



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS A MANCHAS ANULARES EN NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL.) EN MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biol. Héctor Salgado Ortíz

Tutor Principal de Tesis: Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz
FES Iztacala-UNAM

Comité Tutor:

Dr. Luis Padilla Noriega
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
FES Iztacala, UNAM

Ciudad de México, Abril 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS A MANCHAS ANULARES EN NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL.) EN MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Biol. Héctor Salgado Ortíz

Tutor Principal de Tesis: Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz
FES Iztacala-UNAM

Comité Tutor:

Dr. Luis Padilla Noriega
Facultad de Medicina, UNAM

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
FES Iztacala, UNAM

Ciudad de México, Abril 2016

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 15 de febrero de 2016, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **SALGADO ORTÍZ HÉCTOR**, con número de cuenta **305242200**, con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS A MANCHAS ANULARES EN NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) en México"**, realizada bajo la dirección del **DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ**:

Presidente: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Vocal: DRA. MARTHA MARTÍNEZ GARCÍA
Secretario: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
Suplente: M. en C. ALEJANDRO MONSALVO REYES
Suplente: DR. LUIS PADILLA NORIEGA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 07 de abril de 2016.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

AGRADECIMIENTOS

- **Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme realizar mis estudios de Maestría, y el desarrollo de este trabajo.**
- **Al CONACYT por la beca de manutención (no. 385463) recibida en el periodo 2014-2016.**
- **A mi tutor Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz por su asesoría, apoyo, comentarios, sugerencias, enseñanzas, etc. etc.**
- **A los miembros de mi comité Tutorial: Dr. Jorge E. Campos Contreras y Luis Padilla Noriega, por su apoyo y comentarios hacia mi trabajo y formación académica.**

Agradecimientos a título personal

A los miembros del Jurado:

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Dra. Martha Martínez García

M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes

Por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

- **A mi segunda casa, la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM**
- **A todos los profesores e investigadores que compartieron su conocimiento,**
- **A la parte administrativa del Posgrado que me ayudaron pacientemente con los trámites.**
- **A mis padres, hermanos, familiares y amigos por el apoyo incondicional**

Índice

RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	14
INTRODUCCIÓN.....	16
REVISIÓN DE LITERATURA.....	17
Género <i>Opuntia</i> y su importancia.....	17
Origen de Nopal Verdura (<i>Opuntia ficus-indica</i>).....	19
Enfermedades en nopal.....	20
Características y Diversidad de virus de Plantas.....	21
<u>Clasificación taxonómica</u>	21
<u>Morfología de la partícula viral</u>	21
<u>Características del genoma viral</u>	21
<u>Factores de variabilidad genética de los genomas virales</u>	23
<u>Modelos de Transmisión de virus</u>	23
Virus reportados en Cactáceas.....	24
Virus reportados en Cactáceas en México.....	25
Secuenciación masiva, una nueva técnica de identificación de virus, y otros microorganismos.....	25
<u>La RNA-seq como técnica para la identificación de virus de plantas</u>	26
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	28
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Recolecta de material.....	28
Separación por transmisión mecánica de virus a plantas indicadoras	

y diferenciales.....	28
Observación al microscopio electrónico del tipo de partículas virales.....	29
Ensayos serológicos de detección de proteína viral mediante Detección por inmunoadsorción ligado a enzimas en fase sólida de doble sándwich (DAS-ELISA).....	30
Extracción de ácidos nucleicos de origen viral.....	31
<u>Método modificado de Dellaporta</u>	31
<u>Extracción de ARN bicatenario replicativo de origen viral (ARN-dc) por el método de Valverde y análisis electroforético de ARN-dc</u>	31
<u>Extracción de ARN total por Trizol</u>	32
Amplificación por Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de fragmentos del genoma viral.....	32
Secuenciación, análisis y comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral con secuencias disponibles en el Genbank.....	35
Secuenciación masiva de RNA-seq de muestra de nopal verdura.....	35
Diseño y evaluación de oligonucleótidos específicos a partir del análisis de RNA-seq.....	37
RESULTADOS	37
Separación por transmisión mecánica de virus a plantas indicadoras y diferenciales.....	37
Observación al microscopio electrónico del tipo de partículas virales.....	40
Ensayos serológicos de detección de proteína viral mediante Detección por inmunoadsorción ligado a enzimas en fase sólida de doble sándwich (DAS-ELISA).....	41

Análisis electroforético de ARN-de de origen viral.....	42
Amplificación por Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de fragmentos del genoma viral.....	43
Secuenciación, análisis y comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral con secuencias disponibles en el Genbank.....	44
Secuenciación masiva del RNA-Seq de muestras de nopal verdura.....	45
Diseño y evaluación de oligonucleótidos específicos a partir del análisis de RNA-seq.....	46
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES.....	60
PERSPECTIVAS.....	61
REFERENCIAS.....	62

Lista de Figuras y cuadros

Cuadro 1. Lista de plantas utilizadas como indicadoras.....	30
Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos específicos usados para los ensayos de RT-PCR.....	33
Cuadro 3. Daños en plantas indicadoras de los ensayos de transmisión.....	40
Cuadro 4. Genomas virales ensamblados de los datos de RNA-seq.....	46
Figura 1. Daños en cladodios de nopal verdura.....	18
Figura 2. Tipos de morfologías de las cápsides proteicas de virus de plantas.....	22
Figura 3. Síntomas causados por macerados de nopal verdura en algunas de las plantas indicadoras.....	38
Figura 4. Segundo ensayo de transmisión mecánica para la separación de virus.....	39
Figura 5. Microfotografía tomada con microscopio electrónico de transmisión.....	41
Figura 6. Análisis electroforético de muestras de nopal verdura para detección de ARNdc en gel de poliacrilamida.....	42
Figura 7. RT-PCR de muestras de nopal verdura para detectar <i>Potexvirus</i> corridos en gel de agarosa al 1%.....	43
Figura 8. RT-PCR de muestras de nopal verdura para detectar <i>Tobamovirus</i> corridos en gel de agarosa al 1%.....	44
Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (10 réplicas), para el gen de la RdRp.....	48
Figura 10. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud para TGB.....	49
Figura 10. Continuación. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud TGB.....	50

Figura 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (10 réplicas), para el gen de la CP (GTR+G) en <i>Potexvirus</i> y <i>Carlavirus</i>	51
Figura 11. Continuación. Árbol filogenético por máxima verosimilitud.....	52
Figura 12. RT-PCR de muestras de nopal verdura para detección de los virus.....	53
Figura 13. RT-PCR de muestras de plantas indicadoras de los ensayos de transmisión....	53
Figura 14. Esquemas de la composición genómica de los virus.....	58

Glosario de abreviaciones

ADNcs: ADN de cadena sencilla

ARNcs+: ARN de cadena sencilla de sentido positivo de 5'-3'

ARNdc: ARN de doble cadena

ARNm: ARN mensajero

CarMV: *Carnation mottle virus*

CMMoV: *Cactus mild mottle virus*

CMV: *Cucumber mosaic virus*

CP: (*Coat Protein*) Proteína de la cápside

CVX: *Cactus virus x*

DAS-ELISA: (*Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de sandwich de doble anticuerpo

ITS: (*Internal transcribed spacer*), espaciador inter transcrito

M-MLV: *Moloney Murine leukemia virus*

MP: (*Movement Protein*), proteína del movimiento

OpVX: *Opuntia virus x*

ORF: (*Open Read Frame*) marco de lectura abierto

PVX: *Potato virus x*

RCNaV: Rattal 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*

SCV: *Saguaro cactus virus*

SOV: *Sammons Opuntia virus*

TMV: *Tobacco mosaic virus*

TGB: (*Triple gene block*), bloque de gen triple

TSWV: *Tomato spotted wilt virus*

ZyVX: *Zygocactus virus x*

RESUMEN

En recorridos de campo realizados en parcelas comerciales de cultivos de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) ubicadas en los municipios de San Martín de las Pirámides y Otumba, Estado de México, se observaron plantas moteadas, con manchas anulares de color amarillo intenso, así como manchas irregulares de diverso tamaño de color verde oscuro y aspecto aceitoso en las aureolas, acompañado frecuentemente por deformación severa y engrosamiento de cladodios o formación de costillas adicionales, similares a los causados por virus o patógenos similares desconocidos. El análisis microbiológico preliminar descartó la presencia de hongos o bacterias asociados a los daños observados, por lo que los objetivos del presente trabajo fueron la identificación y caracterización biológica y molecular de virus involucrados en los daños observados en plantas de nopal verdura. Pruebas de transmisión mecánica a plantas indicadoras, utilizando macerados de cladodios con daños, permitieron la separación de posibles virus. La observación bajo el microscopio electrónico de macerados de cladodios y de plantas con síntomas mostraron partículas virales flexibles y rígidas de diversos tamaños. Los ensayos serológicos (DAS-ELISA) utilizando un anticuerpo policlonal para detectar la proteína de la cápside (CP) del *Potexvirus Cactus virus X* (CVX), fueron positivos en los macerados de cladodios y las plantas indicadoras, previamente inoculadas con macerados de plantas con daños de anillos amarillos. Ensayos de RT-PCR para el gen de la RdRp de *Potexvirus* y *Tobamovirus* rindieron amplicones en el tamaño esperado, la secuenciación nucleotídica parcial de los productos indicó un 80% y 70% de identidad con secuencias de virus reportados en otras especies de cactus en el GenBank, respectivamente. En base a los anteriores resultados y la posible mezcla de virus en las muestras de nopal se realizó un análisis de secuenciación masiva RNA-Seq a partir de ARN total de muestras de nopal, para obtener los genomas

completos de los posibles virus. El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas por RNA-Seq, demostró la probable presencia de cuatro genomas de virus filamentosos de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva, dos virus de la familia *Alfalexiviridae*, del género *Potexvirus*: 1) *Schlumbergera virus X* (SchVX) y 2) *Opuntia virus X* (OpVX); un virus de la familia *Virgaviridae* del género *Tobamovirus*: 3) *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) y un virus de la familia *Betaflexiviridae* género 4) *Carlavirus* no identificado anteriormente. Ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos diseñados a partir de las secuencias virales obtenidas por RNA-Seq en muestras de nopal verdura y plantas indicadoras, rindieron amplicones del tamaño esperado para el gen de la CP de los 4 virus identificados, confirmando la identidad y presencia de los mismos. Se sugiere separar y caracterizar individualmente a los virus, en particular al nuevo *Carlavirus*, además comparar el viroma de plantas de *Opuntia* cultivadas y silvestres en México. Por otra parte, también se podría analizar la respuesta a nivel transcriptómico de la planta infectada con virus, comparado con plantas no infectadas.

ABSTRACT

A survey of viral diseases was conducted in commercial nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) orchards in San Martin de las Piramides and Otumba, Estado de Mexico, we observed mottle plants with ringspots of intense yellow, as an dark green irregular spots and oiled aspect areolar, accompanied frequently with severe deformation and thickening cladodes. The preliminary microbiological analysis discarded the presence of fungi or bacteria, so the aim this work was identification and molecular-biological characterization of virus that they were caused the symptoms on prickly pear. In mechanical transmission assays on indicator plants using diseased-macerated cladodes as inoculum, we isolate at

possible virus. The electron microscopy reveals viral-like flexible and rigid particles of several size. Serological assays (DAS-ELISA) using a polyclonal antibody to detect the capsid protein (CP) of *Potexvirus Cactus Virus X* (CVX), were positive in cladodes with symptoms and indicator plants previously inoculated with damaged nopal extract with. RT-PCR assays by RdRp gene of *Potexvirus* and *Tobamovirus* that yielded amplicons on expected size, the partial nucleotide sequence of amplicons of the indicated an 80% and 70% identity, respectively, with virus sequences reported in other species of cactus in the GenBank. Summarize the prior results and possible complex-viral on nopal, we realize a massive sequencing RNA-seq of RNA isolate of cladodes, were obtained complete genomes of possible virus. Bioinformatics analysis obtained by massive sequencing of RNAs from damaged plants (RNA-seq), supported the presumable presence of four filamentous single strand RNA of positive sense (ssRNA+) viruses, two of the *Alphaflexiviridae* family of *Potexvirus* genus: 1) *Schlumbergera Virus X* (SchVX) and 2) *Opuntia Virus X* (OpVX), a probable of the *Virgaviridae* family within the *Tobamovirus* genus, 3) *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV), and a virus of *Betaflexiviridae* family within 4) *Carlavirus* genus, not previously identified. RT-PCR assays with primers-designed of viral sequences obtained by RNA-seq on nopal plants and indicator plants samples that yielded amplicons expected sizes for CP gene supported the identity of four virus in nopal. It is suggested separate and characterize individually to the virus, in particular to the new *Carlavirus*, in addition to compare the viroma of *Opuntia* plants cultivated and wild in Mexico. On the other hand, it could also analyze the response at the level of the plant transcriptomic infected with virus, compared with non-infected plants.

INTRODUCCIÓN

En México la familia Cactaceae contiene 669 especies, dentro de las cuales se encuentran 518 que son endémicas al país (Guzmán *et al.*, 2003). Uno género importante dentro de esta familia, es *Opuntia*, que contiene alrededor de 300 especies a nivel mundial, y en México se reconocen 93 especies, donde es conocido popularmente como “nopal” o “tuna”. En nuestro país, dependiendo de la región geográfica, se cultivan para la producción de verdura *O. ficus-indica*, *O. duranguensis*, *O. megacantha*, *O. hyptiacantha.*, *O. leucotricha*; para el aprovechamiento de frutos, *O. ficus-indica*, *O. streptacantha*, *O. megacantha* y *O. joconostle*, y para el uso de forraje, leña, fertilizantes, cosméticos y adhesivos se utiliza *O. ficus-indica*, *O. duranguensis*, *O. robusta*, *O. amyclaea*, *O. megacantha*, *O. hiptiacantha.*, *O. leucotricha*. En la época prehispánica se usaba *O. cochenillifera* para cultivar al insecto cochinilla (*Dactylopius coccus*) usado para la obtención del tinte de la cochinilla (INEGI, 2007; Sánchez *et al.*, 2013).

El nopal está adaptado a bajos regímenes de agua, altas temperaturas y suelos pobres en nutrimentos, los cuales facilitan su crecimiento rápido, haciéndolo una buena elección para su cultivo (Nobel, 1994). El cultivo de nopal se ve afectado por diversos problemas, entre los que destacan las plagas y enfermedades. La mayoría de las enfermedades en nopal están asociadas a pudriciones causadas por bacterias y hongos, sin embargo es escasa la información sobre síntomas asociados a virus. En México en los últimos 10 años, se ha reportado la presencia de manchas irregulares y engrosamiento de los cladodios en diversos cultivares de nopal verdura y tunero (*O. ficus-indica* y *O. streptacantha*), las cuales se asociaron a la posible presencia de agentes virales (De La Torre *et al.*, 2007; Suaste *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2015).

En recorridos de campo realizados por parcelas comerciales de nopal verdura (*O. ficus-indica*) en los municipios de San Martín de las Pirámides y Otumba, Estado de México, se observaron numerosas plantas con cladodios con moteados (Figura 1 A), o con manchas anulares de color amarillo limón intenso (Figura 1 B), así como manchas irregulares de diverso tamaño de color verde oscuro y aspecto aceitoso en las aureolas (Figura 1 C). Frecuentemente también se observó la deformación severa y engrosamiento (Figura 1 D), además de formación de costillas adicionales en los cladodios (Figura 1 E). La evaluación de la incidencia de estos daños indicó una distribución de casi el 100% en las parcelas visitadas. Los cladodios con los daños descritos son eliminados durante la cosecha lo que de alguna forma reduce la producción de este cultivo. Análisis preliminares de diagnóstico realizados en el Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO (FES-IZTACALA-UNAM), no mostraron la presencia de hongos o bacterias asociados a los daños observados, por lo que se sospechó que estos pudieran ser causados por virus.

REVISIÓN DE LITERATURA

Género *Opuntia* y su importancia

El género *Opuntia* (Cactaceae) es nativo de Norteamérica, y su historia está cercanamente relacionada con el desarrollo de las civilizaciones mesoamericanas. En algunos países los nopales son importantes para controlar la erosión por agua y viento. Por ejemplo en el Norte de África, la especie *Opuntia ficus-indica* es usada para disminuir la erosión del suelo y como forraje para el ganado (Yahia, 2012). En México, esta misma especie por carecer de espinas de gran tamaño, se utiliza como vegetal, conocido comúnmente como “nopalitos” o nopal verdura. México es el principal productor y consumidor de *O. ficus-indica*, ya que alrededor de 72,000 ha del país son cultivadas para producir fruto, y aproximadamente 10,500 ha se cultivan con fines de producción de

verdura, la cual se lleva a cabo en la mayoría de los estados del país (Flores, 2003; Yahia y Saenz, 2011). El valor de la producción y las exportaciones del nopal asciende a millones de dólares anuales (Colunga, *et al.*, 1986).

