



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

**DIVERSIDAD DE VIRUS EN ALGUNAS ESPECIES DEL GÉNERO *Opuntia* EN
MÉXICO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS PRESENTA:
Héctor Salgado Ortíz

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

Comité Tutor:

Dr. Carlos F. Arias Ortiz
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. A. Salvador Arias Montes
Instituto de Biología, UNAM

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, Diciembre, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
OFICIO CPCB/777/2020
ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e


Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **28 de septiembre de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **SALGADO ORTÍZ HÉCTOR** con número de cuenta **305242200** con la tesis titulada **“Diversidad de virus en algunas especies del género Opuntia en México.”**, realizada bajo la dirección del **DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ROBERTO RUÍZ MEDRANO
Vocal: DR. JULIO CÉSAR VEGA ARREGUIN
Secretario: DR. ÁNGEL SALVADOR ARIAS MONTES
Suplente: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS
Suplente: DRA. MARTHA MARTINEZ GARCÍA

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de noviembre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

AGRADECIMIENTOS

- **Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM, por permitirme realizar mis estudios de Doctorado, y el desarrollo de este trabajo.**
- **Al CONACYT por la beca de manutención (no. 446131) recibida en el periodo 2016-2020.**
- **A mi tutor Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz por su asesoría, apoyo, comentarios, sugerencias, enseñanzas, regaños y más.**
- **A los miembros de mi comité Tutorial: Dr. Carlos F. Arias Ortiz y Dr. A. Salvador Arias Montes, por su apoyo y comentarios hacia mi trabajo y formación académica.**

Agradecimientos a título personal

- **A los miembros del Jurado: Dr. Jorge Campos Contreras, Dra. Martha Martínez García, Dr. Julio Vega Arreguin y Dr. Roberto Ruiz Medrano. Gracias por su apoyo y comentarios para la mejora de 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**

Glosario de abreviaciones

ADNcs: ADN de cadena sencilla

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

ARNdc: ARN de doble cadena

CMMoV: *Cactus mild mottle virus*

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

CVX: *Cactus virus x*

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

OpVX: *Opuntia virus x*

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

RCNaV: Rattal cactus necrosis-associated virus

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

RT-PCR: (*Reverse Transcriptase Polimerase Chain Reaction*)

BIScV: Blueberry Scorch virus

SchVX: *Schlumbergera virus x*

TMV: *Tobacco mosaic virus*

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

ZyVX: *Zygocactus virus x*

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| <u>CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS OV2 Y OPVH EN PLANTAS DE NOPAL</u> | |
| <u>CULTIVADAS.....</u> | 4 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL..... | 4 |
| Género Opuntia y su importancia..... | 4 |
| Enfermedades en nopal..... | 5 |
| Características y Diversidad de virus de Plantas..... | 7 |
| Clasificación taxonómica..... | 7 |
| Morfología de la partícula viral..... | 7 |
| Características del genoma viral..... | 8 |
| Factores de variabilidad genética de los genomas virales..... | 9 |
| Modelos de Transmisión de virus..... | 10 |
| ANTECEDENTES..... | 10 |
| OBJETIVOS..... | 12 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 12 |
| Validación de secuencias virales de RNA-seq por clonación y secuenciación de genoma completo..... | 12 |
| 3' RACE para secuenciación de extremos 5' y 3'..... | 12 |
| Amplificación y clonación de genomas virales completos..... | 13 |
| Construcción de dendrogramas de las secuencias de genoma de OV2 y de OpVH...15 | |
| Diseño y evaluación de una clona infectiva del Opuntia virus 2..... | 15 |
| Construcción de una copia de genoma completo del Opuntia virus 2 con el promotor T7..... | 15 |
| Transcripción <i>in vitro</i> de Opuntia virus 2..... | 16 |
| Inoculación mecánica de transcritos <i>in vitro</i> del Opuntia virus 2..... | 16 |
| RESULTADOS..... | 17 |
| Validación de secuencias virales de RNA-seq..... | 17 |
| Secuenciación de extremos 5' y 3' por 3' RACE..... | 17 |
| Amplificación y clonación de genomas virales completos..... | 18 |
| Análisis filogenéticos del OV2 y el OpVH..... | 19 |
| Evaluación de una clona infectiva del Opuntia virus 2..... | 21 |
| DISCUSIÓN..... | 23 |
| <u>CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE VIRUS EN PLANTAS DE NOPAL SILVESTRES.....</u> | 27 |
| INTRODUCCIÓN..... | 27 |
| OBJETIVO..... | 29 |

| | |
|---|-----------|
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 29 |
| Recolecta de material de plantas de Opuntia silvestres..... | 29 |
| Análisis prospectivo para el diagnóstico de virus por ensayos de la RT-PCR y secuenciación de productos..... | 29 |
| Transcriptómica (RNA-Seq) y análisis bioinformático..... | 31 |
| RESULTADOS..... | 32 |
| Diagnóstico de virus por ensayos de la RT-PCR y secuenciación de fragmentos del genoma viral..... | 32 |
| Transcriptómica (RNA-Seq) y análisis bioinformático..... | 34 |
| DISCUSIÓN..... | 36 |
| CONCLUSIONES GENERALES..... | 39 |
| APLICACIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES..... | 40 |
| LITERATURA CITADA..... | 41 |
| ANEXOS..... | 50 |
| Artículo requisito para graduación de Doctorado..... | 51 |
| MATERIAL SUPLEMENTARIO. CAPÍTULO 1. | 55 |
| MATERIAL SUPLEMENTARIO. CAPÍTULO 2..... | 61 |

PRÓLOGO

Este estudio forma parte del proyecto de investigación “Identificación y caracterización de virus en plantas de la familia Cactaceae” del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM, a cargo del Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz. Y a su vez es la continuación del proyecto de Maestría titulado: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS A MANCHAS ANULARES EN NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL.) EN MÉXICO, realizado durante el periodo de 2014 a 2016. En dicha investigación se identificaron cinco virus en plantas de nopal verdura de granjas en Otumba en el Estado de México, mediante secuenciación masiva de ARN.

El presente trabajo está dividido en dos capítulos, en el primero se presenta la caracterización molecular dos virus que no se habían identificado anteriormente: el Opuntia virus 2 y el Opuntia virus H; además se construyó una clona infecciosa del Opuntia virus 2 para continuar la caracterización biológica de este virus. Adicionalmente, este capítulo comprende la revisión bibliográfica y una introducción extensa acerca de la virología en plantas.

En el capítulo dos, siguiendo los métodos utilizados en la tesis de Maestría antes mencionada, se describe la identificación de tres virus de ARN en cuatro especies de nopales silvestres provenientes de dos sitios de colecta: *O. pilífera* y *O. depressa* de Zapotitlán Puebla y *O. tomentosa* y *O. robusta* de la Reserva de Pedregal, San Ángel en la Ciudad de México. Posteriormente, se realizó una comparación entre la diversidad de virus de nopales cultivados y nopales silvestres.

En la parte final se encuentra la división correspondiente al Anexo, en el cual se adjunta el artículo publicado donde se reporta el tobamovirus Opuntia virus 2 por primera vez en nopal verdura, también se presentan las figuras complementarias y la lista de oligonucleótidos que se diseñaron y utilizaron para los distintos experimentos.

RESUMEN

En los últimos diez años se ha dado una notable importancia a las infecciones virales en plantas de nopal (*Opuntia*) de la familia Cactaceae, en las cuales se han observado diversos síntomas, siendo uno de los más prevalentes las manchas cloróticas en forma de anillo. En plantas cultivadas para distintos usos humanos se han identificado varios virus, principalmente potex y tobamos. Sin embargo, dos nuevos virus requieren ser caracterizados molecular y biológicamente (OV2 y OpVH). Además, no hay trabajos donde se asocie la presencia de estos virus en plantas de nopal silvestres. Por lo cual, los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar molecular y biológicamente los nuevos virus identificados en nopales cultivados e identificar los posibles virus asociados a síntomas en nopales silvestres, para comparar la diversidad de virus entre plantas cultivadas y silvestres. El OV2 y el OpVH aislados de *O. ficus-indica* colectada de granjas en Otumba, Estado de México, fueron amplificados, clonados y secuenciados a genoma completo; sus extremos 5' y 3' terminales fueron secuenciados por 3'RACE. El análisis filogenético del OV2 demostró su agrupación con otros tobamovirus identificados en cactáceas y el dendrograma para el OpVH, agrupó a este virus con el cactus carlavirus 1 y el B1ScV. Una clona infecciosa del OV2 construida produjo arrugamiento sistémico en plantas de *N. benthamiana*.

Ambos virus representan agentes virales novedosos que infectan a plantas de *Opuntia*. Por otra parte, en plantas de las especies silvestres, *O. pilifera* y *O. depressa* en Zapotitlán de las Salinas, Puebla y *O. tomentosa*, *O. robusta* en la Reserva del Pedregal en Ciudad de México, se identificaron dos tobamovirus: el OV2 y el RCNaV y un nuevo nucleorhabdovirus. En comparación con los virus de plantas silvestres, las plantas

cultivadas están infectadas por más virus, lo cual podría deberse al manejo humano del nopal en granjas de producción de tuna y verdura y a la pérdida de diversidad genética derivada del cultivo por esqueje.

