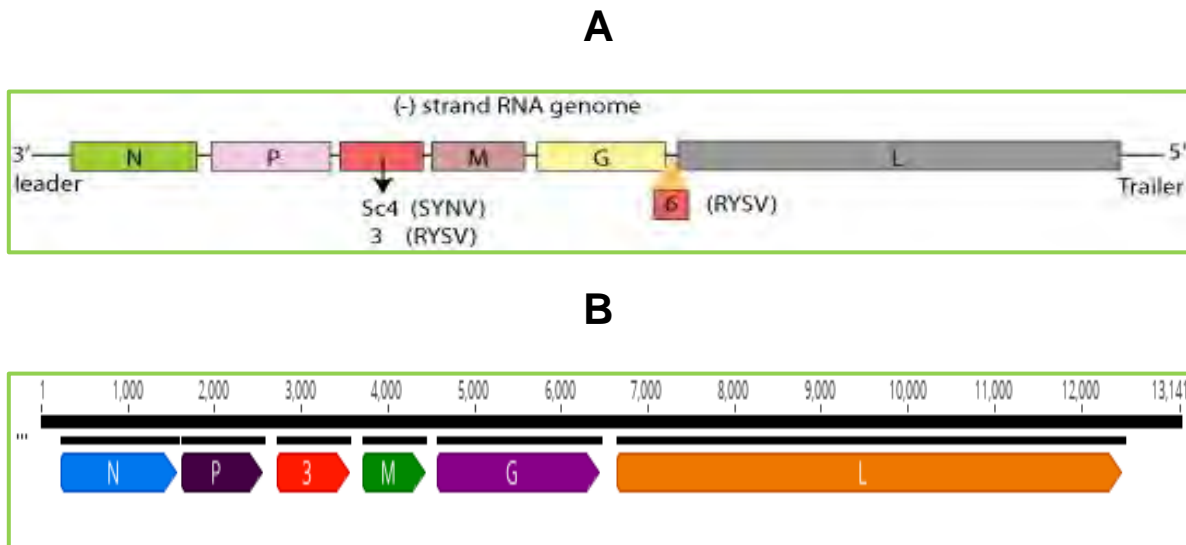


Figura 12. (A) Esquema de la composición genómica de *Nucleorhabdovirus*. Tomado de Viral Zone, 2017. **(B)** Esquema de la composición genómica del *Nucleorhabdovirus* identificado en *N. tetetzo*. Se identificaron 6 ORFs correspondientes a la CP (N), Fosfoproteína (P), Matrix (M), Glicoproteína (G) y RdRp (L) (Obtenidos por los ensambles de los datos de RNA-Seq en Geneious 7.1).

Las evidencias de las relaciones filogenéticas reafirman la posición del virus identificado en *Neobuxbaumia tetetzo* en el género *Nucleorhabdovirus* (Familia Rhabdoviridae), sin embargo los porcentajes muy bajos de identidad entre el *Nucleorhabdovirus* identificado comparado con virus del mismo género registrados en el GenBank (menos del 50%), que de acuerdo a los criterios de especie dentro del género debe ser mayor a 50% (ICTV, 2017), aunado a lo anterior a pesar de que este género de virus afecta a una gran cantidad de plantas, cada virus tiene un número restringido de especies (Goodin y Jackson, 2002) además de ser transmitido por insectos vectores los cuales poseen también nichos específicos (ICTV, 2017, Jackson *et al.*, 2005) y dado que anteriormente no han sido reportados *Nucleorhabdovirus* en cactáceas, nos lleva a sugerir que es un virus totalmente nuevo y probablemente se encuentra restringido a la zona de estudio presentada en este trabajo.

Los porcentajes de identidad de los *Nucleorhabdovirus* detectados en las dos especies de *Opuntia sp.* (*Opuntia depressa*: 84% *Opuntia pilifera*: 95%), las relaciones filogenéticas cercanas que poseen, además de ambas encontrarse en la Reserva de la Biosfera de

Tehuacán-Cuicatlán, Puebla aluden probablemente a que se trata del mismo virus para las tres especies de Cactáceas.