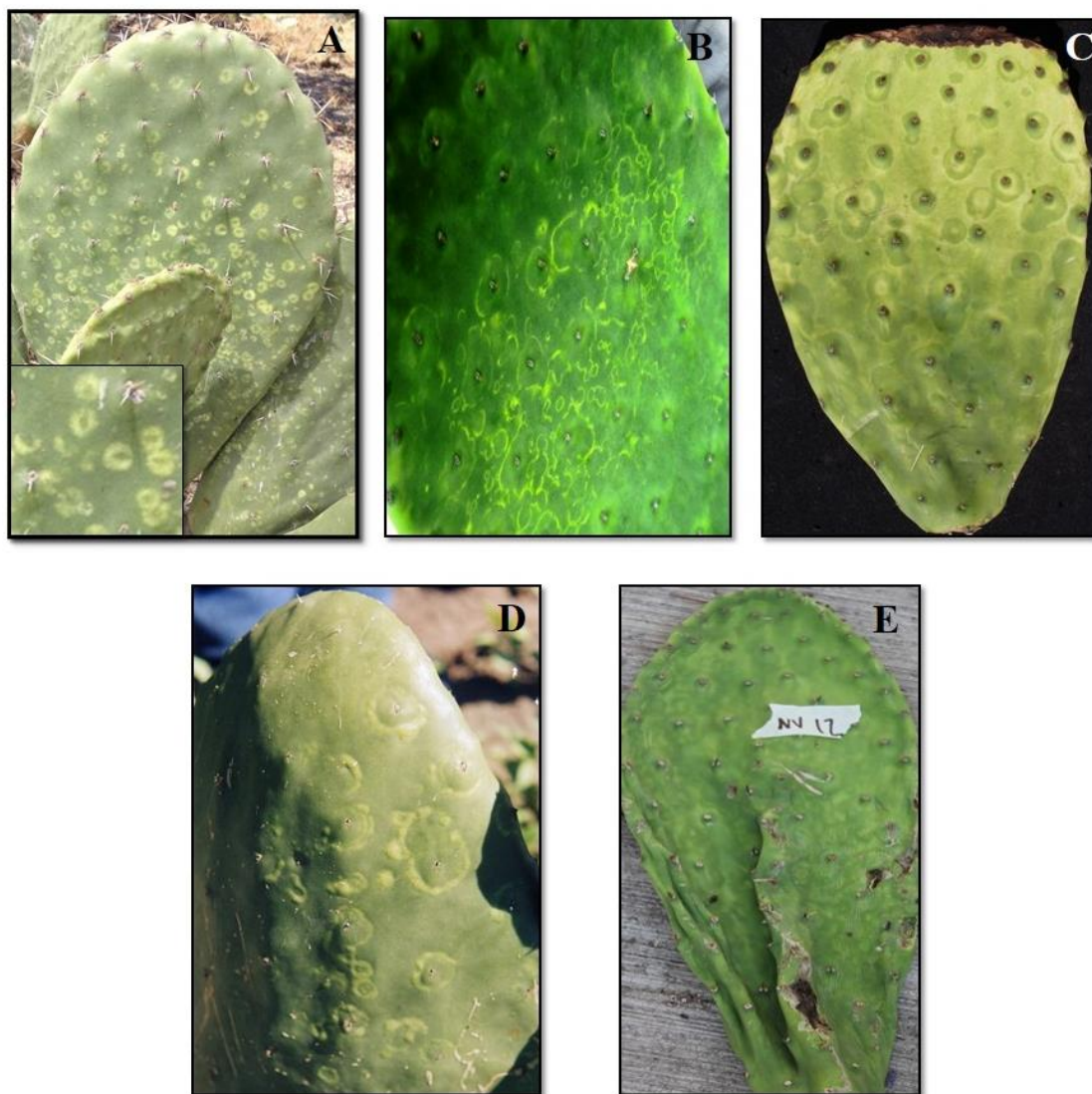


Figura 1. Daños en cladodios de nopal verdura consiste en moteados (A), manchas anulares de color amarillo limón intenso (B), manchas irregulares de diverso tamaño de color verde oscuro y aspecto aceitoso en las aureolas (C), deformación severa y engrosamiento (D), además de formación de costillas adicionales en los cladodios (E).

Por otra parte, en los últimos 40 años, se ha desarrollado una amplia gama de productos a partir de los frutos o el vegetal de plantas del género *Opuntia*, que van desde

suplementos alimenticios, productos farmacéuticos, ingredientes de cosméticos, forrajes y material de construcción. Además el nopal ha cobrado un gran auge en la investigación con aplicaciones industriales para las empresas farmacéuticas y alimenticias (Guzmán *et al.*, 2003).

Origen de Nopal Verdura (*Opuntia ficus-indica*)

Opuntia ficus-indica, es nativa y fue domesticada en México (Griffith, 2004). Al no encontrarse actualmente plantas silvestres de esta especie, se ha propuesto que derivó de *O. megacantha*, a partir de una variedad que perdió las espinas debido a la selección artificial durante la domesticación (Bendhifi *et al.*, 2013).

Sin embargo, debido al desarrollo de su monocultivo y su amplia distribución geográfica, no todos apoyan la idea anterior sobre su origen filogenético y se ha propuesto un posible origen polifilético, causado por fenómenos de hibridación entre distintas especies *Opuntia* cultivadas en jardines domésticos, y la poliploidía característica entre las tribus de *Opuntia*, la cual ha sido estudiada por ensayos citogenéticos (Majure *et al.*, 2012). Estudios filogenéticos de análisis Bayesianos de regiones ITS indican que probablemente *O. megacantha*, *O. tomentosa*, *O. streptacantha* y *O. ficus-indica* conforman un solo clado, con diferentes características morfológicas generadas por selección artificial de origen antropológico (Griffith, 2004). Aunque en México existen otras especies de *Opuntia* sin espinas o con espinas reducidas (*O. basilaris*, *O. compressa*, *O. lindheimeri* var. *laveis*, *O. rufida*, *O. stenopetala* var. *inermis* y *O. violacea* var. *santa-rita*) (Bravo, 1978), se puede identificar a *O. ficus-indica* por la forma de sus cladodios elípticos de gran talla, sus frutos grandes dulces y carnosos, y por encontrarse principalmente en ambientes modificados por el humano (Reyes *et al.*, 2005).

Enfermedades en nopal

Existen diversas causas que podrían afectar la producción de nopal, como deficiencias técnicas y tecnológicas, suelos bajos en nutrientes, o condiciones climáticas como heladas o exceso de precipitación pluvial (Márquez *et al.*, 2012). Otro factor que afecta la producción de nopal son las enfermedades causadas por distintos patógenos, como hongos, bacterias, fitoplasmas y virus (Yahia, 2012). Las características bioquímicas del nopal quizá facilitarían la susceptibilidad a las enfermedades, debido a la alta cantidad de humedad y riqueza de nutrientes en los tejidos vegetales. En México, el sistema extensivo de monocultivos y la reproducción vegetativa podría ser motivo de la aparición de numerosos problemas de plagas y enfermedades, entre ellas las causadas por cerca de 122 especies de insectos y numerosas especies de hongos y bacterias (Swart y Swart, 2003).

Entre las enfermedades de mayor relevancia se encuentran las causadas por hongos que producen pudrición de raíz, tallo y cladodios como por ejemplo *Diplodia* sp (Méndez *et al.*, 2008) y por otra parte las bacterias se asocian a pudriciones blandas, por ejemplo por *Erwinia* spp y *Pseudomonas viridiflora* (Campos, 1996).

También se ha señalado la ocurrencia de fitoplasmas (bacterias que carecen de pared celular), los cuales son asociados a la deformación e hinchazón de las pencas, tallos amarillos, mosaicos y coloraciones púrpuras, que les confieren un valor económico adicional para los coleccionistas (Suaste *et al.*, 2012; Maliarenko y Mudrak, 2013).

Sin embargo los mosaicos y deformaciones de pencas también se han asociado a la presencia de agentes virales, los cuales complican el diagnóstico, y el manejo de estrategias de fitosanidad (Alonso *et al.*, 2015).

Características y Diversidad de virus de Plantas

Clasificación taxonómica

La clasificación reciente de virus engloba siete clases independientes, de acuerdo al sistema de Baltimore de 1971. Esta clasificación está basada en las propiedades de los ácidos nucleicos de la partícula vírica: 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); además de agruparse en Orden, Familia, Género y Especie. La clasificación de los virus es revisada por el *International Committee on Taxonomy of Virus* (ICTV).

Morfología de la partícula viral

Existen dos simetrías en la morfología de la cápside proteica de virus de plantas. La primera simetría conocida como elongada que a su vez comprende dos formas, de varilla rígida (Figura 2a) con tamaños alrededor de 300 nm de largo, y la de varilla flexible con un tamaño aproximado de 500 a 2000 nm (Figura 2b). Por otra parte, el segundo tipo es la icosaédrica (casi esférica) con un tamaño típico de 30 nm (Figura 2c), en donde encontramos dos variantes, los viriones de forma baciliforme (Figura 2d), y los de forma gemela (Walkey, 1991), estos últimos compuestos por la unión de dos icosaédros incompletos, partícula típica de la familia *Geminiviridae* (Figura 2e).

Características del genoma viral

La mayoría de los virus que afectan a plantas poseen un genoma de ARN de cadena sencilla de sentido positivo de 5'-3' (ARNcs+), que comprenden el grupo IV de la Clasificación de Baltimore, por ejemplo las familias *Virgaviridae*, *Bromoviridae*, *Betaflexiviridae* y *Alfalexiviridae* entre otras. Pocos virus de plantas poseen ARN de

cadena sencilla de sentido negativo (ARNcs-), como por ejemplo los virus de la familia *Bunyaviridae*. La familia *Reoviridae* es la más grande de virus de ARN de doble cadena (ARNdc), mientras que los *Caulimoviridae* es la única familia de virus de ADN de doble cadena que pasan por un intermediario de ARN en su replicación (Gergerich y Dolja, 2006).

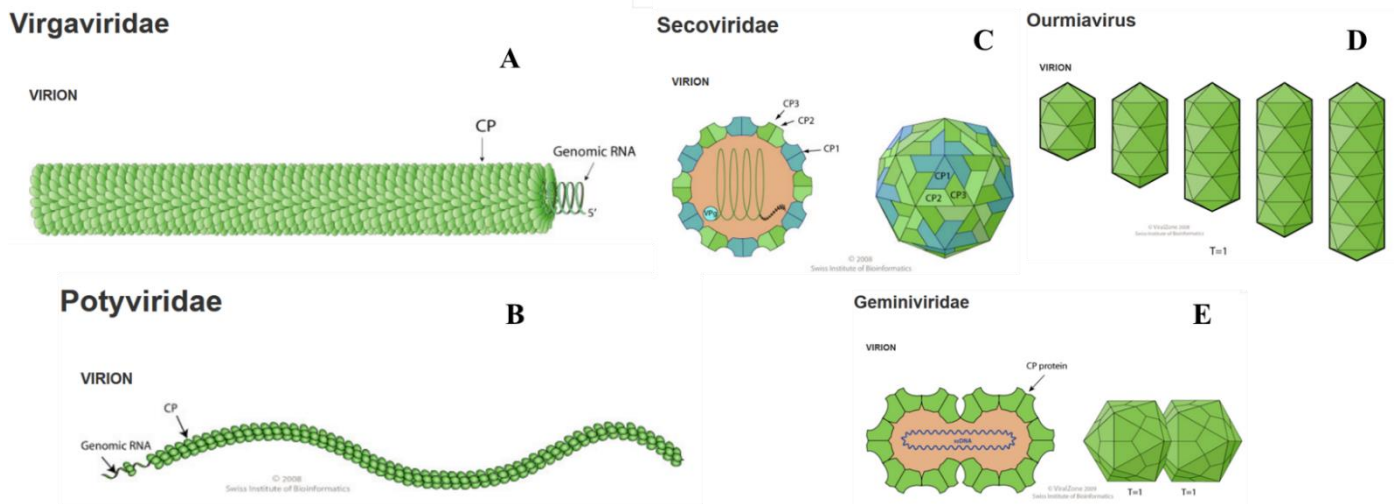


Figura 2. Tipos de morfologías de las cápsidas proteicas de virus de plantas, las elongadas: **A.** varillas rígidas, como la familia *Virgaviridae*; **B.** varillas flexibles, como la familia *Potyviridae*. Y las **C.** icosaédricas como la familia *Secoviridae*, además de sus dos variantes, las tipo **D.** baciliformes como el género *Ourmiavirus*; y las **E.** gemelas, como la familia *Geminiviridae*. Tomados de Viralzone, consultado el día 22 de marzo del 2016 en: <http://viralzone.expasy.org>.

Por otra parte los verdaderos virus de ADN de cadena sencilla (ADNcs), están representados por la familia *Geminiviridae*, de gran importancia económica, y que en su ciclo replicativo pasan por una fase intermedia de ADN de doble cadena. En base a la diversidad en la naturaleza del material genético de virus, las vías replicativas son también distintas entre diferentes virus (Gergerich y Dolja, 2006).

Como en todos los organismos, la información de la replicación está contenida en los genes del virus. Generalmente en el caso de los virus de ARN de cadena sencilla de

sentido positivo, poseen un gene que codifica la proteína usada en la replicación para la producción de ácidos nucleicos (*RNA-dependent RNA-polimerase, RdRp*), además tienen otros genes para proteínas estructurales, como la o las proteínas que conforman la cápside (*Coat Protein, CP*), y otros componentes de la partícula viral, también se encuentran los genes que codifican proteínas de movimiento (*Movement Protein, MP*) implicadas en el transporte del virus en las células contiguas a la que está infectando (Hull, 2014).

Factores de variabilidad genética de los genomas virales

Por otra parte, la carencia de un sistema de reparación de errores, en las enzimas de replicación de virus, provoca que sus tasas de mutación sean muy altas. Generalmente se acepta, que por cada genoma viral replicado, se produce una mutación, esto sumado a las grandes concentraciones de genomas virales replicados, da como resultado una amplia variabilidad de secuencias genómicas pertenecientes al mismo virus, generando lo que en 1989 se acuñó como teoría de cuasi-especie (Eigen, *et al.*, 1989). Otro factor a consideración en la variabilidad genética de los virus de ARNcs de sentido positivo, es la recombinación entre ARN-ARN, ya sea entre virus de la misma especie o distinta, o incluso entre el ARN de la planta (Bujarski, 2013). En algunos virus la frecuencia de recombinación entre regiones homologas del genoma es muy alta, que al igual que las tasas de mutaciones, se considera a cada una de las réplicas del genoma viral como una quimera natural (Urbanowicz *et al.*, 2005). Todas estas variantes genómicas permiten la flexibilidad hacia las presiones selectivas, produciendo cepas más virulentas, o resistentes al sistema de defensa de la planta.

Modelos de Transmisión de virus

La transmisión de los virus vegetales está asociada principalmente a tres fenómenos. El primero es la transmisión mecánica por contacto físico entre una planta infectada y otra

sana, debido a diversos factores; por ejemplo, el viento o la lluvia, las heridas provocadas por animales herbívoros, o la manipulación del humano en los cultivos, durante las cosechas o en la realización de injertos. El segundo es la transmisión vertical, que ocurre a través de las semillas o el polen de plantas infectadas. Por último, el ocasionado por organismos vivos llamado vectores, en los que se encuentran: los artrópodos herbívoros, nemátodos y hongos fitófagos (Gergerich y Dolja, 2006). La transmisión por vector es un proceso sumamente específico, debido a las complejas relaciones que existen entre el virus y su vector, llegando a casos en donde el virus se replica dentro del organismo vector, provocando así que el organismo lo transmita mientras viva (Sherwood *et al.*, 2003), o incluso que el virus produzca una proteína específica para asegurar la adhesión de partículas víricas a los estiletes de los insectos, y así generar la transmisión del virus mientras el insecto siga alimentándose (Pirone y Blanc, 1996).

Virus reportados en Cactáceas

Diversas especies de virus se han reportado que infectan a plantas silvestres y cultivadas de la familia Cactaceae, como el *Carmovirus*, *Saguaro cactus virus* (SCV) reportado en *Carnegiea gigantea* (Milbrath y Nelson, 1972) y el *Tospovirus* (familia *Bunyaviridae*), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) que fue reportado en *Schlumbergera truncata* (Hausbeck y Gildow, 1991). Otros virus comunes en cactáceas son los del género *Tobamovirus* (familia *Virgaviridae*), como el *Sammons' Opuntia virus* (SOV), que infecta regularmente a *Opuntia engelmannii*, *O. vulgaris* y *O. basilaris* (Giri y Chessin, 1975), el *Cactus mild mottle virus* (CMMoV) aislado de *Gymnocalycium mihanovichii* (Min *et al.*, 2006), y el *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) reportado en *Aporcactus flagelliformis* (Kim *et al.*, 2012). Por otra parte, también se han reportado con mayor frecuencia los pertenecientes al género *Potexvirus*: el *Cactus virus X* (CVX), *Zygocactus*

virus X (ZyVX), *Opuntia virus X* (OpVX) y *Schlumbergera virus X* (SchVX) los cuales han sido reportados infectando solos o en mezcla en *Acanthocereus tetragonus*, *Hylocereus undatus*, *Schlumbergera truncata*, *S. bridgesii*, *Opuntia tuna* y *Opuntia cochenillifera* (Izaguirre y Marys, 1996; Koenig *et al.*, 2004; Liou *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2008; Sanches *et al.*, 2015).