ABSTRACT

Viral infections in cactus plants (*Opuntia*) of the Cactaceae family have had considerable importance in the last ten years. Few symptoms have been seen on prickly pear plants, one of the most prevalent being chlorotic ring-shaped spots. In plants cultivated for different human uses, several viruses have been identified, mainly potex and toba. However, two new viruses need to be molecularly and biologically characterized (OV2 and OpVH). Furthermore, there are no works where the presence of these viruses is associated with wild prickly pear plants. Therefore, the objectives of this work were to characterize molecularly and biologically the new viruses identified in cultivated cactus plants and also identify viruses associated with symptoms in wild prickly pear plants. Finally, compare the diversity of viruses between cultivated and wild plants. OV2 and OpVH isolated from *O. ficus-indica* collected from farms in Otumba, Estado de Mexico were amplified cloned and sequenced to whole genome, their 5' and 3' terminal ends were sequenced by 3'RACE. Phylogenetic analysis of OV2 showed its grouping with the other tobamoviruses identified in cacti, and the dendrogram for OpVH grouped it with the cactus carlavirus 1 and B1ScV. A constructed OV2 infectious clone produced systemic wrinkling in *N. benthamiana* plants. Both viruses represent novel viral agents that infect *Opuntia* plants. On the other hand, in *O. pilifera* and *O. depressa* plants in Zapotitlán de las Salinas, Puebla, and *O. tomentosa*, *O. robusta* in the Pedregal Reserve in Mexico City, two tobamoviruses, OV2 and RCNaV, and one new nucleorhabdovirus were identified. Comparing wild cactus plants versus

cultivated plants, wild plants are infected by fewer viruses, which could be due to the human management of prickly pear in farms of prickly pear and vegetable production and the less genetic diversity due to grafting.

CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS

OV2 Y OPVH EN PLANTAS DE NOPAL CULTIVADAS

INTRODUCCIÓN GENERAL

Género *Opuntia* y su importancia

El género *Opuntia* (Cactaceae) contiene alrededor de 100 especies en todo el continente Americano de donde son nativas y su historia evolutiva está cercanamente relacionada con el desarrollo de las civilizaciones mesoamericanas. En México se reconocen aproximadamente 69 especies, colocando a este país como un centro de diversificación de este género y en general de la familia botánica (Reyes-Agüero *et al.* 2009; Hunt 2016). En dicho país se le llama “nopal” a la planta de *Opuntia* y “tuna” a su fruto. Dependiendo de la región geográfica, se cultivan para la producción de verdura *O. ficus-indica*, *O. duranguensis*, *O. megacantha*, *O. hyptiacantha.*, *O. leucotricha* y para el aprovechamiento de frutos, *O. ficus-indica*, *O. streptacantha*, *O. megacantha* y *O. joconostle*. Adicionalmente, para el uso de forraje, leña, fertilizantes, cosméticos y adhesivos se utiliza *O. ficus-indica*, *O. duranguensis*, *O. robusta*, *O. amyclaea*, *O. megacantha*, *O. hyptiacantha.*, *O. leucotricha* (INEGI, 2007; Sánchez *et al.* 2013). Estos organismos son descritos como plantas arborescentes, arbustivas o rastreras, con o sin tronco bien definido; artículos aplanados (cladodios o pencas), oblongos, elípticos, obovados, sub circulares o circulares; espinas sin vaina, el ápice retrobarbado; flores de hasta 6 cm de largo, comúnmente amarillas, su color se modifica al segundo día debido al cambio de pH y sus frutos son de diferentes formas, con paredes delgadas o gruesas, de sabor dulce, ácido o agridulce (Scheinvar 2004).

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 utilizada 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, es cultivada para la producción de cladodios tiernos que son utilizados en la gastronomía mexicana conocidos como “nopalitos” o nopal verdura. De igual manera, diversas especies de nopal son cultivadas ampliamente en todo el país para la producción de fruto o tuna.

El principal productor de este recurso es México, en 2018 se sembraron en este país 12,853.44 ha y se produjeron 853,495.23 ton de nopal verdura, lo cual es equivalente a 2.1 millones de pesos mexicanos. Los estados con mayor producción son Morelos, CDMX, Tamaulipas, Estado de México y Michoacán. En el año 2019 se sembraron 46,555.91 ha y se obtuvo una producción de 471,637.78 ton de tuna, equivalente a 1.37 millones de pesos mexicanos, siendo los estados de México, Zacatecas, Puebla, Hidalgo y San Luis Potosí los principales productores. Además de ser el principal productor, México también es el principal consumidor, aunque en los últimos 10 años, debido a la migración de mexicanos al país vecino del norte, el porcentaje de consumo de nopal verdura en otros países ha aumentado; por ejemplo, en 2016, el 5.6 % de la producción total del país fue exportada a Estados Unidos (SIAP.SAGARPA, <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>).

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. Sumado a esto, el nopal ha cobrado un gran auge en la investigación con aplicaciones industriales para las empresas energéticas, farmacéuticas y alimenticias (Guzmán *et al.*, 2003).

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 insectos (alrededor de 112 especies), hongos, bacterias, fitoplasmas y virus (Swart y Swart, 2003; Yahia, 2012). Las características bioquímicas del nopal quizá faciliten 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 causadas por los patógenos antes mencionados (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 que se asocian a pudriciones blandas, por ejemplo, *Erwinia spp* y *Pseudomonas viridiflada* (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), a pesar de la importancia de los cultivos de nopal en México, la información que se ha generado sobre síntomas asociados a virus es escasa

Características y Diversidad de virus de Plantas

Clasificación taxonómica

De acuerdo con el sistema de Baltimore (1971), la clasificación actual de virus engloba siete clases independientes y 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 generales en la morfología de la cápside proteica de virus de plantas. La primera simetría conocida como elongada a su vez comprende dos formas, de varilla rígida (Figura 1A) con tamaños alrededor de 300 nm de largo, y la de varilla flexible, con un tamaño aproximado de 500 a 2000 nm (Figura 1B). Por otra parte, el segundo tipo es la icosaédrica (casi esférica) con un tamaño típico de 30 nm (Figura 1C), con dos variantes, los viriones de forma baciliforme (Figura 1D) y los de forma gemela (Walkey, 1991), estos últimos compuestos por la unión de dos icosaédros incompletos, partícula típica de la familia *Geminiviridae* (Figura 1E).

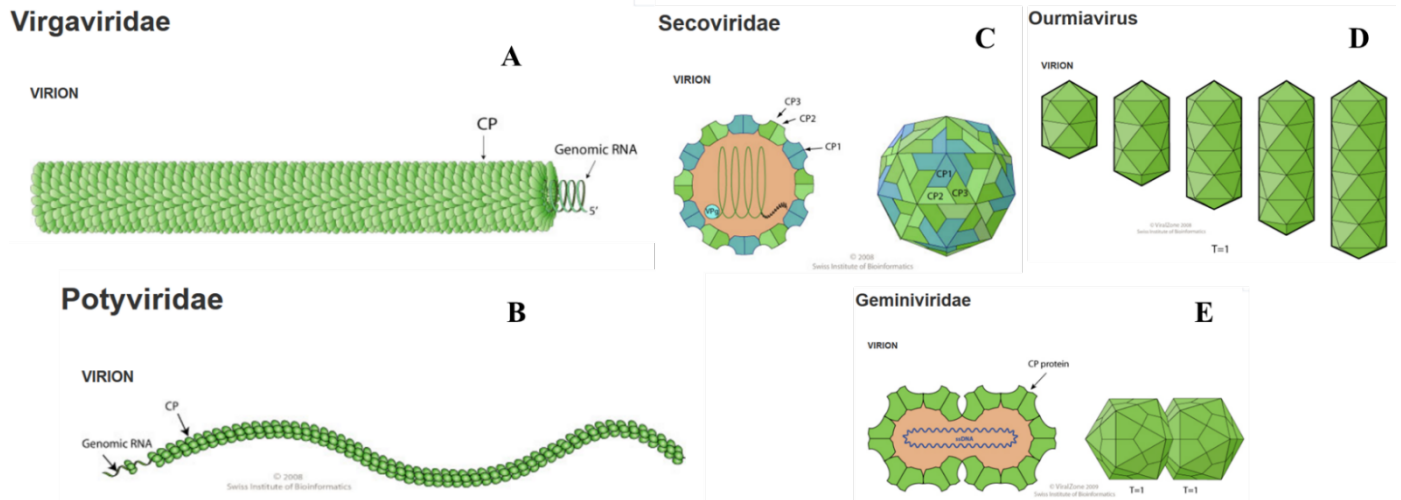


Figura 1. Tipos de morfologías de las cápsides proteicas de virus de plantas. Elongadas: **A.** varillas rígidas, (familia *Virgaviridae*); **B.** varillas flexibles, (familia *Potyviridae*). **C.** icosaédricas (familia *Secoviridae*), de sus dos variantes, tipo **D.** baciliformes (género *Ourmiavirus*) y **E.** gemelas, (familia *Geminiviridae*). (Viralzone, consultado el día 22 de

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 *Alfalflexiviridae*. 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 infectan plantas y pasan por un intermediario de ARN en su replicación (Gergerich y Dolja, 2006).

Por otra parte, los verdaderos virus de ADN de cadena sencilla (ADNcs), están representados por la familia *Geminiviridae*, de gran importancia económica y en su ciclo replicativo pasan por una fase intermedia de ADN de doble cadena. Con base en la

diversidad de 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. De manera general, 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

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 homólogas del genoma es muy alta y 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 en respuesta de 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, derivado de 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 llamados vectores, entre 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, existiendo casos donde el virus se replica dentro del organismo vector, provocando así que el organismo lo transmita mientras durante toda su vida (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).

ANTECEDENTES

Se han reconocido diversas especies de virus que infectan a especies de la familia Cactaceae, siendo los de 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). Estos infectan solos o en conjunto a especies como

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).

También se han identificado virus como el *Saguaro cactus virus*, SCV (*Carmovirus*) identificado en *Carnegiea gigantea* (Milbrath y Nelson, 1972) y el *Tomato spotted wilt virus*, TSWV (*Tospovirus*) que fue reportado en *Schlumbergera truncata* (Hausbeck y Gildow, 1991). Otros virus comunes en cactáceas son los del género tobamovirus, como el *Sammons' Opuntia virus* (SOV), en *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) aislado de *Aporcactus flagelliformis* (Kim *et al.*, 2012). Las infecciones mixtas de potex y tobamo son comunes por ejemplo, en *Notocactus leninghausii* f. *Cristatus* (Park *et al.* 2018).

La secuenciación masiva de ARN (RNA-seq) permitió la identificación de genomas virales completos y de otras secuencias de posibles virus no identificados anteriormente en nopal, dichas secuencias están relacionadas a los géneros *Tobamovirus* y *Carlavirus*, el *Opuntia virus 2* (OV2) y el *Opuntia virus H* (OpVH), respectivamente (Salgado 2016). No obstante, no se demostró la etiología de los síntomas descritos pues únicamente se identificó la asociación de los virus a los daños.