Los daños de manchado clorótico presentes en las plantas de *Neobuxbaumia tetetzo* podrían estar relacionados principalmente con alguno de los *Tobamovirus* identificados dado que uno de los síntomas principales de los *Tobamovirus* es el mosaico clorótico (UC/IPM, 2017, ICTV, 2002) De la Torre *et al.* En 2007 detectaron un posible virus del género en plantas de *Opuntia streptacantha* con síntomas similares. Salgado en 2016 reportó la presencia de daños de manchado clorótico y deformación en plantas de *Opuntia ficus-indica* infectadas con un probable RCNaV y en *Opuntia albicarpa* se detectó la presencia del *Tobamovirus* RCNaV como posible agente causal de anillos cloróticos (De La Torre *et al.*, 2016b), como también se reporta en este trabajo.

Debido a que la RNA-seq posee una profundidad de amplificación y secuenciación mayor que los métodos estándar, nos permitió caracterizar molecularmente e identificar el genoma completo de un virus presente en *Neobuxbaumia tetetzo* que no había sido reportado en Cactáceas anteriormente. Lo cual confirma el uso universal de esta tecnología, obteniendo secuencias virales completas, sin tener antecedentes de los posibles virus presentes.

La aplicación de la secuenciación masiva de RNA-seq dirigida a ARNm ha generado buenos resultados en la obtención de secuencias de virus ya reportados anteriormente y aún más importante de nuevos virus, como en el caso de la reciente identificación de virus en Durazno (*Prunus pérsica*) relacionados con el genoma de *Peach mosaic virus* (PcMV), *Peach chlorotic mottle virus* (PCMV) y *Cherry green ring mottle virus* (CGRMV) (Velasco, 2017) y de dos *Potexvirus*, un *Tobamovirus* y un probable nuevo *Carlavirus* por Salgado en 2016. La utilización de esta técnica permite la detección de varios virus en plantas silvestres en entornos naturales, además de la recolección paralela de datos del transcriptoma de la planta huésped los cuales son muy importantes para el estudio de la respuesta de los huéspedes a las infecciones virales, así como la manipulación del huésped viral. (Nagano *et al.*, 2015), sin embargo, los virus con genomas no poliadenilados no se detectan de manera efectiva (Wang *et al.*, 2009).

Aunque se propone que la RNA-seq dirigida a RNAs facilita la identificación de genomas virales ya que aumenta la cobertura de los mapeos a referencia, o el ensamblado *de novo* de *contigs*, debido al corto tamaño de las *reads* (20-30 nt) (Pirovano *et al.*, 2014), nosotros demostramos que el uso de *reads* de 75 pb y el ensamblaje *de novo* con Trinity, nos facilitó la identificación de al menos un nuevo virus.

Adicionalmente se validó la presencia del virus identificado mediante RT-PCR de punto final, para lo cual se desarrollaron oligonucleótidos específicos que flanquean el gen de la proteína de la cápside (Datos no publicados). Esto permitirá la identificación de ese virus en otras cactáceas.

Conclusiones

- Se identificó en plantas de *Neobuxbaumia tetetzo* silvestres presentes en la Reserva de La Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, con síntomas de manchado clorótico, la presencia de agentes virales pertenecientes al grupo *Tobamovirus* y *Nucleorhabdovirus* por medio de RT-PCR y la confirmación de identidad por medio de la secuenciación de productos.
- Se confirmó la presencia e identidad de un *Nucleorhabdovirus* por medio de secuenciación masiva de RNA-seq en las muestras silvestres de *Neobuxbaumia tetetzo*.
- Se determinó que el *Nucleorhabdovirus* identificado en *N. tetetzo* es probablemente un virus nuevo y restringido a la zona de estudio presentada en el trabajo.

Perspectivas

- En base a la identificación de un nuevo *Nucleorhabdovirus* se recomienda la caracterización biológica completa del virus.
- Por otra parte se recomienda la búsqueda y estudio del posible vector diseminador de este virus en la Reserva de La Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla. Realizar pruebas de RT-PCR a los posibles insectos vectores para determinar si transportan o no el virus.
- Se recomienda también el análisis de otras muestras de plantas de la familia Cactácea presentes en la Reserva de La Biosfera de Tehuacán-Cuicatlán, Puebla con síntomas de manchado clorótico para posteriormente realizar una identificación y comparación de las secuencias de los virus presentes en ellas.
- Realizar un RT-PCR a semillas de tetecho para detectar la posible presencia del *Tobamovirus* y confirmar la posible infección de estas plantas con este virus a través de este medio.