Virus reportados en Cactáceas en México

En México solamente se ha asociado la presencia de manchas pequeñas circulares de color amarillo a un posible virus perteneciente a los *Tobamovirus* en plantas de nopal tunero (*O. streptacantha*) (De la Torre *et al.*, 2007), además de daños en forma de manchas amarillas y adelgazamiento del cladodio asociados a un posible Potexvirus en cultivares de la ciudad de México (Suaste *et al.*, 2012; Alonso *et al.*, 2015). Sin embargo los resultados de estos reportes no fueron concluyentes, al no lograr la identificación precisa de estos posibles virus.

Secuenciación masiva, una nueva técnica de identificación de virus, y otros microorganismos

Hace 15 años se tenía la certeza que todos los microorganismos presentes en las plantas (bacterias, hongos y virus) eran patógenos, aun cuando en 1866 De Bary observó células microbianas en tejido sano de plantas al microscopio, fue hasta finales del siglo pasado cuando se acuñó el termino endófito, para describir a toda célula microbiana presente en tejido vegetal que no es patogénica, y que están asociados en el metabolismo de requerimientos de las plantas, como es el caso de las micorrizas, o incluso en el control de plagas patógenas y promoviendo el crecimiento de la planta, determinando entonces como un microbiana en la planta. Ahora se sabe que las interacciones entre el microbioma y las células de la planta podrían estar sufriendo modificaciones por condiciones ambientales, o

inclusive que coexista un mecanismo evolutivo gobernado por estas mismas interacciones (Andreote *et al.*, 2014). Por igual que los endófitos, se han observado virus que mantienen una interacción de mutualismo (basada en protección contra el ambiente, contra patógenos, y control de la respuesta de la planta a necesidades nutrimentales) con su planta huésped, lo cual viene a cambiar completamente la idea de que todos los agentes virales son patogénicos (Roossinck, 2011).

Con el advenimiento de enormes cantidades de información en forma de secuencias de ácidos nucleicos generado por el desarrollo de nuevas tecnologías de secuenciación masiva (*Next-Gen Sequencing*), el estudio de los microbiomas ha ganado gran auge en la comunidad científica, pues permite el análisis e identificación de endófitos presentes en el tejido, además de la evaluación sobre el papel que desarrollan durante infecciones patogénicas o etapas de estrés (Tian *et al.*, 2015).

La RNA-seq como técnica para la identificación de virus de plantas

Por otra parte, el empleo de la secuenciación masiva de nueva generación dirigida a ARN, RNA-seq, ha revolucionado la identificación de virus, tanto de plantas como en otros organismos, generando el descubrimiento de virus nuevos, sin la necesidad de ningún conocimiento previo (Roossinck *et al.*, 2015). En el caso de los virus de plantas, en donde la mayoría es de ARN, lo cual facilita su identificación por RNA-seq, generando un panorama más amplio sobre el viroma presente en el huésped (Nagano *et al.*, 2015).

Diversos trabajos se han realizado con el propósito de identificar agentes virales, en plantas donde las técnicas más recurrentes no han logrado identificar a los agentes, principalmente, por la naturaleza desconocida del virus, lo cual limita el uso de metodologías como ELISA, microscopía electrónica, rango de hospedantes y PCR con oligonucleótidos degenerados, o específicos para la variante del virus. La metodología más

recurrente es hacer una secuenciación masiva de ARN de pequeño tamaño (*RNA small*), el cual está implicado en el silenciamiento del sistema de defensa del huésped (Pirovano *et al.*, 2014).

De esta manera, se ha obtenido la identificación de un nuevo virus perteneciente al género de los *Cucumovirus* en la planta ornamental *Liatris* de la familia Asteraceae (Adams *et al.*, 2009). También se han realizado secuenciaciones masivas en muestras de cultivares de importancia económica, como la uva, en donde se reportaron cuatro virus ya caracterizados, y un nuevo virus relacionado con a la familia *Chrysoviridae* (Coetzee *et al.*, 2010), además de otro virus nuevo perteneciente al género de los *Marafivirus* (Al Rwahnih *et al.*, 2009). Otro cultivo evaluado es el camote (*Ipomoea batatas*) donde se reportó la presencia de nuevos virus pertenecientes a los géneros *Badnavirus* y *Maestrevirus* (Kreuze *et al.*, 2009), y en Honduras y Guatemala, reportaron 5 virus: los *Potyvirus Sweet potato feathery mottle virus* y el *Sweet potato virus C*, el *Crinivirus Sweet potato chlorotic stunt virus*, el *Begomovirus Sweet potato leaf curl Georgia virus*, y el *Badnavirus Sweet potato badnavirus B* (Kashif *et al.*, 2012). En México se identificó un nuevo *Tobamovirus* nombrado provisionalmente como *Tomato mottle mosaic virus*, presente en plantas de jitomate, colectadas en Jalisco (Li *et al.*, 2013)

Por lo tanto, la RNA-seq representa una herramienta universal, con buenos resultados, para el diagnóstico e identificación de virus. En base a estos antecedentes y a la amplia diversidad de los daños observados en las plantas de nopal verdura, así como por su incidencia, se planteó la posibilidad de que estos daños fueran causados por diferentes especies de virus (o patógenos similares) o de variantes altamente patogénicas o incluso una asociación sinérgica entre especies de virus. Por lo cual se planteó la siguiente hipótesis y objetivos.

HIPÓTESIS

Los daños de manchas en forma de anillos irregulares amarillos y verdes, y la deformación severa, observados en cladodios de Nopal verdura (*O. ficus-indica*) colectados en los Municipios de San Martín de las Pirámides y Otumba, Estado de México, estarán asociados a la presencia de virus de origen desconocido.

OBJETIVOS

Identificar y caracterizar a los posibles virus asociados a las manchas en forma de anillos irregulares, de color verde oscuro y amarillo, y la deformación de los cladodios en el nopal verdura.

MATERIALES Y MÉTODOS

En recorridos de campo en parcelas comerciales de nopal verdura (*O. ficus-indica*), se observaron daños que consistieron en moteados, manchas anulares de color amarillo o verde oscuro de aspecto aceitoso y deformación severa de los cladodios.

Recolecta de material

Se recolectaron cladodios de distintas plantas de nopal verdura de los municipios de San Martín de las Pirámides y Otumba, Estado de México (19°44'00''N, 98°49'00''O, 19°72'40''N, 98°75'38''O, 2300 msnm), con los daños descritos anteriormente. Se llevaron los cladodios al laboratorio para su posterior análisis. Los cladodios se mantuvieron a temperatura de laboratorio para realizar cada método y posteriormente se mantuvieron en congelación a -20 °C.

Separación por transmisión mecánica de virus a plantas indicadoras y diferenciales

Se realizaron ensayos de transmisión mecánica utilizando macerados de cladodios de nopal verdura con daños, en hojas verdaderas de plántulas sanas de 11 especies

indicadoras (Cuadro 1), frotando con hisopos de algodón el macerado sobre la hoja previamente espolvoreada con carborundum de 600 mallas. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero (temperatura 25-35 °C, 70% de humedad relativa y fotoperiodos de 12 hrs Luz), hasta por 30 días registrando el desarrollo de síntomas visibles. Se separaron las plantas indicadoras que presentaron lesiones locales o con mosaicos (síntomas sistémicos) después del periodo de incubación en el invernadero, y se maceraron sus hojas para inocular otras once plantas indicadoras sanas (cuadro 1), para obtener aislados puros de virus. Se inocularon tres plantas por especie (n=3) y se repitió en tres ocasiones, en base al método ya descrito (Dijkstra y De Jager, 1998). Posteriormente se repitió un ensayo de transmisión con el objetivo de separar en estado puro los virus presentes en los cladodios de nopal, solamente se usaron cuatro plantas: *C. amaranticolor*, *C. quinoa*, *D. stramonium* y *N. rustica*. Debido a la dificultad para producir plantas de nopal desde semillas, o usar plantas certificadas como libres de virus, no se realizaron ensayos de transmisión mecánica de virus en esta especie.

Observación al microscopio electrónico del tipo de partículas virales

En rejillas de cobre cubiertas con Formvar 15/95E (Sigma, USA) se colocaron 50 µL de macerado de epidermis de cladodios con daños de manchas anulares, y macerados de hojas de plantas indicadoras que presentaron lesiones locales. A las rejillas se les agregó glutaraldehído como fijador y acetato de uranilo como medio de contraste. La observación, la medición y la toma de microfotografías de las partículas virales se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión Mod. JEOL 100 CX (Dijkstra y De Jager, 1998).

Cuadro 1. Lista de plantas utilizadas como indicadoras, para el ensayo de transmisión mecánica, en rango de hospedantes tres plantas por especie (n=3) se usó como control negativo, macerados de hojas sanas de *N. rustica*.

Plantas Indicadoras	
Amaranthaceae	<i>Chenopodium quinoa</i>
	<i>Chenopodium amaranticolor</i>
	<i>Gomphrena globosa</i>
Solanaceae	<i>Datura stramonium</i>
	<i>Nicotiana benthamiana</i>
	<i>N. rustica</i>
	<i>N. glutinosa</i>
	<i>N. occidentalis</i>
	<i>N. clevelandii</i>
	<i>Capsicum annuum</i> L. cv ancho
	<i>Solanum esculentum</i>

Ensayos serológicos de detección de proteína viral mediante Detección por inmunoadsorción ligado a enzimas en fase sólida de doble sándwich (DAS-ELISA)

Se utilizó la técnica (DAS-ELISA) para detectar virus en las muestras de campo de nopal y en las plantas indicadoras (Clark y Adams, 1977). Se emplearon los anticuerpos policlonales comerciales (Agdia, Inc., Elhart, IN) para la detección de: *Potato virus X* (PVX, *Potexvirus*), *Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*), *Carnation Mottle virus* (CarMV, *Carmovirus*), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Tosposvirus*) y el *Cactus Virus X* (CVX, *Potexvirus*) (NEOGEN EUROPE, USA) (Hausbeck y Gildow, 1991; Brunt *et al.*,

1996; Duarte *et al.*, 2008).

Se seleccionaron estos virus para su detección por DAS-ELISA considerando que afectan a las cactáceas y que podrían tener reacción serológica con los posibles virus que infectaron cladodios de nopal verdura con los daños descritos. La absorbancia se registró en un microlector a 492 nm, a los 20 y 60 minutos posteriores a la adición del sustrato, la reacción se consideró positiva si la absorbancia era el doble que la lectura del testigo negativo. Se usaron macerados de plantas *Nicotiana tabacum* sanas como testigo negativo.

Extracción de ácidos nucleicos de origen viral

Para optimizar la calidad y pureza de las extracciones de ácidos nucleicos, por medio de la eliminación de polisacáridos presentes en el tejido de nopal, se realizaron los métodos de Dellaporta modificado, de Valverde y de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) descritos a continuación.

Método modificado de Dellaporta

Se realizó la extracción de ácidos nucleicos totales, por medio del método modificado de Dellaporta *et al.*, 1983 a partir de 1 g de tejido tomado de la dermis de los cladodios, macerado en buffer de extracción (Urea 7M, NaCl₂ 0.35M, Tris-base 0.05M, EDTA 0.02M y Lauryl-sarcosina 1%). Se separó la fase orgánica, por medio de fenol-cloroformo v/v y centrifugación a 12 000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con acetato de Amonio 10M e Isopropanol, y centrifugación a 12 000 rpm. La pastilla se lavó con etanol al 70%, y se resuspendió en 30µL de agua doble destilada.

Extracción de ARN bicatenario replicativo de origen viral (ARN-dc) por el método de Valverde y análisis electroforético de ARN-dc

La extracción y el análisis del ARN viral de doble cadena se realizó según el método de Valverde *et al.*, 1990, a partir de 500 mg de tejido, tomado de la dermis de los

cladodios macerado en Buffer STE 1x (NaCl₂ 0.1M, Tris-base 0.05M y EDTA 0.001M). Posteriormente se realizó la separación de la fase orgánica por medio de Acido Fenico: STE 1x (1:1, peso: volumen), SDS 10%, Bentonita 2% y centrifugación (8000 rpm). Después se separaron los ácidos nucleicos de mayor tamaño (ADN y ARN de la planta) por medio de una columna de celulosa CF 11 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) la cual fue eluída con etanol, quedando solamente ARN de doble cadena de origen viral(ARNdc). Posteriormente se precipitó el ARNdc con Acetato de Sodio 3M, centrifugando a 8000rpm, y se resuspendió la pastilla en 200 µL de agua doble destilada. Las extracciones se analizaron por electroforesis en un gel no desnaturizante de poliacrilamida (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO.) al 6%, a 100 V por 2.5 h. Se incluyó como marcador de peso molecular, el ARNdc del *Cucumber mosaic virus* (CMV que contiene fragmentos de 3.4, 3.1, 2.2 ,1.0 y 0.35 kilobases).

Extracción de ARN total por Trizol

Se obtuvieron extracciones de ARN total de origen viral y del huésped, mediante el kit de Trizol siguiendo las indicaciones del fabricante. Brevemente, se maceró el de tejido, en un buffer de extracción, y se separó la fase orgánica y acuosa en presencia de cloroformo, para después precipitarlo con isopropanol y resuspenderlo finalmente en H₂O libre de nucleasas.

Amplificación por Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de fragmentos del genoma viral

Para la identificación de los virus reportados con mayor frecuencia en cactus (*Tobamovirus* y *Potexvirus*), se desarrollaron ensayos de transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando varios pares de oligonucleótidos específicos (cuadro 2). Para este fin se usaron dos kits: el primero, fue en dos pasos con la

Transcriptasa reversa M-MLV (Promega, Madison, WI) y la TaqPol Platinum; y el segundo en un solo paso, Superscript III One-step (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos específicos usados para los ensayos de RT-PCR, **1.** Los oligonucleótidos para RdRP *Tobamovirus* son degenerados y contienen el nucleótido Inosine, para mejorar el apareamiento con la cadena viral de ARN (Dovas *et al.*, 2004). **2.** Oligonucleótidos degenerados para el gen de la RdRp de Potexvirus (Van der Vlugt y Berendesen, 2002). **3.** Oligonucleótidos para el Gen de la CP de CVX y OpVX (no publicadas).

	Nombre	Ubicación (nt)	Secuencia	Tamaño aprox.
1	TobRT up1	4020-4034	5'-GAR TAY SCI GCI YTI CAR AC-3'	550 pb
	TobRT do2	4569-4589	5'-BGC YTC RAA RTT CCA-3'	
	TobN up3	4029-4052	5'-GGC GYT GCA RAC IAT HGT ITA YCA-3'	450 pb
	TobN do4	4407-4427	5'-GTR TTI CCI ATR AAI GTI ACR TC-3'	
2	RdRp Potex F5	3265-3284	5'-CAY CAR GCM AAR GAY GA-3'	735 pb
	RdRp Potex R1	4001-3982	5'-TCA GTR TTD GCR TCR AAR GT-3'	
	RdRp PotexR2	3848-3832	5'-AGC ATR GCN SCR TCY TG-3'	584 pb
3	CVX CP Forward	5840-5862	5'-ATG TCT ACT GGA GTC CAG TC-3'	500 pb
	CVX CP Reverse	6491-6514	5'-CTA CTC AGG GCC TGG GAG AAA TTG-3'	
	OpVX CP Forward	5863-5883	5'-ATG GCC TCC ACT CCA CAG ACC-3'	500 pb
	OpVX Reverse	6539-6562	5'-GAG TAG TGT CTT ATT CAG GAC CTG-3'	

En el caso de los *Tobamovirus* se usaron dos pares de oligonucleótidos degenerados, que flanquean una región conservada del gen de la replicasa, TobRT up1 y TobRT do2 para un primer ensayo de RT-PCR en un solo paso con las condiciones de 5 ciclos de 95°C por 30 seg de desnaturalización, 43°C por 30 seg de alineamiento, 68°C por 15 seg de extensión y posteriormente 35 ciclos de 95°C por 30 seg de desnaturalización, 46°C por 30

seg de alineamiento, 68°C por 15 seg de extensión, que rindió un amplicon de 540 pb. Posteriormente se usó el segundo par de oligonucleótidos TobN up3 y TobN do4, para un PCR anidado utilizando la Taq Pol Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) con las condiciones: 2 ciclos de 95°C por 20 seg de desnaturalización, 51°C por 15 seg de alineamiento, y 72°C por 15 seg de extensión; después 26 ciclos de 95°C por 20 seg de desnaturalización, 61°C por 15 seg de alineamiento, 72°C por 15 seg de extensión, lo que rindió un amplicón de 450 pb (Dovas, *et al.*, 2004).