Estas secuencias obtenidas por secuenciación masiva requieren ser validadas por medio de ensayos convencionales como la clonación y secuenciación del genoma viral completo, además de seguir los experimentos para poder relacionar la presencia de un virus en particular con el síntoma observado.

OBJETIVOS

Objetivo principal: validar por medio de la caracterización molecular del genoma viral, las secuencias genómicas de los virus OV2 y OpVH obtenidas anteriormente por secuenciación masiva.

Objetivo secundario: validar la capacidad infectiva del virus OV2.

MATERIAL Y MÉTODOS

Retomando los resultados obtenidos durante el proyecto de Maestría (CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS ASOCIADOS A MANCHAS ANULARES EN NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL.) EN MÉXICO), donde se identificaron dos probables virus desconocidos: el OV2 y el OpVH, en el presente trabajo, se caracterizaron molecularmente ambos genomas mediante los siguientes métodos: secuenciación de los extremos 5' y 3' terminales del genoma viral y la clonación y secuenciación del genoma completo. Para estos experimentos se utilizó el ARN total extraído de una planta con síntomas de *O. ficus-indica*, el cual estaba resguardado a -70 °C en el Lab. De Fitopatología de la FES Iztacala.

Las secuencias de los oligonucleótidos diseñados y utilizados para cumplir los diferentes objetivos se encuentran en la sección de Anexo.

Validación de secuencias virales de RNA-seq por clonación y secuenciación del genoma completo

3' RACE para secuenciación de extremos 5' y 3'.

Para validar las secuencias de los genomas de los probables nuevos virus obtenidos por RNA-seq: OV2 y OpVH de las plantas de *O. ficus-indica* y *O. albicarpa*, se

amplificaron y secuenciaron los extremos 5' y 3' del genoma viral de ambos virus utilizando el método de 3' RACE (Rapid amplification of cDNAs ends) (Roche Diagnostics, Mannheim Germany). Para secuenciar los extremos 3' y 5' del OV2, se utilizaron los oligonucleótidos específicos VP3337s y VP3374As, respectivamente. En el caso del OpVH se utilizaron los respectivos oligonucleótidos específicos VP3356As y VP343491 para los extremos 5' y 3' terminales.

Amplificación y clonación de genomas virales completos.

Una vez que se obtuvo la secuencia de los extremos 5' y 3' de estos virus, se amplificó y clonó el genoma completo de cada uno por medio de RT-PCR con el kit Superscript III One-step Hi Fi (Invitrogen, Carlsbad, CA); para obtener mayor concentración del producto de la RT-PCR, este fue re-amplificado por PCR con la enzima PrimeSTAR® HS DNA Polymerase (Takara Bio Europe, Saint-Germain-en-Laye; France). El OV2 fue amplificado completo con los oligonucleótidos VP3379s y VP3380As, la banda del tamaño de 6.5 kb fue cortada y purificada del gel con GeneJET Gel extraction kit (Thermo Fisher Scientific) y clonada con el vector pJet 1.2 de CloneJET PCR cloning kit (Thermo Fisher Scientific). Para seleccionar las colonias con el inserto completo, se realizó un PCR con los oligonucleótidos VP3352s y VP3380As, los cuales amplifican un fragmento de 400 pb y flanquean la región del 3' terminal del genoma viral. Se picaron 14 colonias para utilizarlas como templado en una reacción de PCR *colony* utilizando la enzima GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, Madison, USA). Después, las colonias que dieron positivo en el PCR *colony* fueron crecidas a 37 °C toda la noche para aislar el plásmido con el kit GeneJET plasmid miniprep kit (Thermo Fisher Scientific) y preparar una reacción con 3 µL del plásmido y la enzima BglII que libera el inserto del

plásmido. Las reacciones fueron separadas en gel de agarosa al 1% para observar el patrón de bandeo esperado (digestión calculada en Geneious 7).

Posteriormente, la clona de una colonia individual se secuenció directamente (Sanger) para obtener el genoma completo utilizando los siguientes oligonucleótidos: VP3379s, VP3380As, VP33401s, VP33402s, VP33403s, VP33404s, VP33406As, VP33407As, VP3390As y VP3353As.

En el caso del OpVH, se utilizaron los oligonucleótidos VP3419s y VP2885As para amplificar el genoma completo de 8400 kb, sin embargo los resultados fueron negativos, alternativamente se diseñaron seis juegos de oligonucleótidos para amplificar el genoma completo en tres segmentos que se superponen entre sí. El primer segmento corresponde a los nucleótidos 1-3493 y fue amplificado con los oligonucleótidos VP3419s y VP3441As; el segundo segmento corresponde a los nucleótidos 3367-6710 y se usaron los oligonucleótidos VP3442s y VP3358As y el último segmento representa a los nucleótidos 6572-8385 y los oligonucleótidos usados fueron VP2884s y VP2885As. Los tres segmentos se purificaron y clonaron de igual manera que el OV2. Para seleccionar las colonias con el inserto completo en cada uno de los tres segmentos amplificados se realizó un PCR *colony* con los oligonucleótidos VP3419s y VP3356As para el primer fragmento; para el segundo se utilizaron VP3442s y VP3441As y para el último fragmento se utilizaron VP2884 y VP3359 que amplifican un fragmento de 200 a 400 pb.

Finalmente, el genoma completo se secuenció directamente (Sanger) a partir de una clona individual de cada fragmento, utilizando los siguientes oligonucleótidos: VP3419s, VP3440s, VP3441As, VP3442s, Carla_1126, VP3459s, VP3461s, VP3462s, VP3358As, VP3360As y VP3418s.

Para calcular la similitud entre ambos virus, se alinearon las secuencias de los genomas clonados y los *contigs* obtenidos por RNA-seq, este alineamiento se realizó por medio de clustal W en el Software Geneious 9.

Construcción de dendrogramas de las secuencias de genoma del OV2 y del OpVH

Para la validación taxonómica y filogenética de ambos virus se construyeron dendrogramas por el método *neighbor-joining* y el modelo de Jukes-Cantor con 1500 pseudo-réplicas de bootstrap, con el software MEGA X (Kumar *et al.* 2018), para esto se utilizó la secuencia de genoma completo, la secuencia de los ORFs de la CP y la RdRp y las secuencias virales del mismo género obtenidas del GenBank. Se utilizaron secuencias virales de la misma familia como grupo externo. Se eliminó las secuencias redundantes con un corte de 85 a 90% con el software CD-HIT (Li *et al.* 2001).

Diseño y evaluación de una clona infectiva del Opuntia virus 2

Para determinar la capacidad infectiva del OV2 y verificar si podría ser el agente causal de los síntomas de manchas anulares amarillas, se construyó una clona infectiva que se probó por ensayos de transmisión mecánica en plantas de *N. benthamiana* libres de virus.

Construcción de una copia del genoma completo del Opuntia virus 2 con el promotor T7.

Se utilizó el genoma completo clonado del Opuntia virus 2 como molde para realizar una amplificación utilizando el oligonucleótido VP3400s en el extremo 5', especialmente diseñado para este propósito. Este oligonucleótido contiene la región promotora de la RNA polimerasa del bacteriófago T7 río arriba del primer nucleótido del genoma del Opuntia virus 2 y en el extremo 3' se utilizó el oligonucleótido VP3439As.

Se llevó a cabo una reacción de PCR de 20 μ L con el kit PrimeStar HS (Takara Bio Europe) y se utilizó 1 μ L del producto de PCR para visualizar la concentración y calidad en un gel de agarosa al 1%.

Transcripción *in vitro* de Opuntia virus 2.

Con el producto de PCR restante, se realizó una transcripción *in vitro* de 20 μ L con la T7 Pol (Takara Bio Europe), esta reacción presentó los siguientes componentes: 2 μ L de Buffer 10x de T7, 2 μ L de mix NTPs (10mM), 0.4 Ribolock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific), 0.7 μ L de T7 Polimerasa (Takara Bio Europe), 2 μ L de DNA del producto de PCR y 12.9 μ L de agua libre de nucleasas. La mezcla se incubó 2 horas a 37 °C. La concentración de RNA transcrito fue comprobada en 1 μ L separado en gel de agarosa al 1%. Los 19 μ L de transcritos restantes fueron fenolizados y precipitados con etanol absoluto y Acetato de sodio 3M y se eluyeron en 15 μ L de agua libre de nucleasas. Posteriormente, se utilizaron en una reacción de poliadenilación del extremo 3' con PolyA Polimerasa de *E. coli* (New England BioLabs), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después se repitió la fenolización y se re-suspendió en 13.5 μ L de agua libre de nucleasas para realizar la reacción de adición de la secuencia cap del extremo 5' con ScriptCap m7G Capping System (CELLSCRIPT) siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente 20 μ L de reacción de transcritos poliadenilados y con secuencia cap fueron utilizados en los ensayos de inoculación mecánica.

Inoculación mecánica de transcritos *in vitro* del Opuntia virus 2.

Se tomaron de 4 a 6 hojas de dos plantas de *Nicotiana benthamiana* germinadas libres de virus en estadio de crecimiento; estas hojas fueron inoculadas mecánicamente con Carburo

de silicio (carborundum) y 10µL de transcritos repartidos en dos hojas de cada planta. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero por 15 días a la espera de la aparición de síntomas.

RESULTADOS

A partir de la caracterización molecular de los dos virus (OV2 y OpVH) identificados en plantas de nopales cultivados (*O. ficus-indica* y *O. albicarpa*), se obtuvo lo siguiente:

Validación de secuencias virales de RNA-seq

Secuenciación de extremos 5' y 3' por 3' RACE

Opuntia virus 2. Utilizando como templado la muestra de *O. ficus-indica*, se obtuvieron amplicones del tamaño esperado (200 pb) para ambos extremos 5' y 3' (Figura suplementaria 1). La secuencia obtenida de estos productos mostró un 97% de similitud con la secuencia de genoma obtenida por RNA-seq en ambos extremos, 5' y 3', además confirmó el inicio y final de la secuencia genómica del Opuntia virus 2.