- También la realización de inoculaciones con macerados de la planta con daños de manchado clorótico a cactáceas libres de virus, realizar RT-PCR para los oligonucleótidos específicos para la CP y esperando la aparición de manchas cloróticas. Así podremos identificar con más certeza cuál de los virus presentes puede ser el causante de los manchados.

Literatura citada

Adams, I. P., Miano, D. W., Kinyua, Z. M., Wangai, A., Kimani, E., Phiri, N., Reeder, R., Harju, V., Glover, R., Hany, U., Souza-Richards, R., Deb Nath, P., Nixon, T., Fox, A., Barnes, A., Smith, J., Skelton, A., Thwaites, R., Mumford, R., Boonham, N. 2013. Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of *Maize chlorotic mottle virus* and *Sugarcane mosaic virus* causing maize lethal necrosis in Kenya. *Plant Pathology*, 62: 741–749. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2012.02690.x>

Alonso, B. B., Mora, A. G., Valdovinos, P. G., Ochoa, M. D. L., Rodríguez, L. E. De La Torre, A. R. 2015. Asociación de un Potexvirus como Agente Causal de Manchas Cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33:(1) 75-86.

Andrew S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Consultado en línea el 10 de Enero de 2018 en: “<http://www.bioinformatics.banraham.ac.uk/projects/fastqc>”

Arias M., S., S. Gama L. y LU. Guzmán C. 1997. Cactaceae A.L. Juss. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. UNAM, México. Fasc. 14

Arriaga, L., J.M. Espinoza, C. Aguilar, E. Martínez, L. Gómez y E. Loa (coordinadores). 2000. Regiones terrestres prioritarias de México (RTP-21). Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. México. 472-475. http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rtp_121.pdf

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. 1990 Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Chiu C. Y. 2013. Viral pathogen discovery. *Curr Opin Microbiol* 16: 468-478.
<https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.05.001>

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>

De La Torre, A. R., Salazar, S. M., Ruiz, M. R. 2007. Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41: 763-773.

De La Torre, A. R., Salgado, O. H., Salazar, S. M., Pallás, V., Sánchez, N. J. A., Valverde, R. A. 2016a. First Report of Schlumbergera virus X in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico. *Plant Disease*. 100(8):1799. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-15-1326-PDN>

De La Torre, A. R., Salgado, O.H., Salazar, S. M., Pallás, V., Sánchez, N. J. A., Valverde, R. A. 2016b. First Report of *Rattail cactus necrosis-associated virus* in Prickly Pear Fruit (*Opuntia albicarpa* Scheinvar) in Mexico. *Plant Disease*. 100(11):2339. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0554-PDN>

Dovas, C. L., Efthimiou, K., Katis, N. L. 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dl-containing primers along with homologous dG-containing primers. *Journal of Virological Methods*. 117:137-144. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.004>

Duarte, L. M. L., Alexandre, M. A. V., Rivas, E. B., Harakava, R., Galleti, S. R., Barradas, M. M. 2008. Potexvirus Diversity in Cactaceae from Sao Paulo state in Brazil. *Journal of Plant Pathology* 90(3): 545-551.

Flint, S.J., Racaniello, V.R, Rall, G.F, Skalka, A.M., Enquist L.W. 2015. *Foundations. Principles of Virology*. 1:17.

Genda Y., Sato K., Nunomura O., Hirabayashi T., Tsuda S. 2011. Immunolocalization of *Pepper mild mottle virus* in developing seeds and seedlings of *Capsicum annuum*. *Journal of General Plant Pathology*. 77:201-208.

Gergerich, R.C. y Dolja, V. V. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. Consultado en línea el 10 de Enero de 2018 en:
“<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/plantviruses.aspx>”

Giri, L. y Chessin, M. 1975. A severe strain of *Tobacco mosaic virus* from cactus. *Phytopathology* 65: 824-825. <https://doi.org/10.1094/Phyto-65-824>

Godínez-Álvarez, H. O. 2001. El tetecho: historia natural de una cactácea columnar del centro de México. *Ciencia: Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 52(1-2), 52-57.

Goodin, M. M. y Jackson, A. O. 2002. Rhabdoviridae, *Nucleorhabdovirus*. In *The Springer Index of Viruses*, 1st edn, pp. 1074-1077. Heidelberg, New York: Springer Verlag.