Se utilizaron dos pares de oligonucleótidos específicos para el grupo *Potexvirus* que amplifican segmentos conservados del gen de la replicasa (RdRp) el Potex F5/Potex R1 que rindió un amplicon de 735 pb y Potex F5 /Potex R2 que rindió un amplicon de 584 pb (Van der Vlugt y Berendesen, 2002). Las condiciones fueron: 30 ciclos a 94 °C por 30 seg de temperatura de desnaturalización, 51.5 °C por 1 min de temperatura de alineamiento, y 72° C por 1 min de extensión cuando se usó la Taq Pol Platinum o 68° C de extensión cuando se usó el kit Superscript III One-step. Por otro lado, se usaron los oligonucleótidos específicos para la proteína de la cápside (CP) de los *Potexvirus Cactus Virus X* (CVX) CVX CP Forward/CVX CP Reverse, y *Opuntia virus X* (OpVX) OpVX CP Forward/OpVX CP Reverse, que fueron diseñados en el laboratorio mediante análisis de secuencias de *Potexvirus*, y que rindieron un amplicon de 500 pb aproximadamente. Se utilizaron las condiciones siguientes: 30 ciclos a 94 °C por 30 seg de temperatura de desnaturalización, 53 °C por 1 min de temperatura de alineamiento, y 72 °C ó 68 °C por 1 min de extensión. Los productos de RT-PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1 % (100 V, 25 min) y su peso molecular se calculó por comparación con el marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Secuenciación, análisis y comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral con secuencias disponibles en el Genbank

Los productos de la RT-PCR del tamaño esperado se separaron de los geles de agarosa y se purificaron utilizando el kit Wizard (PROMEGA, USA). Se determinó la secuencia directa de nucleótidos de los amplicones de interés utilizando un secuenciador Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) de 16 capilares que utiliza el método BIG DYE (*Terminator fluorescence based sequencing*) para el análisis de secuencia (Sanger *et al.*, 1977). Las secuencias obtenidas de mejor calidad se depositaron en el GenBank/NCBI y se compararon con las disponibles en la misma base de datos por medio de BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

Secuenciación masiva de RNA-seq de muestra de nopal verdura

Debido a las evidencias de un posible complejo viral presente en las muestras analizadas con los primeros ensayos de diagnóstico (transmisión mecánica, microscopía electrónica, RT-PCRs), se realizó la secuenciación masiva de RNA-Seq de muestras de nopal verdura con el propósito de obtener genomas completos de todos los posibles virus presentes en nopal. Las muestras obtenidas mediante Trizol de cladodios con daños se enviaron 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. Debido a que los genomas de los *Potexvirus* y algunas otras familias de virus (Grupo IV en la Clasificación de Baltimore de 1971, ARN monocatenario de sentido positivo) poseen en su extremo 3' un segmento de Poli-A, se utilizó el método de RNA-Seq dirigido a ARNm (Wang *et al.*, 2009) el cual delimita la secuenciación solamente de ARNs

que poseen 3'-Poli-A, como es el caso de los ARNm y el genoma de algunos virus con 3'-Poli A. 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).

Se evaluó la calidad de los datos obtenidos (lecturas o *reads*) por medio del software FASTQC (Andrews, 2010). Las *reads* se analizaron por comparación con genomas completos (Mapeo) obtenidos del GenBank (JF937699.1 *Cactus Virus X*, JF930326.1 *Zygocactus Virus X*, NC011659 *Schlumbergera Virus X*, NC006060 *Opuntia virus X*, NC_009642.1 *Bell pepper mottle tobamovirus*, NC016442 *Rattail cactus necrosis associated virus*, NC001780 *Saguaro cactus virus*) utilizando el software SMALT (Wellcome Trust Sanger Institute, Genome Research Limited) y Geneious 7.1 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012). Por otra parte se realizó el 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; 1997) para la búsqueda de otros virus. Se construyeron árboles filogenéticos por máxima verosimilitud, con los genes RdRp, TGB y CP, de los genomas virales obtenidos por RNA-seq, y virus reportados en el GeneBank, 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.

Diseño y evaluación de oligonucleótidos específicos a partir del análisis de RNA-seq

De acuerdo a las secuencias de virus obtenidas del RNA-seq y con el fin de comprobar la presencia de estos virus directamente en las muestras colectadas y en las plantas del ensayo de transmisión mecánica que presentaron lesiones, se diseñaron oligonucleótidos específicos que flanquean la proteína de la CP (comunicación personal del Laboratorio de Virología Molecular de Plantas de la Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España). Se realizaron los ensayos de la RT-PCR con el kit de One-step Invitrogen (Carlsbad, CA), siguiendo las condiciones: 50 °C para la RT, y 35 ciclos de 95 °C por 10 s de desnaturalización, 52 °C por 10 s de alineamiento, y 68 °C por 1 o 2 m de extensión, y rindieron un amplicón de 1000pb para el caso de SchVX, OpVX, RCNaV, y 2000 pb para el *Carlavirus*. Los productos se separaron en gel de agarosa al 1% por 30 min a 100 V, y se cortaron y limpiaron con el kit Wizard Promega para su posterior secuenciación, y comparación mediante BLAST con secuencias virales reportadas en GenBank.

RESULTADOS

Separación por transmisión mecánica de virus a plantas indicadoras y diferenciales

Nuestro primer acercamiento para conocer si la etiología de la enfermedad caracterizada por manchas anulares y deformación de los cladodios del nopal verdura de San Martín de las Pirámides y Otumba, Estado de México, está asociada a la presencia de virus, fue la inoculación de plantas indicadoras que posiblemente también manifestaran síntomas.

Varias especies de las plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con los macerados de la dermis de cladodios de plantas de Nopal verdura con manchas anulares,

mostraron síntomas 15 d después de la inoculación mecánica en invernadero, lo que posiblemente se debió a la transmisión de alguna clase de virus. Consistentemente la inoculación causó lesiones locales cloróticas y después necróticas, en *G. globosa*, *C. amaranticolor*, *C. quinoa* y *N. glutinosa* (Figura 3 A-C y E). Se observaron lesiones locales cloróticas y después necróticas en *D. stramonium* (Figura 3 D) y se observó marchitez sistémica en *N. benthamiana* (Figura 3 F).

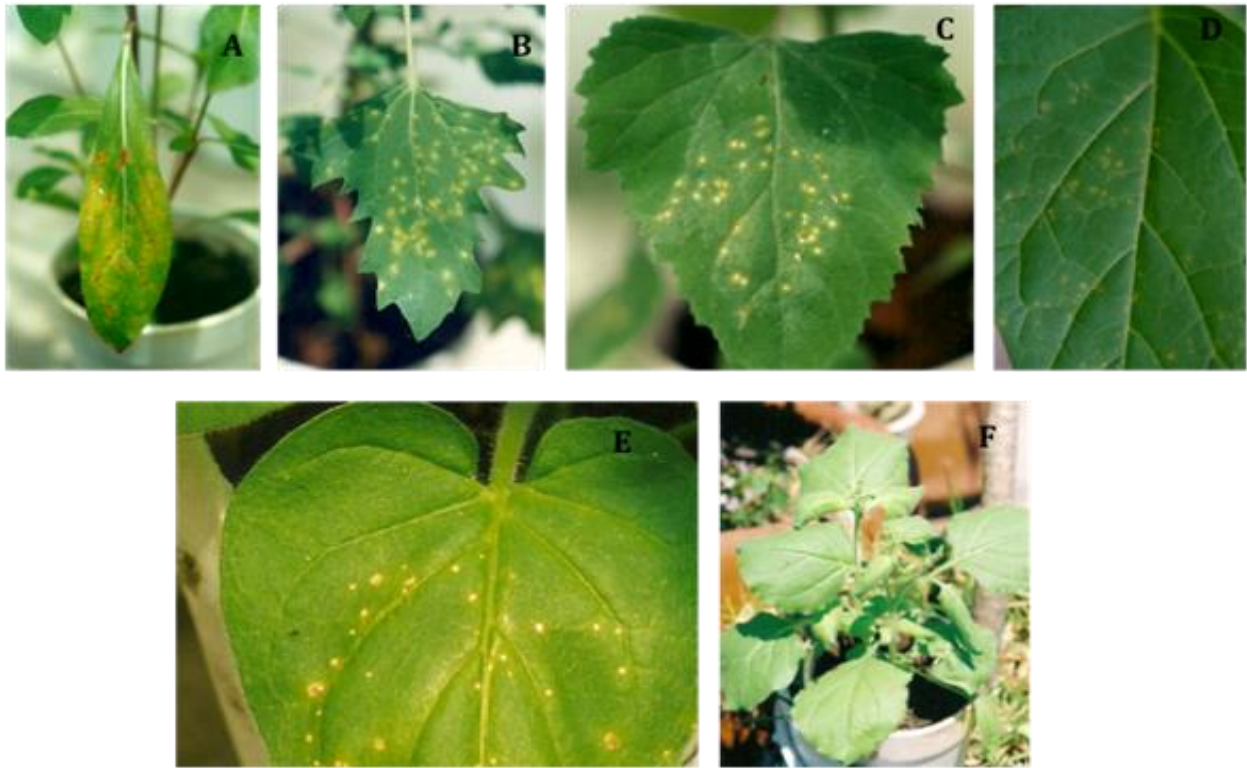


Figura 3. Síntomas causados por macerados de nopal verdura en algunas de las plantas indicadoras en las que se ensayó la transmisión mecánica de posibles virus. Lesiones locales cloróticas y después necróticas en A) *Gomphrena globosa*, B) *Chenopodium quinoa*, C) *C. amaranticolor*, D) *Datura stramonium*, E) *Nicotiana glutinosa*, y marchitez sistémica en F) *N. benthamiana*.

En el segundo ensayo de transmisión se obtuvieron lesiones locales cloróticas para *C. amaranticolor* y *C. quinoa* (Figura 4 A y B). También se observó daño sistémico (mosaico) en *D. stramonium* (Figura 4 C). En el primer ensayo no se obtuvieron síntomas

en *N. rustica*, sin embargo en el segundo se observaron lesiones locales cloróticas y posteriormente deformación foliar (Figura 4 D y E).

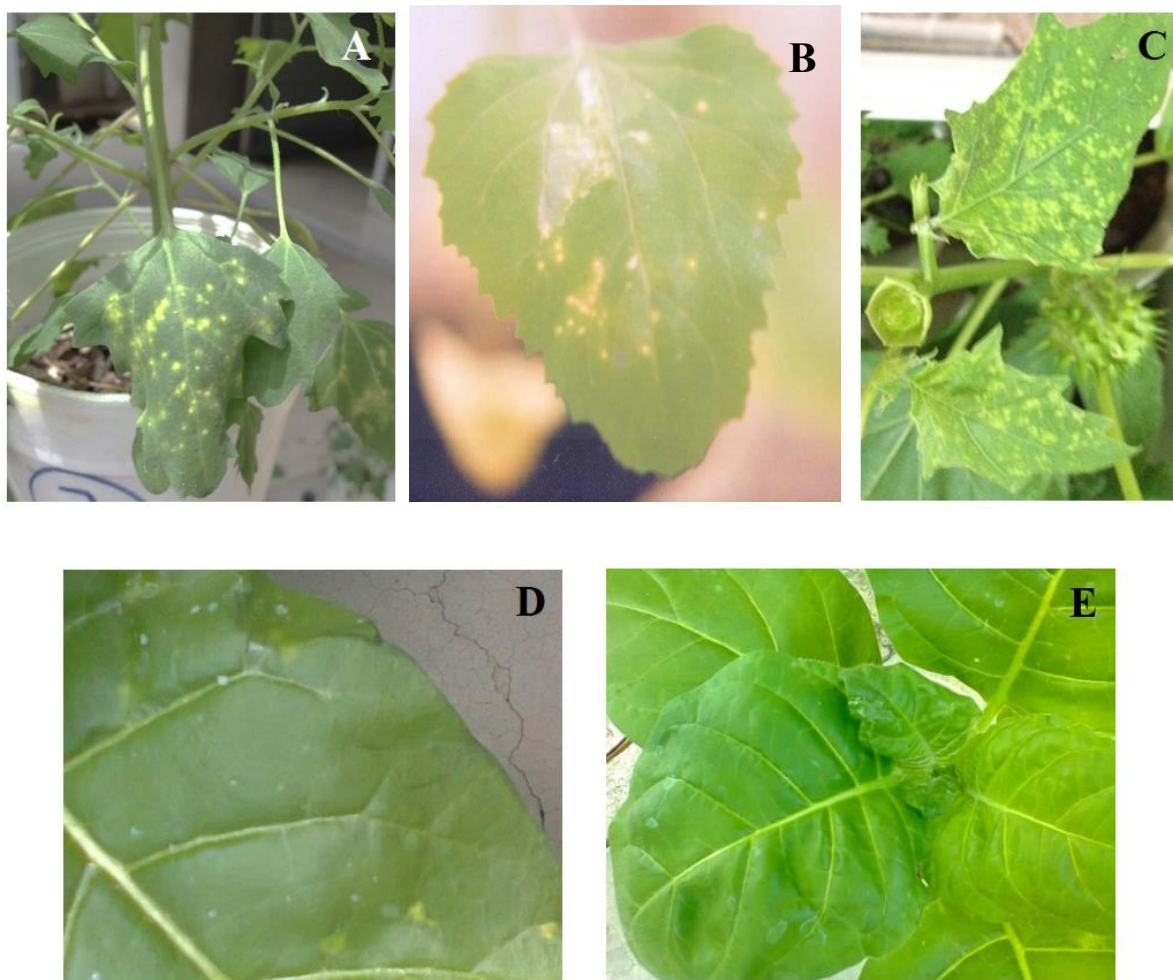


Figura 4. Segundo ensayo de transmisión mecánica para la separación de virus. Síntomas causados por macerados de nopal verdura. Lesiones locales cloróticas en A) *C. quinoa*, y B) *C. amaranticolor*, mosaico (daño sistémico) en C) *D. stramonium*, y D) lesiones locales cloróticas y posteriormente E) deformación foliar en *N. rustica*. Estos diversos daños indicaron la presencia de varios virus.

No se observaron síntomas en *Capsicum annum* cv. ancho, *N. occidentalis*, *N. clevelandii* y *Solanum esculentum*. El control negativo no mostró síntomas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Daños en plantas indicadoras de los ensayos de transmisión, las tres plantas durante las tres repeticiones mostraron los síntomas.

Hospedantes	Síntomas	Síntomas 2° ensayo
<i>C. quinoa</i>	Llc, Lln	Llc, Lln
<i>C. amaranticolor</i>	Llc, Lln	Llc, Lln
<i>N. rustica</i>	Ss	Llc, Df
<i>Datura stramonium</i>	Llc, Lln	Mos
<i>Nicotiana benthamiana</i>	Ms	
<i>Gomphrena globosa</i>	Llc, Lln	
<i>N. glutinosa</i>	Llc, Lln	
<i>N. occidentalis</i>	Ss	
<i>N. clevelandii</i>	Ss	
<i>Capsicum annuum cv ancho</i>	Ss	
<i>Solanum esculentum</i>	Ss	

Llc = Lesiones locales cloróticas; Lln = Lesiones locales necróticas; Mos = Mosaicos; Df = Deformación foliar; Ms = Marchitez sistémica; Ss = Sin síntomas.

Observación al microscopio electrónico del tipo de partículas virales

Se observaron partículas de distintos tamaños, algunas en forma de varilla flexible de alrededor de 500-600 nm de largo, obtenidas de macerados de cladodios de nopal verdura, con los daños descritos anteriormente, y de macerados de plantas indicadoras con daños. Por comparación con otros virus que afectan plantas, estas partículas comparten características con los virus pertenecientes a los *Potexvirus* (Figura 5) Por otra parte, se

observaron partículas parecidas a varillas rígidas de alrededor 300-350 nm de largo, las cuales podrían corresponder a un *Tobamovirus*.

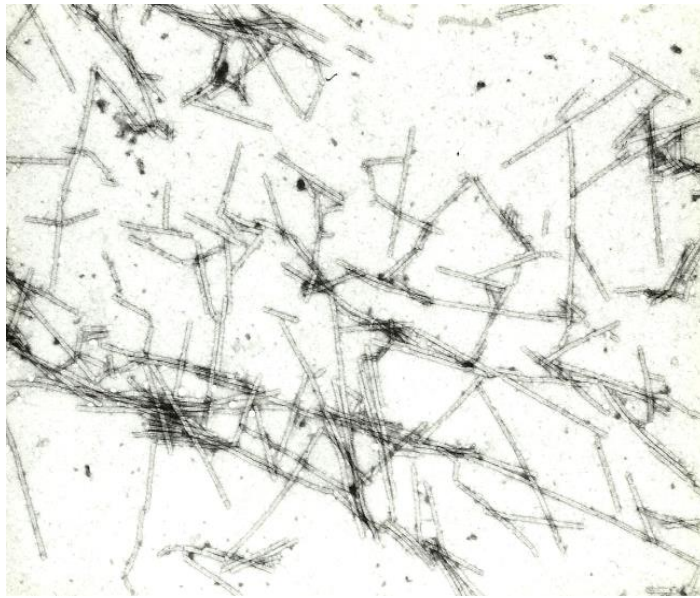


Figura 5. Microfotografía tomada con microscopio electrónico de transmisión Jeol X 100 (10 000 aumentos) de partículas virales de diferentes tamaños obtenidas de macerados de cladodios de nopal verdura infectados con este virus. Se observaron partículas de 500 a 600 nm en forma de varilla flexible y de 300nm de largo en forma de varilla rígida.