Opuntia virus H. Se obtuvo una banda en el tamaño esperado (250 pb) para el extremo 5' utilizando como templado la muestra de *O. ficus-indica*. La secuencia obtenida tuvo un 98% de similitud al genoma obtenido por RNA-seq y añadió once nucleótidos al inicio del genoma en la región 5'terminal. Por otra parte, en el extremo 3' terminal se obtuvo un amplicón de 150 pb y la secuencia mostró un 98% de similitud al genoma referencia y una adición de quince nucleótidos en el extremo 3' terminal del genoma (Figura suplementaria 2).

Amplificación y clonación de genomas virales completos.

Una vez que se obtuvieron las secuencias de los extremos 5' y 3' terminales del OV2 y del OpVH, fue posible obtener la secuencia completa de los genomas virales por medio de su clonación.

Opuntia virus 2. Se obtuvo una banda de 6.5 kb que corresponde al tamaño esperado de este tobamovirus (Figura suplementaria 3), la cual fue purificada de gel para su clonación. El PCR *colony* con los oligonucleótidos VP3352s y VP3380As permitió identificar las colonias con el inserto de interés al rendir un amplicón de 450 pb, aproximadamente (Figura suplementaria 4). Posterior a esto, el ensayo de restricción con BglIII permitió identificar las colonias que tenían el inserto completo de 6.5 kb correspondiente al genoma viral, con base en el patrón de bandeado esperado (Figura suplementaria 5). Una colonia fue seleccionada para su secuenciación directa y la obtención de la secuencia del virus de 6543 nt (Figura. 2).

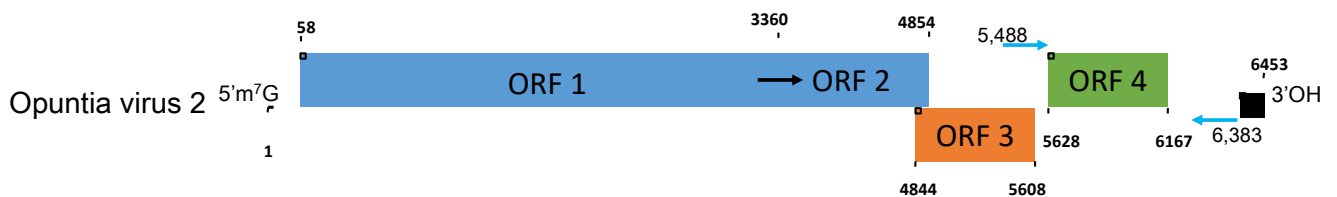


Fig. 2. Esquema del genoma completo del OV2. Los números indican el nucleótido de inicio y final de cada ORF y del genoma completo, respectivamente. La estructura de ARNt en el extremo 3' está representado por el cuadro negro. La flecha negra representa el sitio donde la polimerasa realiza el *readthrough leaky scanning* para traducir la proteína completa del ORF 2. Las flechas azules indican el sitio donde alinean los oligonucleótidos Tobamo_2nopF y Tobamo_2nopR, utilizados para los ensayos de diagnóstico con RT-PCR.

Dicha secuencia fue depositada en el GenBank de NCBI (*accession number* MF434821) y mostró un porcentaje de similitud de 98.4% con la secuencia obtenida por RNA-seq. Se identificaron cuatro ORFs que corresponden a: ORF 1 a la proteína de 128kDa y el ORF 2 a la proteína de 187kDa, ambas son subunidades de la RdRp. El ORF 3 que corresponde a la MP y el ORF 4 que codifica la CP. El genoma completo del OV2 mostró un 49% de similitud con otros dos tobamovirus aislados de cactus el *Cactus: mild mottle virus* (CMMoV) y el RCNaV.

Opuntia Virus H. Se observaron bandas en el tamaño esperado para cada uno de los tres fragmentos en los que se amplificó el virus. Para el segmento que comprende del nucleótido 1 al 3493 se obtuvo una banda de 3 kb, el tamaño del segundo segmento que comprendió del 3493 al 6710 fue de 3 kb y finalmente con el segmento tres que comprende de 6572 al 8385 se obtuvo una banda de 2 kb (Figura suplementaria 6). En los tres casos el producto de PCR se purificó y se clonó.

Los ensayos de PCR *colony* rindieron amplicones en el tamaño esperado, para el primer fragmento 200 pb, para el segundo fragmento 150 pb y para el tercero 2 kb (Figura suplementaria 7), lo que permitió la identificación de las colonias con el inserto. CEI ensayo de restricción con BglIII verificó que estaban los insertos completos, ya que se observó la banda del producto en el tamaño esperado de 3kb para los dos fragmentos iniciales. En el caso del fragmento de 2kb, al obtener la banda del tamaño esperado en el PCR *colony* (2kb), no fue necesario realizar el ensayo de restricción, pues ya se había confirmado que el inserto estaba completo (Figura suplementaria 8).

Mediante el ensamble de las secuencias obtenidas de las clonas de los tres fragmentos se obtuvo una secuencia consenso de 8,398 nt (Figura 3) que fue depositada en

el banco de datos de GenBank de NCBI (*accession number* KU854930). Dicha secuencia mostró un porcentaje de similitud de 91.6 % con la secuencia obtenida anteriormente por RNA-seq. Se identificaron seis ORFs que correspondieron a la RdRp, las tres proteínas del

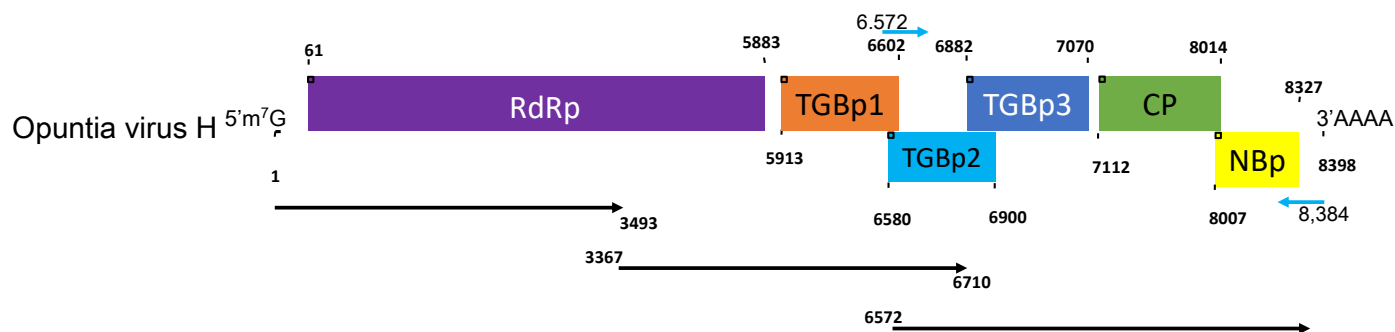


Fig. 3. Esquema del genoma completo del OpVH. Los números indican el nucleótido de inicio y final de cada ORF y del genoma completo, respectivamente. Las flechas negras representan los tres fragmentos en los que se amplificó y clonó el genoma. Las flechas azules indican el sitio donde alinean los oligonucleótidos VP2884sCarla y VP2885AsCarla, utilizados para los ensayos de diagnóstico con RT-PCR.

TGB, la CP y la NBp. La secuencia de aminoácidos de la RdRp y la CP del OpVH mostró porcentajes de similitud de 70% y 56% respectivamente con otros carlavirus y de 95% y 94% con el MK415617 Cactus carlavirus 1 (CCV-1).

Análisis filogenéticos del OV2 y el OpVH.

El árbol filogenético de genoma completo obtenido para el OV2 lo agrupó con el RCNaV y el CMMoV, conformando el subgrupo de cactáceas (Figura 4). Por otro lado, el dendrograma de genoma completo para el OpVH lo agrupó con el *Cactus Carlavirus 1* (CCV1) con 100% de valor de *bootstrap* y con el *Blueberry scorch virus* (BlScV) y el *Hydrangeae chlorotic mottle virus* con 83% de valor de *bootstrap* (Figura 5).