Guindon, S. y Gascuel, O. 2003. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood, *Systematic Biology* 52(5): 696-704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>

Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Regev, A. 2013. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nature Protocols*, 8(8): 1-43. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>

Hulo C, de Castro E., Masson P., Bougueleret L, Bairoch A., Xenarios I., Le Mercier P. 2011. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res*. Jan;39 (Database issue): D576-82.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2017. ICTV Reports: Genus *Nucleorhabdovirus*. Consultado en línea el 28 de Agosto de 2018 en:

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/negative-sense-rna-viruses/mononegavirales/w/rhabdoviridae/797/genus-nucleorhabdovirus

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2017. ICTV Reports: Genus *Tobamovirus*. Consultado en línea el 28 de Agosto de 2018 en: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/virgaviridae/672/genus-tobamovirus

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). 2002. ICTVdB Descriptions: *Tobamovirus*. Consultado en línea el 29 de Agosto de 2018 en: <https://web.archive.org/web/20070817200527/http://phene.cpmc.columbia.edu:80/ICTVdB/index.htm>

Izaguirre, M. M. L. y Marys, E. 1996. Interactions between Irradiance Levels and Cactus X Virus infection on the Crassulacean Acid Metabolism in *Nopalea cochenillifera* and *Acanthocereus tetragonus*. *Plants. Journal of Plant Physiology* 149: 35-42. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(96\)80170-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(96)80170-2)

Jackson, A. O., Dietzgen, R. G., Goodin, M. M., Bragg, J. N. y Deng, M. 2005. Biology of plant rhabdoviruses. *Annu Rev Phytopathol* 43, 623-660. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.011205.141136>

Kalb, T. 2004. Tomato diseases: *Tobacco mosaic virus*, *Tomato mosaic virus*. AVRDC – The World Vegetable Center. AVRDC Publication 04-594. Consultado en línea el 28 de Agosto de 2018 en: http://203.64.245.61/fulltext_pdf/FLYER/f0129.pdf

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P. y Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>

Kim, N. R., Hong, J. S., Song, Y. S., Chung, B. N., Park, J. W., Ryu, K. H. 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(1): 185-187. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1142-5>

Kenyon L, Kumar S, Tsai WS, Hughes J. Virus diseases of peppers (*Capsicum* spp.) and their control. *Adv Virus Res.* 2014;90:297–354. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801246-8.00006-8>

Koenig, R., Pleij, C. W. A., Loss, S., Burgermeister, W., Aust, H., Schiemann, J. 2004. Molecular characterization of *Potexvirus* isolated from three different genera in the family *Cactaceae*. *Archives of Virology* 149: 903-914. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0268-5>

Li, R., Hartung, J.S. 2007. Reverse transcription-polymerase chain reaction-based detection of plant viruses. *Current Protocols in Microbiology Supplement* 6, Wiley & Sons Inc:16C.1.1–1.9 <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc16c01s6>

Liou, M. R., Chen, Y. R., Liou, R. F. 2004. Complete nucleotide sequence and genome organization of a *Cactus virus X* strain from *Hylocereus undatus* (*Cactaceae*). *Archives of Virology* 149(5): 1037-1043. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0251-1>

Liu L., Li Y., Li, S. 2012. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2012:11. <https://doi.org/10.1155/2012/251364>

Malboeuf C. M., Yang X., Charlebois P., Qu J., Berlin A. M., Casali M., Pesko K. N., Boutwell C. L., DeVincenzo J. P., Ebel G. D., Allen T. M., Zody M. C., Henn M. R., Levin J. Z. 2013) Complete viral RNA genome sequencing of ultra-low copy samples by sequence-independent amplification. *Nucleic Acids Res* 41: e13. <https://doi.org/10.1093/nar/gks794>

Marston, D. A., McElhinney, L. M., Ellis, R. J., Horton, D. L., Wise, E. L., Leech, S. L., Fooks, A. R. 2013. Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics*, 14, 444. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-14-444>

Min, B. E., Chung, B. N., Kim, M. J., Ha, J. H., Lee, B. Y., Ryu, K. H. 2006. Cactus mild mottle virus is a new cactus-infecting tobamovirus. *Archives of Virology* 151(1): 13-21.