Ensayos serológicos de detección de proteína viral mediante Detección por inmunoadsorción ligado a enzimas en fase sólida de doble sándwich (DAS-ELISA)

La detección por DAS-ELISA de macerados de nopal verdura y hojas con daños de plantas indicadoras fue positiva para el antisuero de *Cactus Virus X* (CVX: *Potexvirus*) y negativa para los antisueros de los virus PVX, TMV, CarMV y TSWV. El análisis en el microlector mostró valores de ABS_{492} 0.579 y 0.618 para *C. quinoa* y *C. amaranticolor* respectivamente y valores de ABS_{492} 0.914 y 1.029 para las muestras de nopal verdura. Estos valores fueron superiores al control positivo de ABS_{492} 0.459, y a los controles negativos de ABS_{492} 0.010.

Análisis electroforético de ARN-dc de origen viral

Los análisis en el gel de poliacrilamida al 6% de todas las muestras de nopal verdura (carriles 3-8) presentaron dos bandas de un peso molecular mayor a la banda mas pesada del patrón de CMV (6.8 kb), que probablemente pertenezca alguna de ellas a la forma replicativa de un ARNdc de origen viral de aproximadamente 13kb, que correspondería al patrón típico del genoma de *Potexvirus*. Por otro lado también se observaron otras bandas, la cuales podrían indicar la presencia de otros genomas virales (Figura 6).

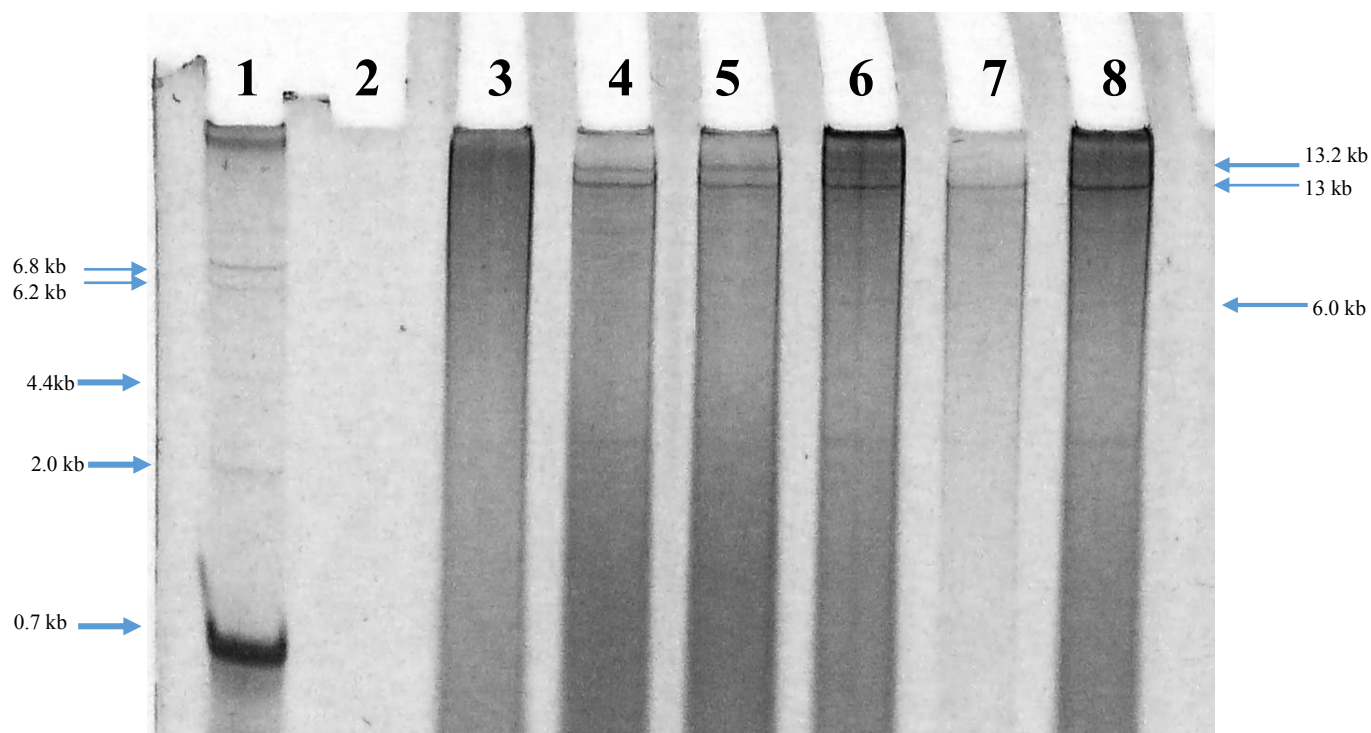


Figura 6. Análisis electroforético de muestras de nopal verdura para detección de ARNdc en gel de poliacrilamida (PAGE al 6%, 100V 2:30 h). (Carril 1) patrón electroforético de ARN dc del *Cucumber mosaic virus* y su satélite (CMV+CARNA-5). (Carril 3-8) ARN dc muestras de nopal verdura, se observan dos bandas en la parte superior de los carriles, probablemente pertenecientes alguna de ellas al genoma de *Potexvirus* (13.2 y 13 kb aproximadamente), además de otra banda en la parte inferior que podría corresponder a otro virus (6.0 kb aproximadamente).

Amplificación por Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) de fragmentos del genoma viral

Con esta técnica se demostró la presencia de virus del género *Potexvirus* al obtenerse amplicones del tamaño esperado, para los oligos Potex 5/Potex 1, de 730 pb, y con los oligos Potex 5/Potex 2, un tamaño de 580 pb aproximadamente (Figura 7).

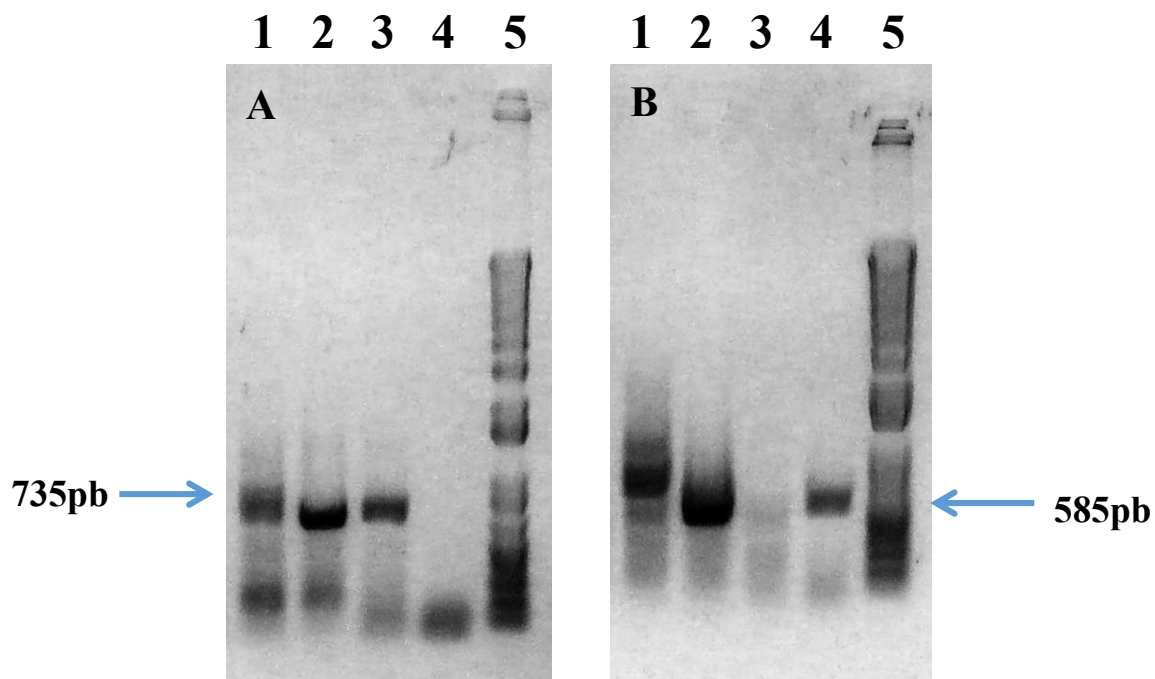


Figura 7. RT-PCR de muestras de nopal verde para detectar *Potexvirus* corridos en gel de agarosa al 1% (100 V, 25 min) **A.** Oligonucleótidos para el gen de la RdRp PotexF5/PotexR1 que rindieron un amplicon de 735 pb aproximadamente. Carril 1-4 Nopal verde. Carril 5 marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen). **B.** Oligonucleótidos para el gen de la RdRp PotexF5/PotexR2 que rindieron un amplicon de 585 pb aproximadamente), Carril 1-4 Nopal verde. Carril 5 marcador de peso molecular 1Kb Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA).

También se obtuvieron amplicones del tamaño esperado de 450 pb aproximadamente usando los oligonucleótidos Tob3Nup/TobN4do (Figura 8), lo cual demostró la presencia de virus del género *Tobamovirus*.

Secuenciación, análisis y comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral con secuencias disponibles en el Genbank

Las secuencias de los amplicones de la RdRp obtenidas (números de acceso KT699207, KT699208 y KT699209) presentaron un porcentaje de identidad del 80% con secuencias de la RdRp de *Potexvirus* disponibles en el GenBank, con los siguientes números de acceso: NC011659 *Schlumbergera Virus X* y NC006060 *Opuntia virus X*.

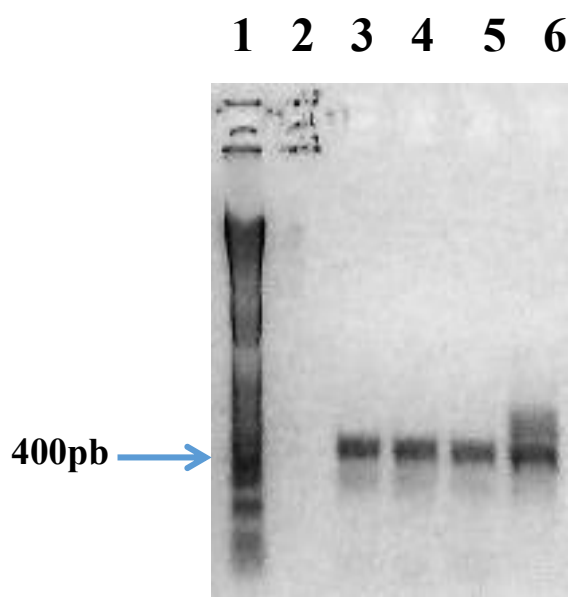


Figura 8. RT-PCR de muestras de nopal verdura para detectar *Tobamovirus* corridos en gel de agarosa al 1% (100 V; 25 min), se usaron los oligonucleótidos TobNup3/TobNdo4 para el gen de la RdRp de *Tobamovirus* que rindieron un amplicon de 450pb aproximadamente. Carril 3-6 muestras de nopal verdura. Carril 1 Marcador 1Kb (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Por otro lado, los ensayos de RT-PCR para la CP de los virus CVX y OpVX, rindieron amplicones en el tamaño esperado de 500 pb (datos no mostrados), pero las secuencias obtenidas no correspondieron con la CP del CVX y el OpVX.

En el caso de las secuencias de RdRp de *Tobamovirus*, mostraron porcentajes de identidad principalmente del 70 al 74% con el virus CMMoV, TMV, y el RCNaV, lo cual indicó al menos la presencia de un *Tobamovirus*.

Secuenciación masiva del RNA-Seq de muestras de nopal verdura

Se obtuvieron aproximadamente 30 millones de lecturas con un tamaño promedio de 75 pb cada una. La calidad en general por base medida con el software FASTQC (Andrews 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 con genomas virales de Potexvirus, *Tobamovirus* y *Carmovirus* como referencia (con SMALT), se encontraron secuencias que alinearon con regiones del gen de la CP y de la RdRp de los genomas de *Potexvirus*, entre ellos *Zygocactus Virus X*, *Schelumbergera Virus X*, *Cactus Virus X* y *Opuntia virus X*; y solo una secuencia repetida alineó con el gen de la Replicasa de *Tobamovirus*.

Por otra parte, 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 al menos dos posibles *Potexvirus* relacionados con los genomas de SchVX de 6646 nt (No. Acceso KU854929) y el OpVX de 6667 nt (No. Acceso KU854931), con un porcentaje de identidad para la RdRp (*RNA dependent RNA polimerase*) de 95 y 98% respectivamente, para el TGB1 (*Triple Gene Block ORF 1*), 96 y 99%, para el TGB2 de 95 y 98%, para el TGB3 de 98% en ambos, y para el gen de la proteína de la cápside (CP) de 98 y 97%. Además de un *Tobamovirus* relacionado con el genoma del RCNaV (No. Acceso KU854932), con una longitud de 6460 nt, y porcentajes de identidad de 87% para la RdRp, 94% para la proteína del movimiento (MP), y 98% para la CP. También se obtuvo el ensamblaje del genoma completo de un posible nuevo *Carlavirus* de 8374 nt (No. Acceso

KU854930), que afecta cactáceas, y el análisis de BLAST lo relaciona cercanamente con el *Carlavirus Blueberry Scorch Virus* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Genomas virales ensamblados de los datos de RNA-seq, con porcentajes de identidad comparados mediante BLASTX con secuencias disponibles en el GenBank.

Virus	Tamaño genoma (nt)	% Identidad a nivel de gen					
		RdRp	MP	CP	TGB1	TGB2	TGB3
SchVX	6646	95	-	98	96	95	98
OpVX	6667	98	-	97	99	98	98
RCNaV	6460	87	94	98	-	-	-
<i>Carlavirus</i>	8397	73	-	74	66	70	72

Las construcciones de árboles filogenéticos con las secuencias nucleotídicas de posibles virus obtenidos y secuencias del GenBank, en primera instancia, a nivel del gen de la RdRp, para los tres géneros distintos de virus (*Potexvirus*, *Tobamovirus* y *Carlavirus*) confirmó la identidad y la relación filogenética con otras secuencias reportadas para los mismos virus en el GenBank (Figura 9).

Por otro lado, se mantuvo la misma relación en los arboles de los tres ORFs del TGB, para los *Potexvirus* y *Carlavirus* (Figura 10). Finalmente la construcción del árbol filogenético usando el gen de la proteína de la cápside CP, demostraron una vez más la cercanía de las relaciones entre los genomas virales obtenidos por los mapeos y los genomas virales ya reportados en GenBank (Figura 11).

Diseño y evaluación de oligonucleótidos específicos a partir del análisis de RNA-seq

Se obtuvieron productos en el tamaño esperado de 1000 pb y 2000 pb, de los ensayos realizados con oligonucleótidos específicos diseñados a partir de las secuencias obtenidas del RNA-seq en muestras de nopal verdura, confirmando presencia de los virus

OpVX, RCNaV y el *Carlavirus*, al alinear algunas de las secuencias en un 90 al 95% de identidad con las secuencias obtenidas por RNA-seq (Figura 12). En el caso de las plantas indicadoras, se obtuvieron ámplicones del tamaño esperado para el OpVX en *C. quinoa*, *D. stramonium* y *N. rustica*, y para el RCNaV en *C. amaranticolor* y *N. rustica*, lo cual podría indicar la posible separación de los virus en las distintas plantas inoculadas mecánicamente (Figura 13). Por otra parte no se obtuvieron ámplicones para los virus SchVX y *Carlavirus*, por lo que probablemente no se transmitieron a las plantas indicadoras, o su concentración fue tan baja que no pudieron ser detectados por RT-PCR.