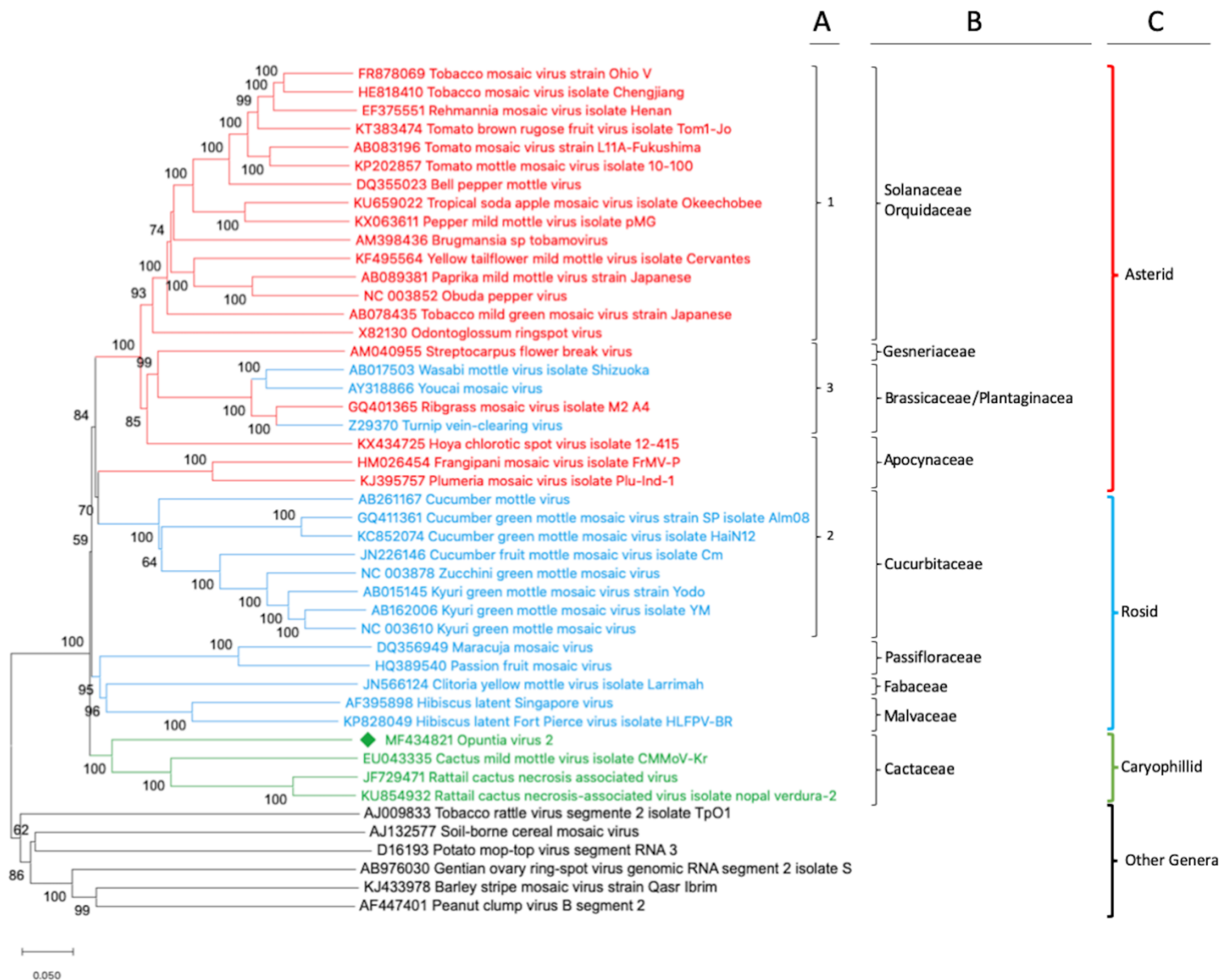
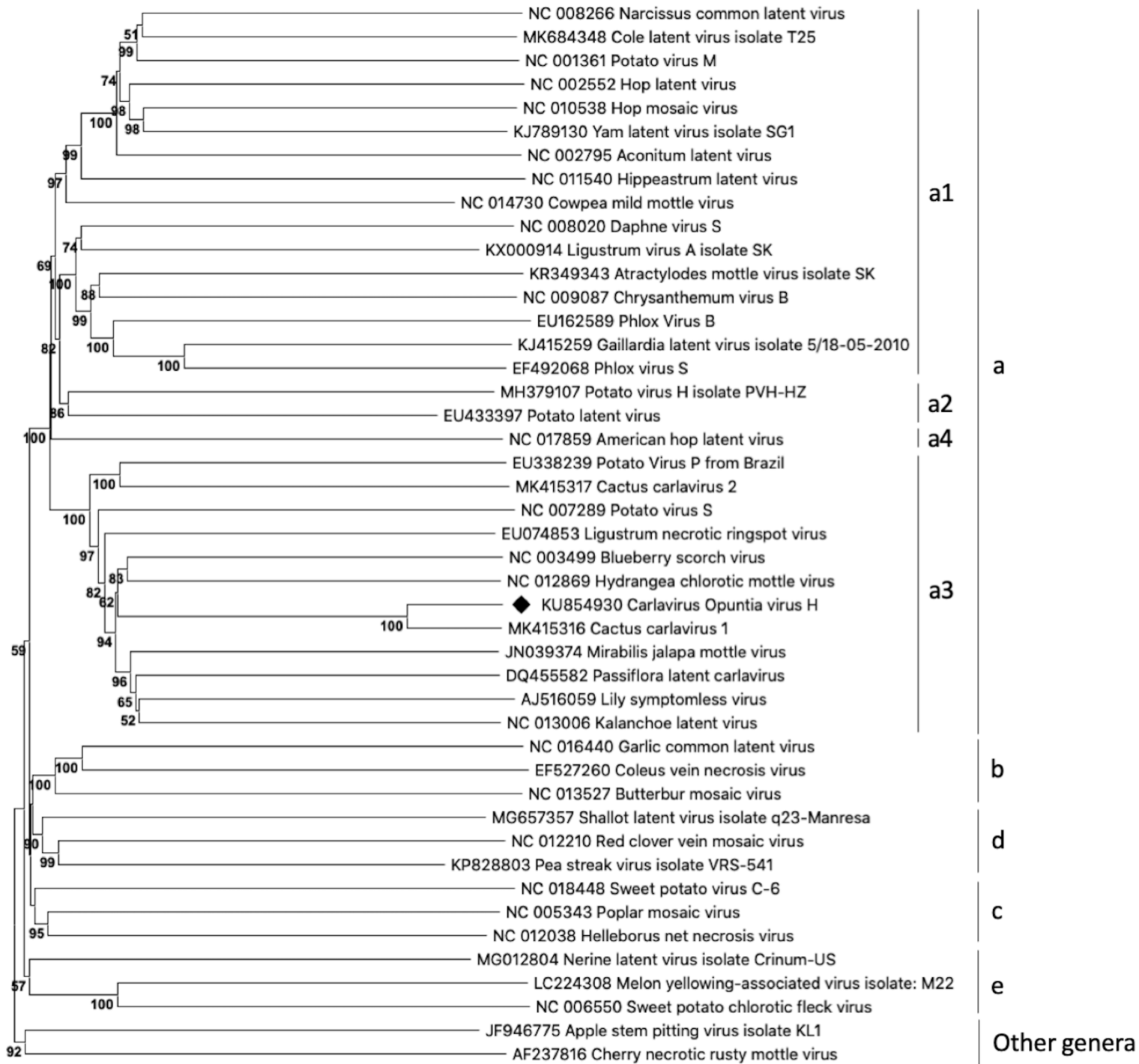


Fig. 4. Análisis filogenético de miembros del género *Tobamovirus*. usando la secuencia de genoma completo de 34 especies disponibles en la base de datos de GenBank más el nuevo OV2 identificado en plantas de *Opuntia* el cual esta indicado por un diamante . Los agrupamientos de los tobamovirus se conservan con base en diferentes clasificaciones: A. basada en rango de hospedero natural, organización genómica y sitio de origen de ensamble. B. Clasificación de acuerdo con la familia del hospedero según Song et al. 2006. C. División en los tres principales grupos de eudicotiledoneas: asterids, rosid y caryophyllid, de acuerdo a Gibbs et al. 2015. Los números en cada nodo indican el valor de porcentaje de bootstrap (1500). Other Genera se refiere a miembros de otros géneros de la familia *Virgaviridae*. La barra de escala representa el número de sustituciones por sitio (tomada de Salgado et al. 2020).



50

Fig. 5. Análisis filogenético del género *Carlavirus* usando la secuencia de nucleótidos del genoma completo de 42 especies disponibles en GenBank más el nuevo *Opuntia* virus H identificado en nopal que se indica con un diamante (). Los números en cada nodo indican el valor de porcentaje de bootstrap. Other Genera se refiere a otras especies virales asignadas a diferentes géneros de la familia *Betaflexiviridae*. a, b, c, d y e se refiere a los grupos propuestos por Liu et al. 2019. La barra de escala muestra el número de sustituciones por sitio.

Evaluación de una clona infectiva del *Opuntia virus 2*

Un producto en el tamaño esperado de 6.5 kb confirmó la amplificación de la clona con la región promotora T7 adicionada al genoma de OV2.

Los transcritos virales de OV2 fueron capeados en su extremo 5' y poliadenilados en su extremo 3', para posteriormente ser inoculados mecánicamente en 2 plantas de *N. benthamiana*. A los 15 días post inoculación se observaron síntomas leves en hojas locales y sistémicas que consistieron en deformación foliar y arrugamiento (Figura 6).



Fig. 6. Plantas de *N. benthamiana* inoculadas mecánicamente con la clona del OV2. **A.** Planta con cinco días post-inoculación, no se observan síntomas. **B.** Planta 15 días post-inoculación, se observan hojas sistémicas con arrugamiento señaladas por flechas (→).

Después se repitió la inoculación mecánica utilizando como inoculo las hojas de *N. benthamiana* que tenían los síntomas sobre otras dos plantas sanas. A los cinco días post inoculación se repitieron los síntomas observados anteriormente, de esta manera se

confirmó la naturaleza infecciosa de la clona construida del OV2. Además, por medio de RT-PCR con los oligonucleótidos VP3373s/VP3380As y usando como templado ARN total de *N. benthamiana* con síntomas, se obtuvieron amplicones en el tamaño esperado lo que confirmó la presencia del virus (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizó molecularmente al virus *Opuntia virus 2* y al *Opuntia virus H* aislados de nopal verdura (*O. ficus-indica*), se amplificó y clonó el genoma completo de ambos virus para posteriormente secuenciarlo por Sanger. Una clona infecciosa del OV2 fue transmitida exitosamente a plantas de *N. benthamiana* provocando arrugamiento leve de hojas. El genoma completo del OV2 presenta la organización genómica típica de los tobamovirus: dos ORFs que conforman la proteína de replicación RdRp, la proteína de movimiento MP y finalmente la proteína de cápside CP.

El género *Opuntia* ha sido dividido históricamente con base en el rango de huéspedes, organización genómica y en el sitio de inicio de ensamble, también se ha dividido según la familia del hospedero que infectan (Min et al. 2006, Song et al. 2006). Como se observa en el dendrograma (Figura 4), el OV2 se incluye en el subgrupo Cactaceae. Por otra parte, Gibbs ha mostrado que a excepción de tres de 29 especies, todos los tobamovirus se agrupan en tres grupos principales que corresponden a las tres subdivisiones de plantas eudicotiledóneas: asteridos (asteroids), rosidos (rosid) y caryophyllales (caryophyllid) (Gibbs et al. 2015). El OV2 se mantiene agrupado al grupo caryophyllid junto a los otros tobamovirus de cactus (Figura 4), reforzando la hipótesis de co-divergencia entre tobamovirus y su planta hospedera.