Mokili J. L., Rohwer F. and Dutilh B. E. 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Curr Opin Virol* 2: 63-77. <http://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.12.004>

McLaughlin, M. R., Barnett, O.W., Burrows, P.M., Baum R.H. 1981. Improved ELISA conditions for detection of plant viruses. *J Virol Methods* 3:13–25. [https://doi.org/10.1016/0166-0934\(81\)90018-5](https://doi.org/10.1016/0166-0934(81)90018-5)

Nagano, A. J., Honjo, M. N., Mihara, M., Sato, M., Kudoh, H. 2015. Detection of plant viruses in natural environments by using RNA-seq. *Methods in Molecular Biology* 1236: 89-98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_8

Pirovano, W., Miozzi, L., Boetzer, M., Pantaleo, V. 2014. Bioinformatics approaches for viral metagenomics in plants using short RNAs: model case of study and application to a *Cicer arietinum* population. *Frontiers in Microbiology* 5: 790. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00790>

Radford A. D., Chapman D., Dixon L., Chantrey J., Darby A.C., Hall N.. 2012. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *J Gen Virol*. Sep; 93: 1853–1868. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043182-0>

Roossinck, M.J., Martin, D.P., Roumagnac P. 2015. Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. *Phytopathology*. 105(6):716-27. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-14-0356-RVW>

Roossinck, M.J. 2016. *Virus: An illustrated guide to 101 incredible microbes*. USA: The Ivy Press Limited.

Salgado O.H., 2016. Caracterización molecular de virus asociados a manchas anulares en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. En México. Tesis de Maestría. UNAM. 72p

Sánchez, M. M., Lamas, N. S., Reis, M. B. A., Arieta-Sosa, J. G., Romano, E., Melo, F.L., Ribeiro, S. G. 2015. Genome Assembly of Schlumbergera Virus X Infecting Prickly Pear (*Opuntia cochenillifera*) in Brazil. *Genome Announcements* 3 (2): 1-2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00133-15>

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.

Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassman, M., Lightfoot, S., Menzel, W., Granzow, M, Ragg, T. 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 7: 3. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-7-3>

Tse, H., Tsang, A. K. L., Tsoi, H.-W., Leung, A. S. P., Ho, C.-C., Lau, S. K. P., Yuen, K.-Y. 2012. Identification of a Novel Bat Papillomavirus by Metagenomics. *PLoS ONE*. 7(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043986>

Valiente-Banuet, A., Arizmendi, M. D. C., Rojas-Martínez, A., & Domínguez-Canseco, L. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 12(01), 103-119. <http://doi.org/10.1017/S0266467400009330>

Valiente-Banuet, A., Rojas-Martínez, A., Arizmendi, M. D. C., & Davila, P. 1997a. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalaensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacan Valley, central Mexico. *American Journal of Botany*, 84(4), 452-452. <http://doi.org/10.2307/2446020>

Valiente-Banuet, A., Rojas-Martínez, A., Casas, A., del Coro Arizmendi, M., y Dávila, P. 1997b. Pollination biology of two winter-blooming giant columnar cacti in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Journal of Arid Environments*, 37(2), 331-341. <https://doi.org/10.1006/jare.1997.0267>

Valverde, R. A., Nameth, S. T., Jordan, R. L. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Diseases* 74: 255-258.

Van der Vlugt, R. A. A. y Berendesen M. 2002. Development of a general *Potexvirus* detection method. *Journal of Plant Pathology* 108: 367-371. <https://doi.org/10.1023/A:1015644409484>

Viral Zone, 2017. *Nucleorhabdovirus*. Consultado el 29 de Agosto de 2018 en: <https://viralzone.expasy.org/78>

Viral Zone, 2017. *Tobamovirus*. Consultado el 29 de Agosto de 2018 en: https://viralzone.expasy.org/51?outline=all_by_species

Viral Zone, 2017. Viral Zone News. Consultado el 10 de Enero de 2018 en: <https://viralzone.expasy.org/996>

Velasco, 2017. Enfoque metagenómico para la identificación de virus y viroides en durazno (*Prunus pérsica* L. Batsch) de la región centro de México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México. 70p.

Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10(1): 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>

Whitfield E. A., Falk W. B., Rotenberg D. 2015. Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Elsevier: Virology*. 479-480. 278-289. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.026>

Zhang Z., Zhang P., Li W., Zhang J., Huang F., Yang J., Bei Y., Lu Y. 2013 De novo transcriptome sequencing in *Frankliniella occidentalis* to identify genes involved in plant virus transmission and insecticide resistance. *Genomics* 101: 296-305. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.02.005>