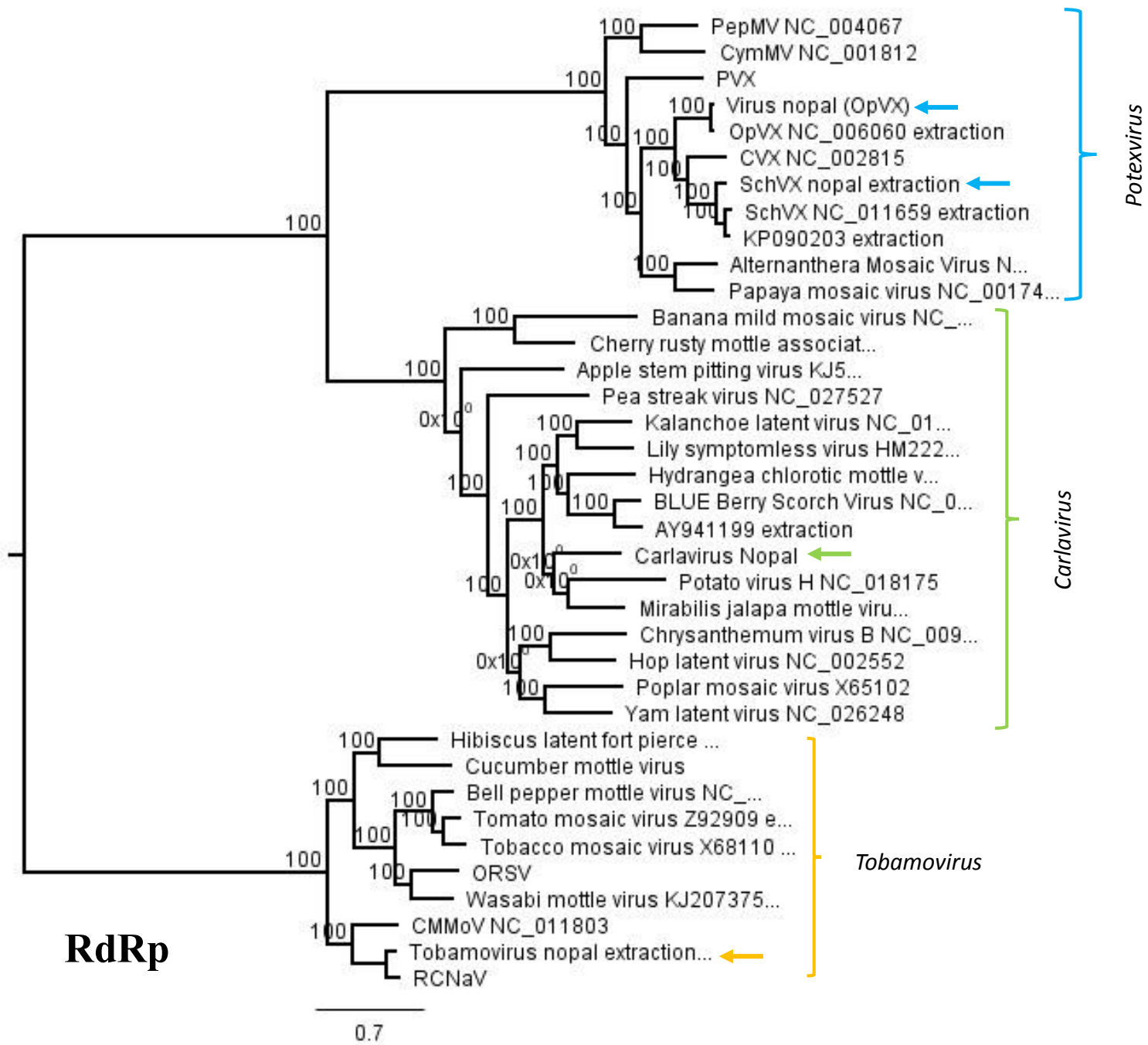


Figura 9. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (10 réplicas), para el gen de la RdRp (GTR+G) en *Potexvirus*, *Carlavirus* y *Tobamovirus*, se observa la separación de los géneros de virus (tres grupos). Además, de la separación de los distintos virus reportados en cactus, y los identificados en nopal verdura señalados con flechas.

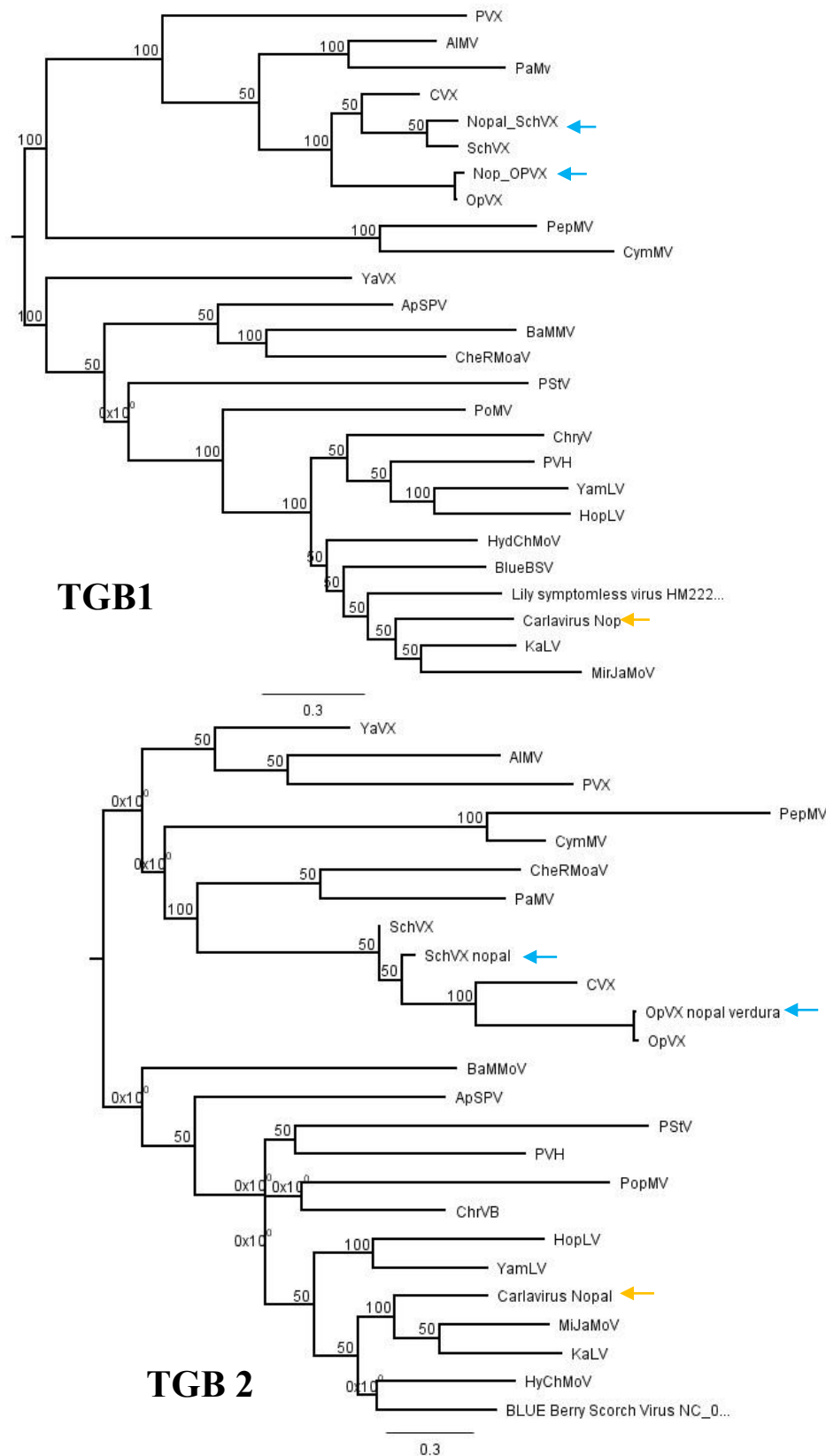


Figura 10. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (10 réplicas), de secuencias de GenBank y las secuencias de virus identificados en nopal verdura señalados con flechas, con valores de Bootstrap, para los 3 genes del TGB (Modelo Kimura +G y HKY+G), en *Carlavirus* y *Potexvirus*, se observa la separación en dos grupos a excepción del TGB3, en base al género del virus.

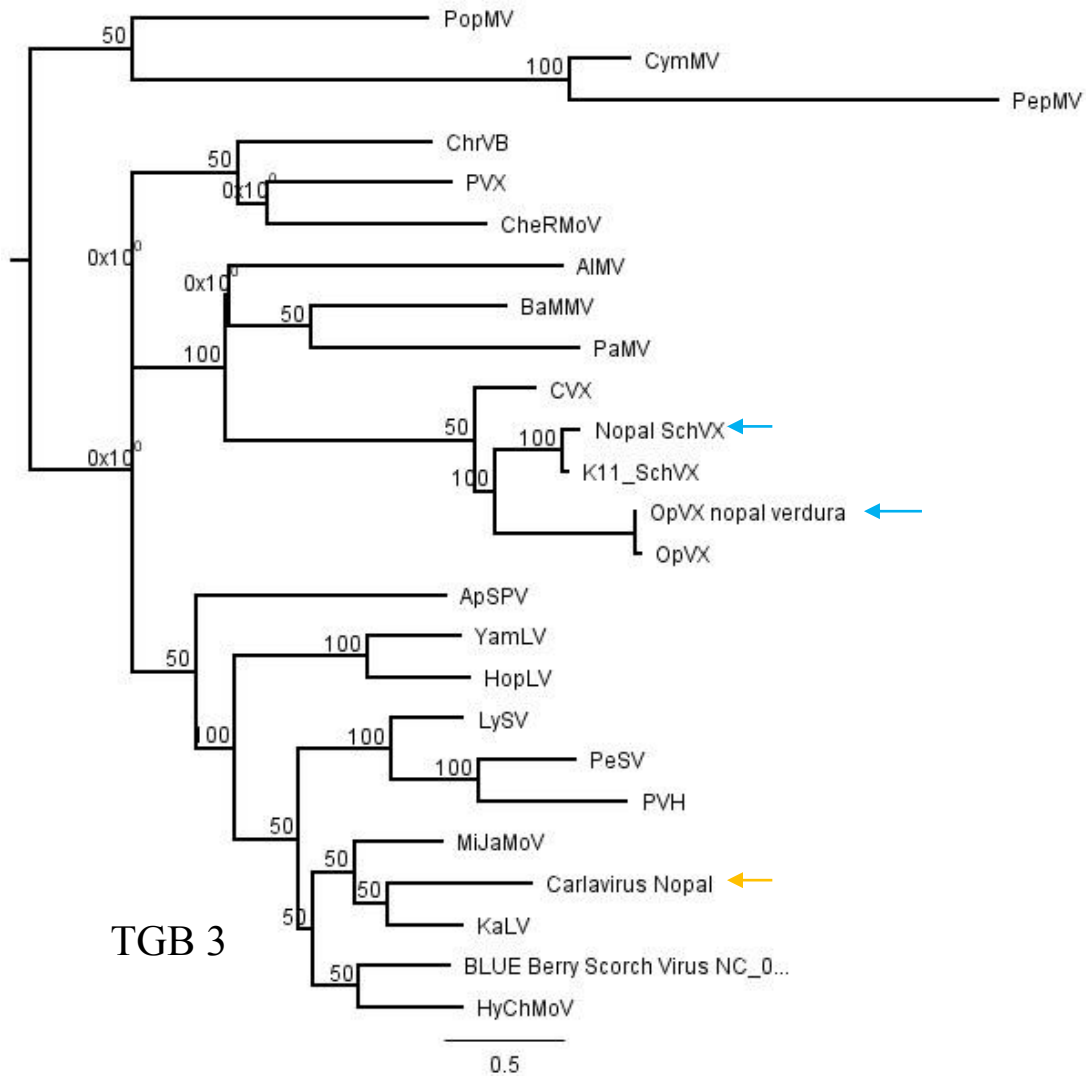


Figura 10. Continuación. Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (10 réplicas), de secuencias de GenBank y las secuencias de virus identificados en nopal verdura señalados con flechas, con valores de Bootstrap, para los 3 genes del TGB3 (Modelo Kimura +G y HKY+G), en *Carlavirus* y *Potexvirus*, se observa la separación en dos grupos a excepción del TGB3, en base al género del virus.

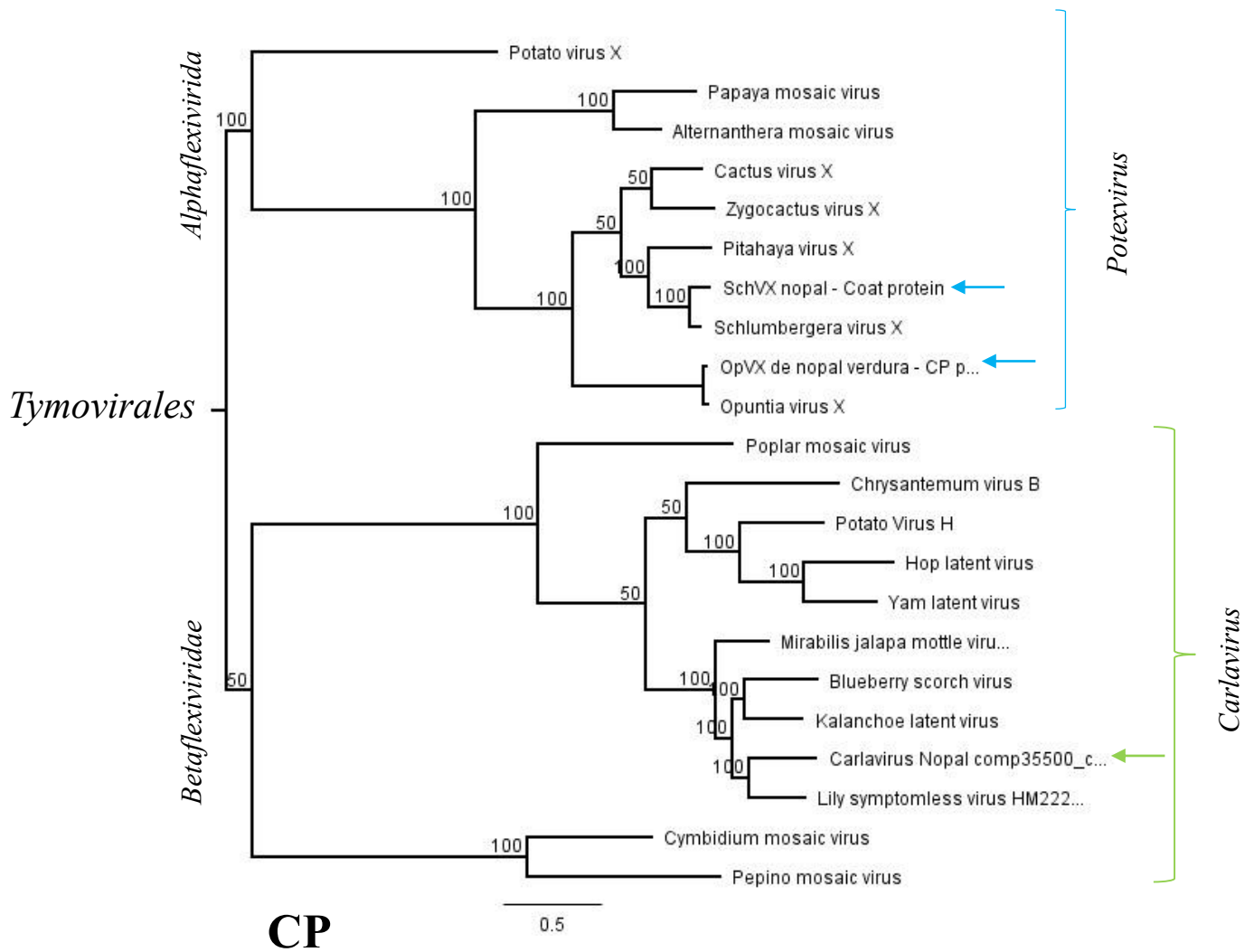


Figura 11. Árbol filogenético de máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (10 réplicas), para el gen de la CP (GTR+G) en *Potexvirus* y *Carlavirus*, se observa la separación del orden *Tymovirales* en dos familias *Alphaflexiviridae* y *Betaflexiviridae* y los géneros de virus *Potexvirus* y *Carlavirus*. Además, de la cercanía de los genomas obtenidos de los virus de nopal señalados con flechas, y la separación de los distintos