De acuerdo con el comité internacional de taxonomía de virus (International Committee on Taxonomy Viruses o ICTV por sus siglas en inglés), el Opuntia virus 2 debería ser considerado un nuevo miembro del género tobamovirus por su bajo nivel de similitud de secuencia genómica (menor al 90%) (Adams et al. 2018), ya que la similitud más alta con otros tobamovirus fue de 49%. Por otro lado, los resultados del presente trabajo indican que el genoma completo de OpVH, comprende la estructura típica de los carlavirus: la RdRp, el Triple gene block con las tres proteínas: la CP y una proteína de unión a ácidos nucleicos (NBP).

El dendrograma del genoma completo (Figura 5) agrupó al OpVH con el CCV-1 y el Blueberry scorch virus, conformando el subgrupo a3 descrito por Liu et al. 2019. El Cactus carlavirus 1 (CCV-1), un carlavirus aislado en híbridos de *Epiphyllum sp* en China, es un aislado del OpVH como lo mencionan los autores (Peng et al. 2019). Sin embargo, un análisis más detallado de la secuencia de ambos aislados reveló la presencia de 26 nt en el 5' terminal del OpVH que están ausentes en el CVV-1. Además, una secuencia consenso 5'TA/4-5(T)/2-4(N) en el 77.2% de las secuencias completas de carlavirus depositadas en la base de datos de GenBank fueron observadas en el OpVH pero no el CCV-1. Hasta el momento, el OpVH sólo se ha identificado en una especie de nopal verdura cultivado. Por otro lado, CCV-1 fue identificado sólo en una planta de *Epiphyllum* (Peng et al. 2019), lo cual podría indicar una distribución restringida para este virus. Sin embargo, hacen falta más trabajos de incidencia y prevalencia en diferentes plantas de nopal y otras cactáceas.

Con base en los criterios de demarcación de especies del ICTV (Adams et al. 2009b), el OpVH debería ser considerado un nuevo miembro del grupo de carlavirus al

mostrar menos del 80% de similitud entre los genes de la CP y la RdRp con otros carlavirus (figura).

La construcción de clonas infectivas es una herramienta útil en el estudio de virología de plantas, permitiendo la caracterización biológica del virus y abriendo la posibilidad a diversos experimentos para caracterizar los componentes virales y estudios de interacción planta-virus (Pasin et al. 2019). La clona infecciosa del OV2 que se obtuvo, permitió asociar la presencia de síntomas leves en plantas de *N. benthamiana*, es decir, una infección atenuada o suave se confirmó con la presencia de arrugamiento leve en las hojas después de 15 días post-inoculación (figura). Este proceso infeccioso lento también fue confirmado al usar extractos de nopal tunero con síntomas en plantas indicadoras (De La Torre et al. 2007; Salgado 2016). De igual manera, el RCNaV identificado en el cactus *Aporcactus flagelliformis* produce arrugamiento de hojas en *N. benthamiana* (Kim et al. 2012). Otros tobamovirus también han sido caracterizados biológicamente construyendo una clona infecciosa, de esta caracterización se han obtenido buenos resultados para asociar los daños observados con la presencia de un tobamovirus en particular (Morishima et al. 2003; Junqueira et al. 2013).

CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE VIRUS EN PLANTAS DE NOPAL SILVESTRES

INTRODUCCIÓN

México es el país con mayor diversidad de especies de nopal, lo cual se ve reflejado en las distintas presentaciones y usos tanto del nopal verdura como de las tunas. La distribución geográfica de estas especies comprende todo el territorio mexicano y se concentra en la región centro del país y en las regiones áridas del desierto Chihuahuense y la zona semiárida del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (Scheinvar et al. 2011).

Por otro lado, los análisis transcriptómicos (RNA-seq), han revolucionado la identificación de virus, tanto en plantas como en otros organismos, generando el descubrimiento de virus nuevos, sin la necesidad de ningún conocimiento previo (Adams *et al.* 2009a; Roossinck *et al.* 2015). Este es el caso de algunos virus encontrados en plantas del género *Opuntia*.

Por ejemplo, en los últimos 15 años se han identificado en México plantas de nopal tunero (*O. albicarpa*) y nopal verdura (*O. ficus-indica*) con síntomas de manchas cloróticas. Estos síntomas se asociaron a los virus SchVX del género Potexvirus, y el RCNaV perteneciente a los tobamovirus (De La Torre *et al.* 2016a; De La Torre *et al.* 2016b).

Por otra parte, los daños de manchas cloróticas observados en nopales cultivados también se han encontrado en otras especies de *Opuntia* silvestres localizados en distintos sitios a lo largo de la República Mexicana y parte del desierto norteamericano. Específicamente, daños similares a estos se han observado en las especies silvestres *O. pilifera* y *O. depressa*, de la región de Zapotitlán de las Salinas, Puebla (Figura 7) y en otras dos especies silvestres (*O. tomentosa* y *O. robusta*) de la Reserva del Pedregal en

C.U, CDMX. (Figura 8). Por el tipo de daño observado en estas plantas silvestres, se plantearon varias posibilidades: que los síntomas estuvieran asociados a uno o varios virus y que estos podrían ser o no los mismos identificados previamente en nopales cultivados. Por lo antes mencionado, se plantearon los siguientes objetivos para este trabajo.

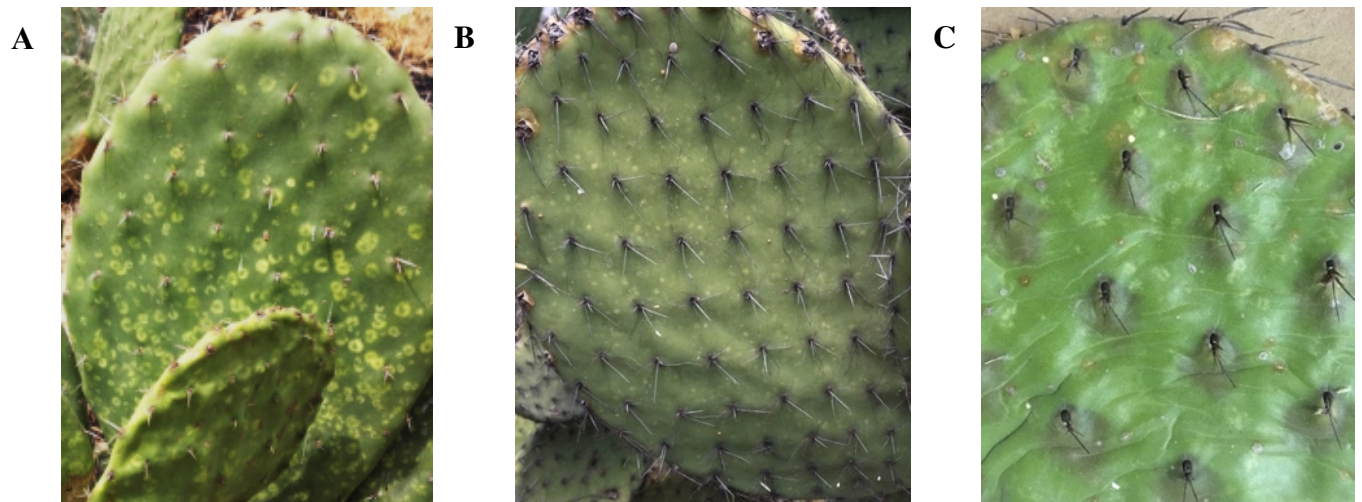


Figura 7. Manchas anulares de color amarillo en nopales cultivados **A.** *Opuntia albicarpa*. Daños similares en nopales silvestres de Zapotitlán **B.** *Opuntia pilifera* y **C.** *Opuntia depressa*.

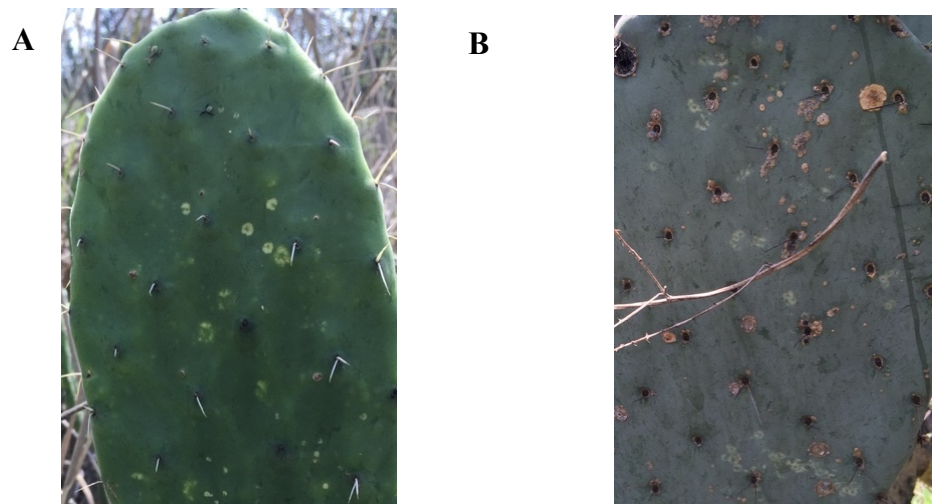


Figura 8. Nopales silvestres de la especie **A.** *O. tomentosa* y **B.** *O. robusta* de la Reserva del Pedregal en C.U. con daños de manchas anulares amarillas similares a otras plantas de nopales

OBJETIVO

Objetivo Principal: establecer la diversidad de virus de ARN en plantas silvestres y compararla con los virus identificados previamente en plantas cultivadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para diagnosticar la diversidad de virus presentes en plantas silvestres de *Opuntia* se realizó lo siguiente:

Recolecta de material de plantas de *Opuntia* silvestres

Se recolectaron cladodios con daños tipo manchas anulares de tamaños irregulares de especies silvestres del género *Opuntia* en dos sitios de colecta. En Zapotitlán de las Salinas, Puebla (18° 19' 54.1 N, 97° 27' 29.4 O) se colectaron cinco de estas muestras de las especies *O. pilifera* y *O. depressa*, mientras que en la Reserva del Pedregal de Ciudad Universitaria de la UNAM, CDMX (19° 19' 10'' N, 99° 11' 37'' O) se recolectaron dos cladodios de plantas las especies *O. robusta* y dos *O. tomentosa*. Se tomó parte del tejido de la dermis de los cladodios, se liofilizó y se mantuvo en congelación a -70° C para mantener el tejido en caso de que posteriormente se requiera ese material.