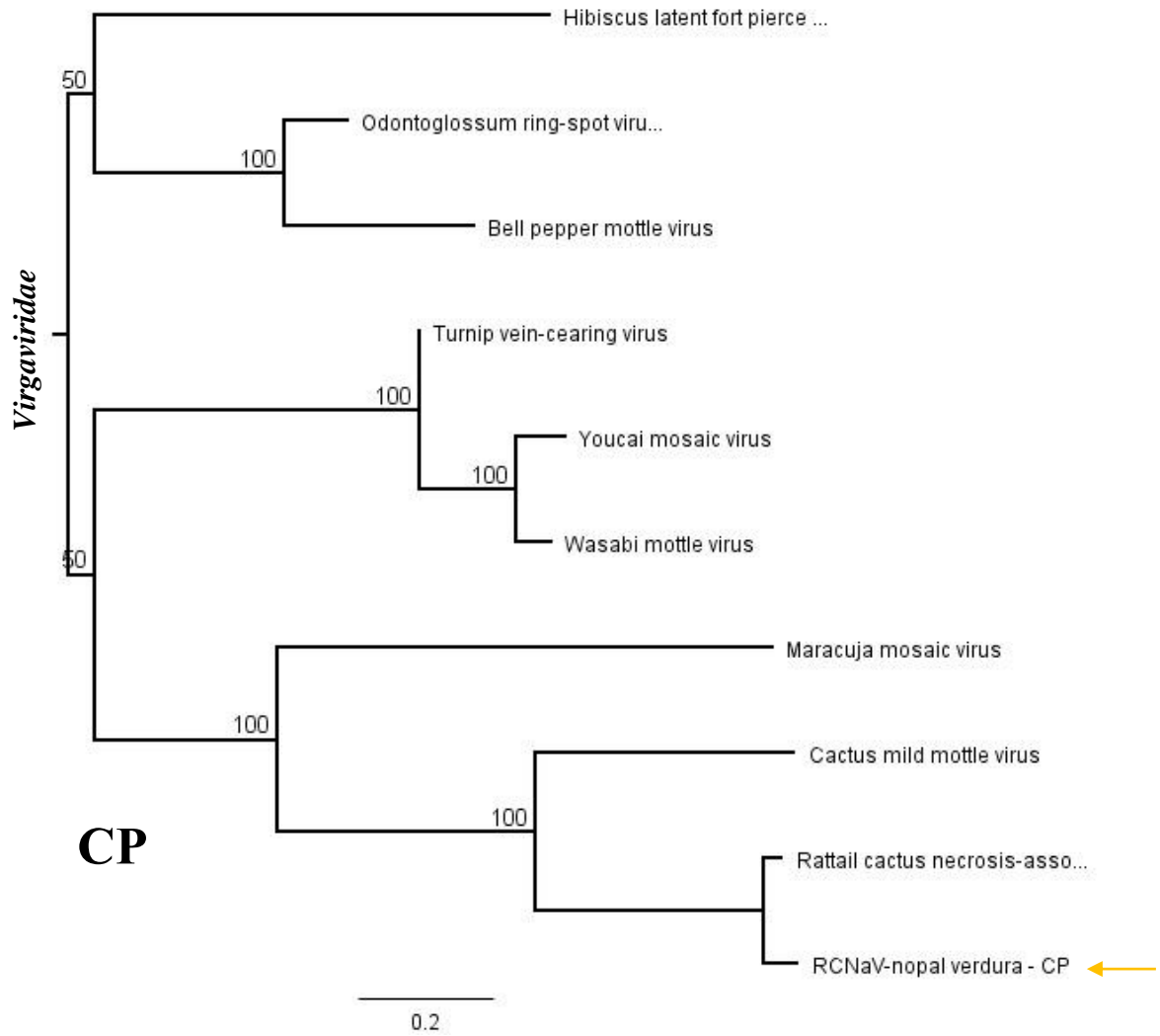


Figura 11. Continuación. Árbol filogenético por máxima verosimilitud con valores de Bootstrap (10 réplicas), para el gen de la CP de *Tobamovirus* de la familia *Virgaviridae* (GTR+G), se observa la cercanía de los genoma obtenido del RCNaV de nopal señalado con una flecha, con otro RCNaV y el *Cactus mild mottle virus* reportados en el GenBank.

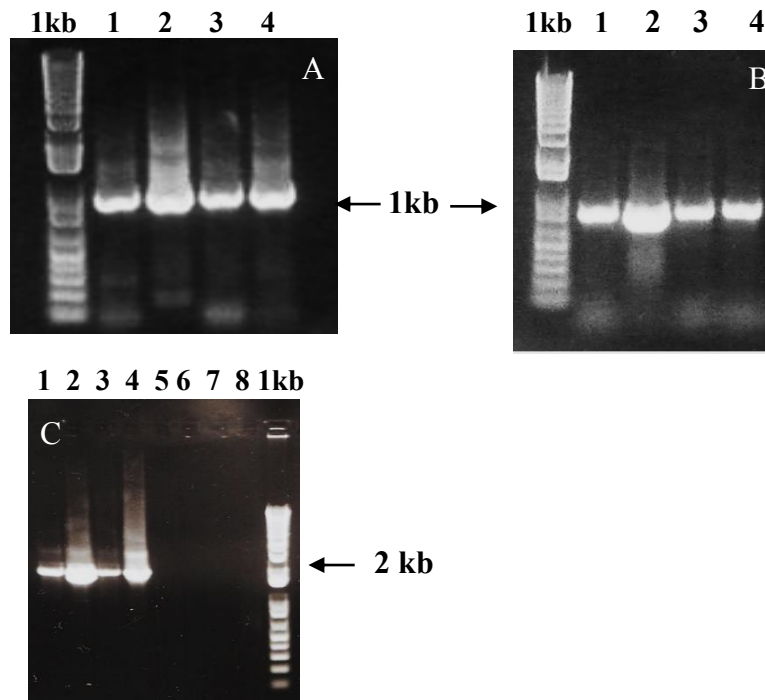


Figura 12. RT-PCR de muestras de nopal verde para detección de los virus identificados, corridos en gel de Agarosa al 1% (100 V; 25 min) usando oligonucleótidos específicos para el gen de la CP. **A.** OpVX CP (1000pb). Carril 1-4 Nopal verde. **B.** RCNaV CP (1000pb), Carril 1-4 Nopal verde. **C.** *Carlavirus* CP Carril 1-4 Nopal verde. Carril 5-8 vacíos, 1Kb Marcador de peso Molecular Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA).

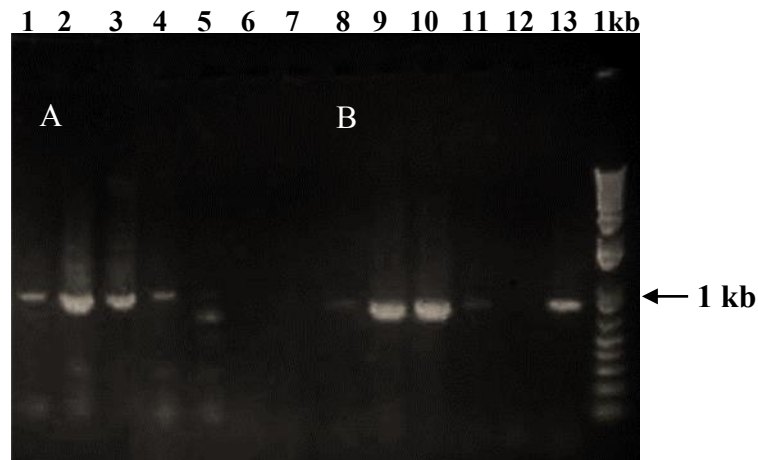


Figura 13. RT-PCR de muestras de plantas indicadoras de los ensayos de transmisión mecánica para detección de los virus identificados, corridos en gel de Agarosa al 1% (100 V; 25 min) usando oligonucleótidos específicos para el gen de la CP. **A.** OpVX CP (1000 pb aproximadamente). Carril 1. *D. stramonium*. Carril 2. *N. rustica*. Carril 3. *N. rustica-2*. Carril 4. *D. stramonium-2*. Carril. 5. *C. quinoa*. Carril 6. *C. amaranticolor*. Carril 7. Vacío. **B.** RCNaV CP (1000 pb aproximadamente) Carril 8. *D. stramonium*. Carril 9. *N. rustica*. Carril 10. *N. rustica-2*. Carril 11. *D. stramonium-2*. Carril. 12. *C. quinoa*. Carril 13. *C. amaranticolor*. 1Kb Marcador de peso Molecular Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA).

DISCUSIÓN

Considerando los resultados del presente trabajo, se observó que la posible causa de los daños en nopal verdura correspondientes a manchas anulares y deformación severa es la presencia de virus. En los ensayos de inoculación mecánica la observación de daños en las plantas indicadoras, confirmó la presencia de patógenos transmisibles en los cladodios de nopal verdura con manchas anulares. Además se observó un corto rango (pocas especies de plantas presentaron daños) de hospedantes en las temperaturas en que se mantuvo en el invernadero, de acuerdo a la presencia solamente de daños locales en la mayoría de las plantas utilizadas (Amaranthaceae y Solanaceae), y dos plantas con daños sistémicos de manchas cloróticas (*D. stramonium* y *N. benthamiana*, Solanaceae).

Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Maliarenko y Murak, 2013, quienes reportan la asociación de un virus del género *Potexvirus* al obtener lesiones locales en *C. quinoa* y *C. amaranticolor* usando macerados de distintas especies de cactáceas, lo que indicaría la presencia de al menos un *Potexvirus* en muestras de nopal verdura. Por otra parte contrastan con lo reportado por Duarte, *et al.*, 2008, ya que ellos observaron daño sistémico en estas mismas plantas al usar macerados de *O. tuna*, de *Schlumbergera truncata* y de *Hylocereus undatus*; además, mientras que ellos no reportaron daños en *N. benthamiana* y *D. stramonium*, nosotros observamos marchitez sistémica en *N. benthamiana*, y lesiones locales cloróticas y después necróticas en *D. stramonium*. En un segundo ensayo se obtuvo lesiones locales cloróticas y daño sistémico en *D. stramonium*, y deformación foliar en *N. rustica*.

La inconsistencia en los daños observados en *D. stramonium* (locales o sistémicos) durante distintos ensayos de transmisión y la aparición de lesiones y deformación foliar en *N. rustica* en el segundo ensayo cuando en el primero no dio síntomas, podrían estar

indicando la presencia de otros virus que probablemente no estaban presentes en concentraciones altas en las muestras usadas en el primer ensayo, y que en un segundo, al tener una mayor concentración produjeron síntomas no observados con anterioridad. Sin embargo se necesita realizar un análisis de carga viral para cada virus identificado, a través de un periodo de tiempo, esperando encontrar fluctuaciones en su concentración en las muestras de nopal. Las preparaciones de microscopía electrónica apoyaron la posibilidad de una infección por *Potexvirus* debido a la presencia de varillas flexibles de 500 a 600 nm (Liou *et al.*, 2001). Por otra parte, también consideramos la probable presencia de un *Tobamovirus*, de acuerdo a la observación de varillas rígidas de 350 nm de largo, que son parecidas a las que reportó De La Torre *et al.*, 2007 en muestras de cladodios de nopal tunero.

Por otro lado, en los ensayos de DAS-ELISA sólo se obtuvo la identificación aparente del *Cactus Virus X (Potexvirus)*, aunque habría que considerar que los antisueros usados son policlonales, lo cual implica que podría estar detectando otro *Potexvirus* característico de las cactáceas como el OpVX, ZyVX o SchVX que están cercanamente relacionados con el CVX, y hasta ahora solo se han identificado diferencias a nivel de secuencia nucleotídica (Koenig *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2008).

Los ensayos de DAS-ELISA, no resultaron una buena herramienta para la detección de los virus en nopal, debido cuando menos en parte a la presencia de la sustancia mucilaginosa presente en el tejido, la cual podría generar problemas en las interacciones del anticuerpo-proteína viral, y lo cual limita a utilizar la menor cantidad posible de tejido necesaria para la extracción, y en segunda instancia. También es posible que debido a la probable naturaleza novedosa de los agentes virales presentes, los antisueros comerciales

no lograron detectar la presencia de proteína viral relacionada serológicamente con el TMV.

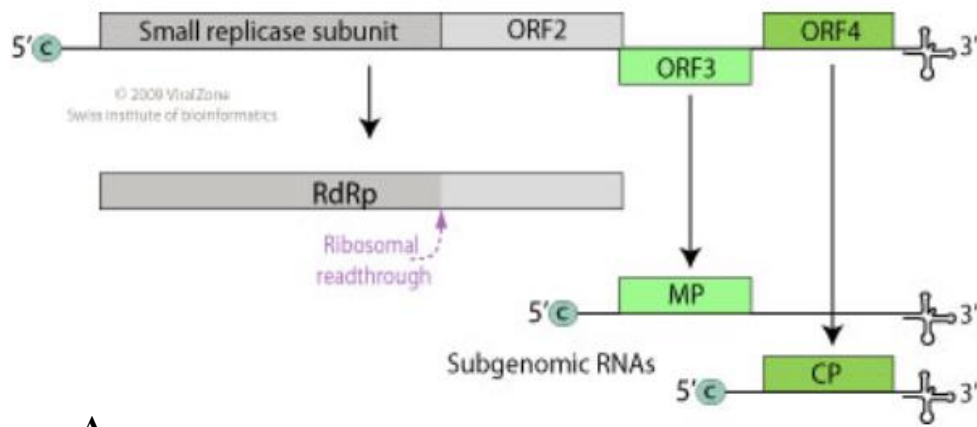
Los análisis moleculares dirigidos al material genético de los virus, generaron mejores resultados. El análisis de ARNdc de origen viral, demostró la presencia de material genético de origen vírico de *Potexvirus* en las muestras, el cual fue confirmado con los ensayos de RT-PCR dirigidos a la región de la RdRp y su posterior secuenciación. El *Tobamovirus* sólo fue detectado por medio de RT-PCR y secuenciación del producto parcial del gen de la RdRp, sin embargo estos primeros ensayos no permitieron la identificación a nivel de género, debido a las similitudes a nivel del gen de la RdRp que poseen todos los miembros del género *Potexvirus*, y los *Tobamovirus*, incluso entre ellos mismos. Lo anterior se ve claramente reflejado en los porcentajes de identidad de las secuencias obtenidas comparadas con secuencias del GenBank (80% para *Potexvirus*, los cuales concuerdan con los porcentajes de identidad de secuencias de tres distintos *Potexvirus* de cactáceas como lo reporta Koenig *et al.*, en el 2004.

El análisis de secuenciación masiva de RNA-seq, permitió la identificación de estos posibles virus al obtener secuencias completas de algunos genomas. Mediante los análisis de BLAST y los árboles filogenéticos, se caracterizaron los cinco marcos de lectura abiertos (*open read frame* ORF por sus siglas en ingles) para los *Potexvirus Schlumbergera Virus X* (SchVX) y el *Opuntia Virus X* (OpVX), y los 4 ORFs para el *Rattail Cactus Necrosis-associated Virus* (RCNaV:*Tobamovirus*), además de los 6 ORFs que presenta el *Carlavirus* (Figura 14), y las relaciones filogenéticas cercanas que poseen con los demás virus del mismo género que se han reportado en otras cactáceas (Koenig *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012). Ya se había reportado antes en Brasil la presencia del SchVX, *Potexvirus* en *O. cochenillifera*, al analizar datos de RNA-seq (Sanches *et al.*, 2015). Nosotros en este

trabajo también identificamos al SchVX en las muestras de nopal verdura, lo cual podría indicar una posible distribución de este virus en otras especies de *Opuntia* en el continente americano.

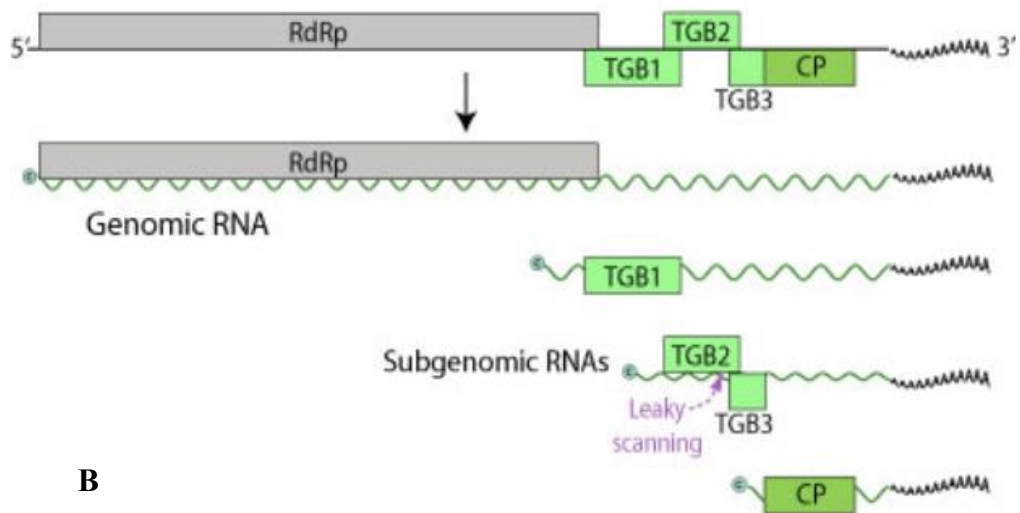
La aplicación de la secuenciación masiva de RNA-seq, ha generado buenos resultados en otros trabajos, donde se han obtenido secuencias correspondientes a virus ya reportados anteriormente, y aún más importante, de nuevos virus no identificados. Algunos de estos virus recién identificados se han detectado en cultivares de relevancia económica, como por ejemplo la uva en California y Sudáfrica (Al Rwahnih *et al.*, 2009; Coetzee *et al.*, 2010) o el camote en Honduras y Guatemala (*sweet potato*) (Kreuze *et al.*, 2009; Kashif *et al.*, 2012) y el jitomate en México (Li *et al.*, 2013), en el caso concreto de los trabajos anteriores, se utilizó la RNA-seq dirigida a ARN de pequeño tamaño, o RNA *small* en inglés (RNAs), a diferencia de nosotros que usamos una RNA-seq dirigida a ARNm. Ambas metodologías arrojan buenos resultados, para la detección de genomas virales vegetales, aunque, posee mayor información el secuenciar ARNm, debido a que en la misma corrida, se obtienen los datos del transcriptoma de la planta, lo cual permite realizar análisis de la respuesta del huésped a la infección viral, y el silenciamiento provocado por el virus hacia el sistema de respuesta del huésped (Nagano *et al.*, 2015). 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, permitió el mapeo a referencia de los Potexvirus ya reportados anteriormente en cactáceas, y de igual manera el ensamblaje *de novo* con Trinity, nos facilitó la identificación de al menos un nuevo virus.