Análisis prospectivo para el diagnóstico de virus por ensayos de la RT-PCR y secuenciación de productos

Para la identificación de los virus reportados con mayor frecuencia en cactáceas (tobamovirus y potexvirus), se desarrollaron ensayos de transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se utilizó como templado el producto de extracciones de ácidos nucleicos totales obtenidos por el método modificado de Dellaporta

et al. 1983 a partir de 1 g de tejido. Para esto se tomó dermis de los cladodios, se maceró en buffer de extracción (Urea 7M, NaCl₂ 0.35M, Tris-base 0.05M, EDTA 0.02M y Laurylsarcosina 1%). Los ensayos de RT-PCR se realizaron con el kit Superscript III One-step (Invitrogen, Carlsbad, CA), junto con los juegos de oligonucleótidos correspondientes a cada virus. 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, siguiendo el método de Dovas, *et al.* 2004. Para un primer ensayo de RT-PCR que rindió un amplicón de 540 pb. Posteriormente, utilizando la enzima Taq Pol Platinum (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el segundo par de oligonucleótidos TobN up3 y TobN do4, se realizó un PCR anidado que rindió un amplicón de 450 pb

Para el grupo potexvirus se utilizaron dos pares de oligonucleótidos degenerados que amplifican segmentos conservados del gen de la replicasa (RdRp), siguiendo el método descrito por Van der Vlugt y Berendes en 2002. Los oligonucleotidos Potex F5/Potex R1 rindieron un amplicón de 735 pb, mientras que Potex F5 /Potex R2 rindieron un amplicón de 584 pb.

Por otra parte, se probaron oligonucleótidos específicos diseñados y validados previamente en el laboratorio de Fitopatología, que amplifican el gen de la proteína de la cápside para los virus SchVX (De La Torre *et al.* 2016a) y RCNaV (De La Torre *et al.* 2016b), además de otros Potexvirus, como OpVX, ZyVX y CVX. También se utilizaron oligonucleótidos específicos diseñados para identificar a los dos posibles nuevos virus que se encontraron en las plantas de *Opuntia* cultivadas: el OV2 y el OpVH (Cuadro 1).

Cuadro 1. Oligonucleótidos para los ensayos de RT-PCR diseñados a partir de las secuencias virales obtenidas por la RNA-seq.

| Nombre | Forward/ Reverse | Secuencia de 5'-3' | Posición | Virus |
|--------------|---------------------|----------------------------------|-----------|----------|
| VP2876s | Forward | CACACTCGAGTGCCCTGATGCCACTTAC | 5702-5729 | CVX |
| VP2878As | Reverse | CACAGTCGACAAAACAGAAGGCTAGGCTTA | 6586-6559 | CVX/ZyVX |
| VP2879s | Forward | CACACTCGAGCCTAACTGTGTCTTGGTG | 5703-5730 | ZyVX |
| VP2882s | Forward | CACACCTCGAGGATAAAGGCTGCTTGATACAG | 5732-5763 | OpVX |
| VP2883s | Reverse | CACAGTCGACAAAACAGAAAGCTAGCCA | 6639-6610 | OpVX |
| VP2884s | Forward | CACACTCGAGTGCCCTGATGCCACTTAC | 6569-6587 | OpVH |
| VP2885As | Reverse | CACAGTCGACAAAACAAATTATTTTTATAG | 8381-8362 | OpVH |
| Tobamo_2nopF | Forward | CATTCCAAAGGCTGCCAACC | 5488-5507 | OpV2 |
| Tobamo_2nopR | Reverse | ACAGAGCGTAAACCAGACGG | 6383-6364 | OpV2 |

Los productos se separaron en electroforesis en gel de agarosa al 1% por 30 min a 100 V, se cortaron y limpiaron con el kit Wizard Promega para su posterior secuenciación directa y comparación mediante BLAST con secuencias similares, disponibles en la base de datos del GenBank.

Transcriptómica (RNA-Seq) y análisis bioinformático

Debido a los resultados favorables para la identificación de virus desconocidos y conocidos en muestras de plantas, obtenidos en otros trabajos a partir de la secuenciación masiva por Transcriptómica (RNA-seq), en esta investigación se realizó la secuenciación masiva de ARN total extraído de plantas de *O. pilifera*, *O. depressa*, *O. robusta* y *O. Tomentosa*. Esto con el propósito de obtener genomas completos de los posibles virus de ARN presentes. Por tal motivo, se extrajo ARN total mediante el kit de TRIzol (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Estas muestras se enviaron a la Unidad de Secuenciación Masiva del Instituto de Biotecnología de la UNAM, campus Cuernavaca, para realizar el análisis transcriptómico, por extremos pareados, a partir de este se obtuvo una biblioteca de 250 pb. A su vez, la calidad de las lecturas se evaluó con el software FASQTC.

Todos los análisis bioinformáticos se realizaron en el *cluster* Teopanzolco del IBT de la UNAM. Se realizaron mapeos a referencia usando los genomas virales del OpVX, SchVX, RCNaV, OV2 y el OpVH por medio del software Geneious 9 (Kearse et al. 2012). Adicionalmente, se realizó un ensamble *de novo* con el software Trinity (Hass et al. 2013) para obtener *contigs* más grandes que fueron comparados con la información de la base de datos de GenBank mediante BLASTX (Altschul *et al.* 1990; 1997) para la identificación de los virus desconocidos.

RESULTADOS

Diagnóstico de virus por ensayos de RT-PCR y la secuenciación de fragmentos del genoma viral

A partir de los ensayos de RT-PCR, se obtuvieron productos de tamaño esperado (580 y 720 pb) para potexvirus en muestras de *O. pilífera* y *O. depressa* (Figura suplementaria 10 A y B); sin embargo, la secuenciación de esos productos mostró que fueron amplificados inespecíficos. En el caso de tobamovirus, se obtuvieron productos del tamaño esperado (480 pb) en muestras de *O. pilífera* y de *O. depressa* (Figura suplementaria 10 C) y las secuencias mostraron porcentajes de similitud de 70 a 78% con la secuencia de RdRp del TMV.

Por otro lado, los ensayos de RT-PCR en los cuales se utilizaron los oligonucleótidos específicos para CP de SchVX, OpVX, ZyVX, CVX y OpVH, resultaron negativos en las cuatro especies analizadas. Cabe señalar al respecto que, en al menos una

muestra de las cuatro especies de *Opuntia* silvestres colectadas, se obtuvieron productos en el tamaño esperado para OV2 (890 pb) (Figura 9).

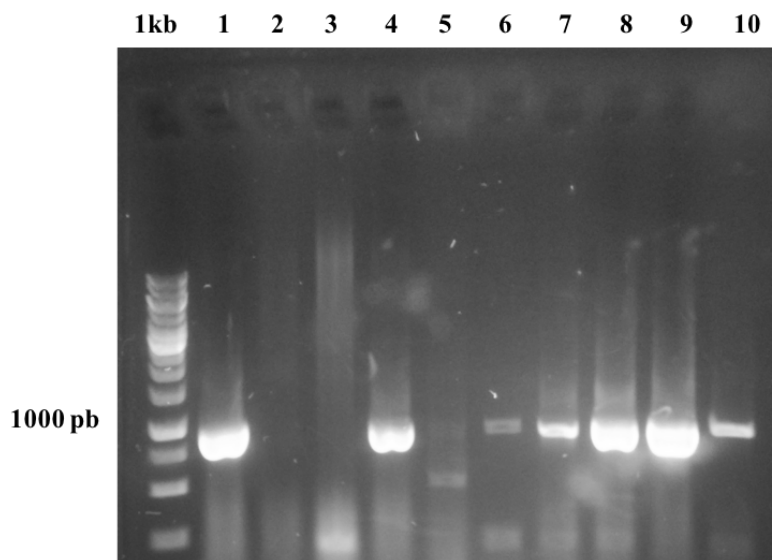


Fig. 9. Ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos que flanquean el gen de la CP para *Opuntia virus 2*: Carril 1. *O. robusta* M1; Carril 2. *O. robusta* M2; Carril 3. *O. tomentosa* M1; Carril 4. *O. tomentosa* M2; Carril 5. *O. pilifera* M1; Carril 6. *O. pilifera* M2; Carril 7. *O. pilifera* M3; Carril 8. *O. depressa* M1; Carril 9. *O. depressa* M2; Carril 10. *O. ficus-indica* (+). Se observan productos de tamaño esperado de 890 pb.

Para el RCNaV se obtuvieron productos esperados únicamente en las muestras de *O. robusta* y *O. tomentosa* (Figura 10), la secuenciación directa de los amplicones para OV2 y RCNaV confirmó la presencia de estos virus en las muestras positivas.