GENOME



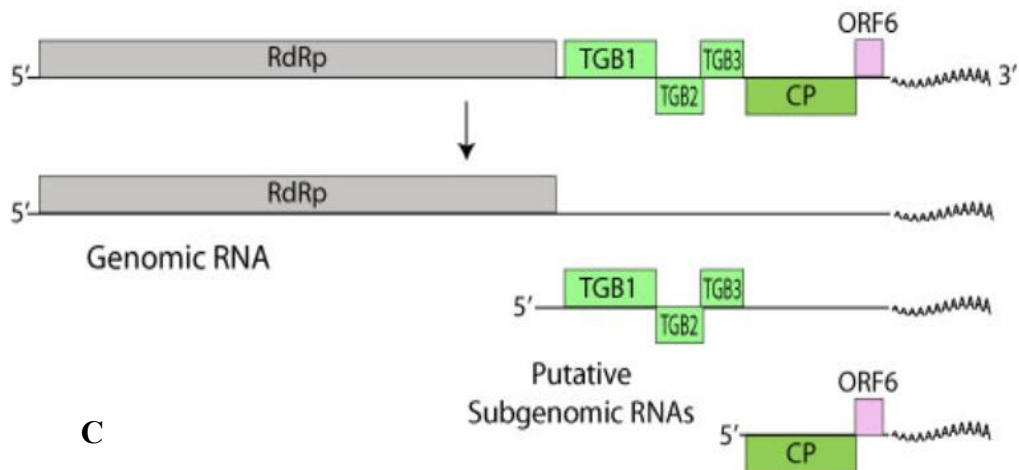
A

GENOME



B

GENOME



C

Figura 14. Esquemas de la composición genómica de los virus A. *Tobamovirus*, B. *Potexvirus* y C. *Carlavirus*, 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 25 de Enero del 2016).

La secuenciación masiva por RNA-seq facilitó la identificación de los virus SchVX, OpVX, RCNaV presentes en las muestras de nopal con síntomas de manchas anulares cloróticas, y deformación de arrugamiento de cladodios. Además de un posible nuevo *Carlavirus* no identificado antes de 8374 pares de bases, que mostró una relación a nivel de la CP con el *Blue Berry Scorch Virus*, lo cual estaría confirmando la naturaleza nueva del agente viral. Debido a que la RNA-seq posee una profundidad de amplificación y secuenciación mayor que los métodos estándar, nos permitió caracterizar molecularmente e identificar los genomas completos de los virus presentes en nopal. Lo cual confirma el uso universal de esta tecnología, obteniendo secuencias virales completas, o parciales en algunos, sin tener antecedentes de los posibles virus presentes.

Adicionalmente se validó la presencia de los virus identificados mediante RT-PCR de punto final, para lo cual se desarrollaron oligonucleótidos específicos que flanquean el gen de la proteína de la cápside. Esto permitirá realizar trabajos posteriores de diagnóstico de esos virus en otras plantas de nopal o incluso en otras cactáceas. También se pueden utilizar para hacer un ensayo de diagnóstico y evaluar la distribución en campo, como se ha hecho en otros cultivos como la uva (Al Rwahnih *et al.*, 2009).

Además también se evaluó la posible separación de los virus en las plantas del ensayo de transmisión. Aunque se observó que el *Carlavirus* no se transmitió a las plantas utilizadas, se obtuvo la aparente separación del OpVX en tres plantas y el RCNaV se aisló solamente en *N. rustica*. Por otra parte, debido a que no se obtuvieron productos de los ensayos de RT-PCR con los oligonucleótidos específicos para la CP de los virus SchVX y *Carlavirus*, en las plantas indicadoras, es recomendable buscar una planta indicadora en la que se logre transmitir y separar estos virus para completar la caracterización sobretodo del

posible nuevo *Carlavirus*, además de realizar trabajos posteriores de diagnósticos de estos virus en otras plantas de nopal cultivado o silvestre e incluso en otras cactáceas.

También se recomienda la comparación a nivel transcriptómico de la planta infectada por virus, con plantas de nopal que estuvieran libres de virus, generando información sobre la respuesta de posibles defensas por parte de la planta a la infección de virus, o incluso un análisis más a fondo de la implicación de los virus en el metabolismo del nopal verdura.

Es complicado evaluar un impacto económico directo de estos virus en el nopal, debido a la propagación vegetativa de los cladodios para su cultivo. Pero probablemente todos los cultivares de esa zona estén infectados con al menos uno de los virus identificados. Los cladodios que presentan los daños más severos, como la deformación o las manchas anulares amarillas intensas, son eliminados de la cosecha, lo cual podría generar una pérdida en la producción. Este mismo problema de la propagación vegetativa afecta la planeación de medidas fitosanitarias, sumado a la probable transmisión mecánica de los virus entre plantas causada por el manejo manual de la cosecha de los cladodios tiernos.

CONCLUSIONES

1. Se identificó en plantas de nopal verdura *Opuntia ficus-indica* cultivadas en los municipios de San Martín de las Pirámides y Otumba, Estado de México, con síntomas de manchas anulares y deformación severa, la presencia de agentes virales pertenecientes al grupo de *Potexvirus* y *Tobamovirus* por medio del ensayo de inoculación en rango de hospedantes, microscopía electrónica y ensayos de DAS-ELISA.

2. Se confirmó la presencia de la mezcla viral por medio de RT-PCR y secuenciación masiva de RNA-Seq en las muestras de nopal, y la confirmación de identidad por medio de la secuenciación de productos obtenidos con los oligonucleótidos específicos para el gen de la CP de cada virus identificado.
3. Se determinó la presencia e identidad del virus SchVX y el OpVX ambos del género de *Potexvirus*, y el RCNaV del género de *Tobamovirus*, además de la identificación por primera vez (hasta donde nosotros sabemos) de un *Carlavirus* en plantas de nopal.

PERSPECTIVAS

- En base a la identificación de un posible nuevo *Carlavirus*, se recomienda la caracterización biológica completa del virus, mediante la secuenciación del genoma completo por medio de productos de RT-PCR clonados, y el armado posteriormente de una clona infectiva, para hacer ensayos de inoculación mecánica en rango de hospedantes, esperando la aparición de daños en las plantas indicadoras.
- Por otra parte, también se recomienda el análisis de otras muestras de plantas de la familia Cactaceae, debido a que México es centro de origen de estas plantas, para realizar una comparación posterior de las secuencias nucleotídicas de los virus de plantas cultivadas y plantas silvestres.
- También se recomienda el análisis posterior para la inoculación de macerados de nopales con daños, en nopales que estén libres de virus, germinando desde semilla,

y después diagnosticar con ensayos de RT-PCR usando los oligonucleótidos específicos para la CP, esperando encontrar la aparición de las manchas anulares.

- Se recomienda realizar comparaciones a nivel transcriptómico entre plantas de nopal infectadas con los virus y plantas que libres de virus, para buscar relaciones en la respuesta de defensa de la planta a la infección, o para buscar implicaciones de los virus en el metabolismo de la planta.

REFERENCIAS

- Adams, I. P., Glover, R. H., Monr, W. A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M., Boonham, N. 2009. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10(4): 537-545.
- 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
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Golino, D. Rowhani, A. 2009. Deep sequencing analysis of RNAs from a grapevine showing Syrah decline symptoms reveals a multiple virus infection that includes a novel virus. *Virology* 387: 395-401.
- 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.
- 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.

- Andreote, F. D., Gumiere, T., Ademir, D. 2014. Exploring interactions of plant microbiomes. *Scientia Agricola*, 71(6): 528-539.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Baltimore, D. 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* 35(3): 235-241.
- Bendhifi, M., Baraket, G., Zourgui, L., Souid, S., Salhi-Hannachi, A. 2013. Assessment of genetic diversity of Tunisian Barbary fig (*Opuntia ficus indica*) cultivars by RAPD markers and morphological traits. *Scientia Horticulturae* 158: 1-7.
- Bravo, H. H. 1978. Las Cactáceas de México. 2nd. ed. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 743 p.
- Brunt, A. A., Crabtree, K., Dallwitz, J., Gibbs, M. J., Watson, A. L., Zurcher, J. E. (eds). 1996. Potexvirus. *Plant Viruses Online: Description and Lists from the VIDE database*. Consultado en línea el 15 enero 2014, de <http://srs.im.ac.cn/vid/index.html>.
- Bujarski, J. J., 2013. Genetic recombination in plant-infecting messenger-sense RNA viruses: overview and research perspectives. *Frontiers in Plant Science* 4(68): 1-9.
- Campos B., A. M. 1996. Identificación del agente causal de la pudrición café del nopal (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) en Milpa Alta, DF. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 41 pags.
- Clark, M. F. y Adams, M. A. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475- 483.
- Coetzee, B., Freeborough, M. J., Maree, H. J., Celton, J. M., Rees, D. J. G., Burger J. T. 2010. Deep sequencing analysis of viruses infecting grapevines: Virome of a vineyard. *Virology* 400: 157-163.

- Colunga, G.M., Hernández, E., Castillo, A. 1986. Variación morfológica, manejo agrícola tradicional y grado de domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío guanajuatense. *Agrociencia* 65: 7-49.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- Dellaporta, S., Wood, J., Hicks, J. 1983. A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-20.
- 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.
- Dijkstra, J. y De Jager, P. C. 1998. *Practical Plant Virology. Protocols and Exercises*. Edit. Springer, Berlin. 459 pags.
- Dovas, C. I., Efthimiou, K., Katis, N. I. 2004. Generic detection and differentiation of tobamoviruses by a spot nested RT-PCR-RFLP using dI-containing primers along with homologous dG-containing primers. *Journal of Virological Methods* 117: 137-144.
- 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.
- Eigen, M., McCaskill, J., Schuster, P. 1989. The molecular quasi-species. *Advances in Chemical Physics*. 75: 149–263.
- Flores, C. A. V. 2003. Importancia del nopal. En Flores, C.A.V., *Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización*, 1ra Edición, Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM, México, pp. 1 – 18.

- Gergerich, R.C. y Dolja, V. V. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. Consultado en línea el 20 de agosto del 2015 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.
- Griffith, M. P. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91(11): 1915-1921.
- 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.
- Guzmán, U., Arias, S., Dávila, P. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM, CONABIO, México, 315 pags.
- 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.
- Hausbeck, M. K. y Gildow, F. E. 1991. First report of *Tomato spotted wilt virus* on Thanksgiving cactus. *Plant Diseases* 75: 215.
- Hull, R. 2014. *Plant Virology*. 5a Edition, Elsevier, Academic Press. Amsterdam. 1091 pags.
- 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 Research*, 39: 576–582.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) 2007. Características principales del cultivo de nopal en el Distrito Federal: caso Milpa alta: Censo agropecuario.

México. Consultado en Línea el 25 de enero en:

http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/censos/agropecuario/2007/agricola/nopal_df/CulnopDF.pdf

Instituto de Bioinformática Suiza. 2016. ViralZone. Revisado el 25 de enero y el 22 de marzo del 2016 en: <http://viralzone.expasy.org>

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.

Kashif, M., Pietilä, S., Artola, K., Jones, R. A. C., Tugume, A. K., Mäkinen, V., Valkonen, J. P. T. 2012. Detection of viruses in sweetpotato, from Honduras and Guatemala augmented by deep-sequencing of small-RNAs. *Plant Diseases* 96: 1430-1437.

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.

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.

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.

Kreuze, J. F., Perez, A., Untiveros, M., Quispe, D., Fuentes, S., Barker, I., Simon, R. 2009.

- Complete viral genome sequence and discovery of novel viruses by deep sequencing of small RNAs: A generic method for diagnosis, discovery and sequencing of viruses. *Virology* 388: 1-7.
- Li, R., Gao, S., Fei, Z., Ling, K. S. 2013. Complete Genome Sequence of a New Tobamovirus Naturally Infecting Tomatoes in Mexico. *Genome Announcements*, 1(5): 13.
- Liou, M. R., Hung, C. L., Liou, R. F. 2001. First Report of Cactus virus X on *Hylocereus undatus* (Cactaceae) in Taiwan. *Plant Disease* 85(2): 229.
- 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.
- Majure, L. C., Puente, R., Griffith, M. P., Judd, W. S., Soltis, P. S., Soltis, D. E. 2012. Phylogeny of *Opuntia* S.S. (Cactaceae): Clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *American Journal of Botany* 99(5): 847-864.
- Maliarenko, V. M. y Mudrak, T. P. 2013. Cactus viruses in fasciated plants. *Biologija* 59 (2): 213-218.
- Márquez, B. S. R., Torcuato, C. C., Almaguer V. G., Colinas, L. M. T., Khalil, G. A. 2012. El sistema productivo del nopal tunero (*Opuntia albicarpa* y *O. megacantha*) en Axapusco, Estado de México. Problemática y alternativas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 18(1): 81-93.
- Méndez, G. S. J., Talavera, M. D., García, H. E. J. 2008. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. En: VII Simposium-Taller “Producción y Aprovechamiento del Nopal en el Noreste de México. *Revista Salud Pública y Nutrición* No. 2. 55-66.

- Milbrath, M. G. y Nelson, M. R. 1972. Isolation and characterization of a virus from Saguaro cactus. *Phytopathology* 62: 739-742.
- 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.
- 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.
- Nobel, P. S. 1994. Remarkable Agaves and Cacti, Oxford University Press, New York. 180 pags.
- Pirone, T.P. y Blanc, S. 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 34: 227-247.
- 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.
- Reyes, J. A. A., Aguirre, R. R., Hernández, H. M. 2005. Notas Sistemáticas y una descripción detallada de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 395-408.
- Roossinck, M. J. 2011. The good viruses: viral mutualistic symbioses. *Nature Reviews Microbiology* 9: 99-108
- Roossinck, M. J., Martin, D. P., Roumagnac, P. 2015. Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. *Phytopathology* 105(6): 716-727.
- Sanches, 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.
- Sánchez, L. D. L., López, G. C., Ávalos, H. I. 2013. Nomenclatura vernácula, uso y manejo de *Opuntia spp.* en Santiago Bayacora, Durango, México. Revista Chapingo Serie Horticultura, 19: 367-380.
- 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.
- Sherwood, J. L., German, T. L., Moyer, J. W., Ullman, D. E. 2003. Tomato spotted wilt. The Plant Health Instructor. Consultado en línea el 20 de marzo del 2016 en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/viruses/Pages/TomatoSpottedWilt.aspx>
- SMALT website. <http://www.sanger.ac.uk/resources/software/smalt/> Acceso 26 de Mayo del 2015.
- Suaste, D. A., Rojas, M. R. I., Zavaleta, M. E. 2012. Detección Molecular de Fitoplasmas en Nopal Tunero (*Opuntia ficus-indica*) con Síntomas de Engrosamiento del Cladodio. Revista Mexicana de Fitopatología. 30(1): 72-80.
- Swart, W. J. y Swart, V. R. 2003. An Overview of Research on Diseases of Cactus Pear in South Africa. Journal of the Professional Association for Cactus Development. 115-120.
- Tian, B. Y., Cao, Y., Zhang, K. Q. 2015. Metagenomic insights into communities, functions of endophytes, and their associates with infection by root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*, in tomato roots. Scientific Reports 5: 1-15

- Urbanowicz, A., Alejska, M., Formanowicz, P., Blazewicz, J., Figlerowicz, M., Bujarski, J. J. 2005. Homologous crossovers among molecules of brome mosaic bromovirus RNA1 or RNA2 segments in vivo. *J. Virol.* 79: 5732–5742.
- 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.
- Walkey, D. 1991. *Applied Plant Virology*. 2nd Edition. Chapman and Hall, Londres. 338 pags.
- Wang, Z., Gerstein, M. y Snyder, M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10(1): 57-63.
- Yahia, E. M. y Saenz, C. 2011. Cactus pear (*Opuntia* species) Capitulo 14 en: Yahia, E. M. (eds.) *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits Vol. 2*. Woodhead Publishing. 543 pags.
- Yahia E. M. 2012, 'Prickly pear' , Chapter 13, in Rees D. , Farrell G. and Orchard J. E. (eds) , *Crop Postharvest: Science and Technology , Volume 3 , Perishables* , Wiley-Blackwell Publishing , Oxford, UK . 439 pags.