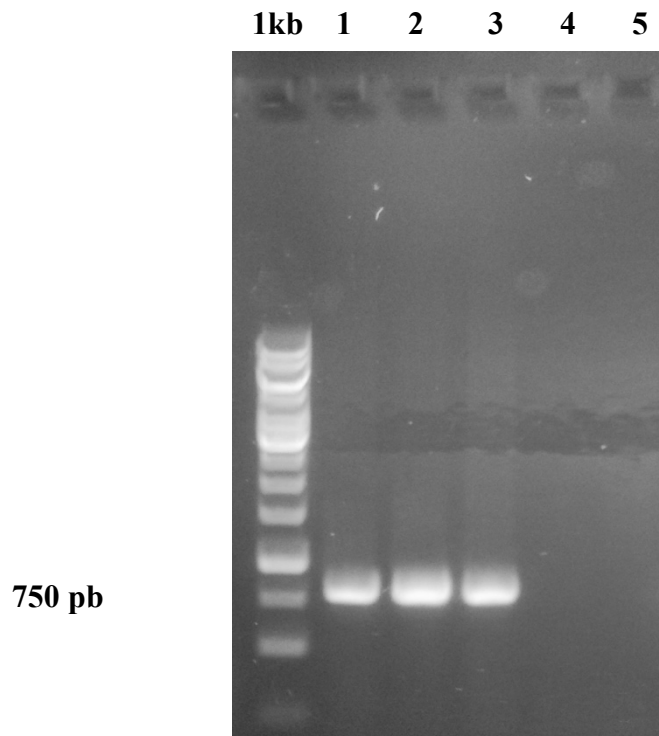


Fig. 10. Ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos que flanquean el gen de la CP para RCNaV: Carril 1. *O. ficus-indica* (+); Carril 2. *O. robusta*; Carril 3. *O. tomentosa*; Carril 4. *O. pilifera* y Carril 5. *O. depressa*. Se observan productos del tamaño esperado de 890 pb.

Transcriptómica (RNA-Seq) y análisis bioinformático

A partir de los datos de secuenciación masiva de ARN (RNA-seq), se identificó un *contig* en *O. pilifera* (9 821reads mapeadas), y otro en *O. depressa* (16 226 reads mapeadas), los cuales mostraron 88% de similitud entre ellos dos y 30% con *Maize Iranian Mosaic Nucleorhabdovirus*, Fam: Rhabdoviridae, al comparar la secuencia de nucleótidos de su genoma completo. Se construyó una secuencia consenso de ambos *contigs* y se obtuvo una secuencia de 13,101 pb, donde se identificaron seis ORFs (N: nucleocápside, P: fosfoproteína, Proteína 3, M: proteína de matrix, G: glicoproteína y L: RdRp) (Figura 11).

Tomando como referencia la secuencia del nucleorhabdovirus identificado por RNA-seq, se diseñaron y probaron un juego de oligonucleótidos: Nucleorhabs_716-CPF: 5'-AGC CGG AAC ACA TCA CAC TT-3' y NucleorhabAs_1293-CPR: 5'-TTC ATC

TCC ATT GGT AGC GC-3' que flanquean una región de la proteína N y rinden un amplicón de 500 pb. Con el uso de estos *primers* en ensayos de RT-PCR, se obtuvieron amplicones en el tamaño esperado únicamente en las muestras de las especies *O. pilifera* y *O. depressa*; la secuencia de estos amplicones mostraron porcentajes de similitud de 95-97% con los *contig* obtenidos por RNA-seq. Seis muestras fueron positivas para Nucleorhabdovirus por RT-PCR, tres de *O. pilifera* y tres de *O. depressa* (Figura 12).

Respecto a las especies silvestres recolectadas en la Reserva del Pedregal de San Ángel, no se obtuvieron secuencias de origen viral.

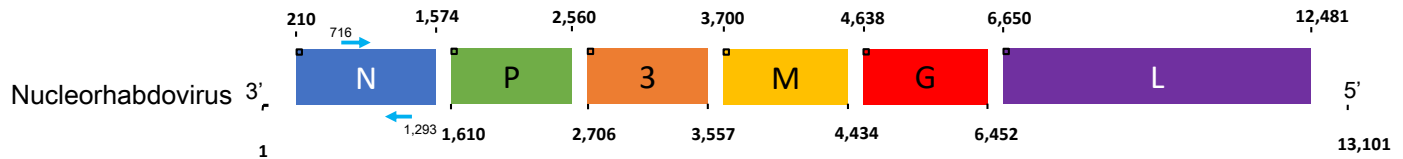


Fig. 11. Esquema del genoma de ARN de polaridad negativa del *nucleorhabdovirus* identificado en *O. pilifera* y *O. depressa* por RNA-seq. Se señalan los nucleótidos de inicio y término para ORF. Las flechas azules indican los sitios donde alinean los oligonucleótidos Nucleorhabs_716-CPF y NucleorhabAs_1293-CPR diseñados para el diagnóstico por RT-PCR.

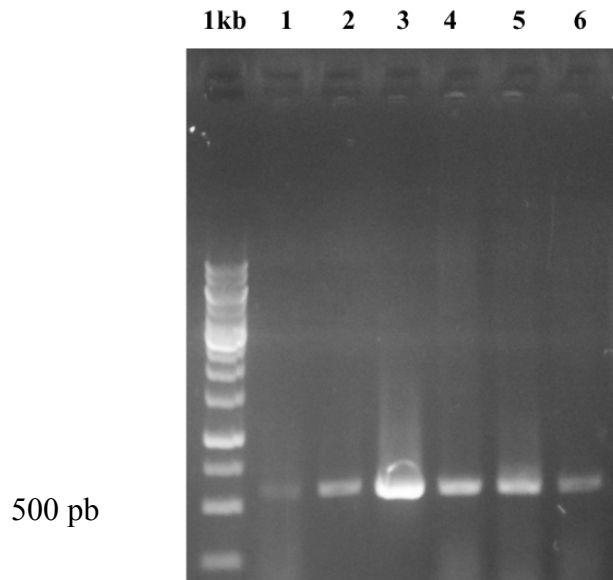


Fig. 12. Ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos que flanquean el gen CP para *nucleorhabdovirus*: Carril 1. *O. pilifera* M1; Carril 2. *O. pilifera* M2; Carril 3. *O. pilifera* M3; Carril 4. *O. depressa* M1; Carril 5. *O. depressa* M2; Carril 6. *O. depressa* M3. Se observan amplicones del tamaño esperado de 500 pb.

DISCUSIÓN

En este trabajo se identificaron los tobamovirus *Opuntia virus 2* y al *Rattail cactus necrosis-associated virus* asociados a síntomas de manchas anulares cloróticas en cuatro especies silvestres de nopales, además de un probable nucleorhabdovirus no identificado anteriormente.

Los tobamovirus de cactus presentan una amplia distribución ya que afectan diversas especies dentro de la familia Cactaceae: *Aporocactus*, *Gymnocalycium*, *Notocactus* y *Opuntia* (Kim et al. 2012; Min et al. 2009; Park et al. 2018; De La Torre et al. 2016b).

En la presente investigación, se observaron al menos cuatro especies de *Opuntia* silvestres infectadas con al menos un virus, el OV2 o el RCNaV. Algo que se debe destacar es la presencia del OV2 en las cuatro especies de *Opuntia* silvestres y en dos especies de *Opuntia* cultivadas (*O. ficus-indica* y *O. albicarpa*), lo cual demuestra su amplia distribución; incluso este virus se ha encontrado en otra especie de la familia Cactaceae *Neobuxbaumia tetetzo*, colectada en Zapotitlán de las Salinas, Puebla (datos no mostrados).

Todas las plantas pertenecientes a la familia Cactaceae son endémicas del continente americano por lo que los cactus que se encuentran tanto en el continente europeo como en el asiático, son ejemplares que fueron llevados desde América hasta otros jardines botánicos o jardines privados. Considerando esta información, es probable que el CMMoV y el RCNaV aislados por primera vez de cactus de Corea del sur (Min et al. 2006; Park et al. 2018), también se encuentren infectando a plantas del continente americano pertenecientes a las mismas especies donde se aislaron y a otras especies de esta familia botánica. Ejemplo de esto puede ser lo que ha sucedido con el RCNaV, que ya ha sido diagnosticado en este trabajo en plantas del estado de Puebla (*O. pilífera* y *O. depressa*) y

en plantas del Estado de México (*O. albicarpa*) (De La Torre et al. 2016b). Sin embargo, el CMMoV no se ha identificado en plantas de nopal hasta el momento.

Así mismo, estos resultados respaldan la hipótesis de la co-divergencia y co-evolución entre los tobamovirus y sus plantas huésped como lo plantearon Gibbs et al., en 2015.

Por otro lado, los nucleorhabdovirus poseen un genoma de ARN en sentido negativo de 12 000 a 15 000 nucleótidos de longitud y sus ORFs están separados por regiones intergénicas conservadas; estos virus se han identificado en diversas plantas por medio de secuenciación masiva (Wu et al. 2018 y Gaafar et al. 2019). En el caso del nucleorhabdovirus de nopal que se identificó en este trabajo, se observaron los nucleótidos 5'-GUUGGGUUUUUAUUAU-3' correspondientes a las regiones intergénicas conservadas que señalan los sitios de poliadenilación e inicio de la transcripción de los mensajeros como lo han reportado en otros nucleorhabdovirus (Dietzgen et al. 2015 y Gaafar et al. 2019).

Con base en los criterios de demarcación de especies del ICTV (Adams et al. 2018) para el género *Nucleorhabdovirus*; el porcentaje de similitud menor a 40% en genoma completo entre el nucleorhabdovirus de nopal con los otros nucleorhabdovirus disponibles en GenBank y a que es la primera y única vez hasta el momento que se ha identificado un nucleorhabdovirus en cactus, se propone que este virus sea considerado una nueva especie para el género *Nucleorhabdovirus*.

Por medio de RT-PCR únicamente se detectó el nucleorhabdovirus de nopal en los nopales colectados en Zapotitlán Puebla (figura), esto podría indicar que este virus está restringido a esta región. La RNA-seq ha sido empleada con éxito como herramienta para la

identificación de virus en plantas cultivadas de nopal (Salgado 2016), sin embargo en el caso de las plantas silvestres, se pudo observar que esta técnica únicamente permitió la identificación de un nuevo nucleorhabdovirus en las plantas del estado de Puebla.

Por otro lado, los resultados negativos para la identificación de genomas virales por medio de la RNA-seq podrían deberse a el sesgo que representa el secuenciar únicamente los ARNs con PolyA, debido al paso de separación de ARNs mensajeros del resto de ARN del cual un 90% es ARN ribosomal, tal es el caso de los tobamovirus que no tienen una PolyA en su extremo 3' terminal. Además, es recomendable utilizar otro método de secuenciación masiva, por ejemplo agregando un paso inicial de enriquecimiento de partículas virales o secuenciación de ARN total (Roossinck 2012 y Roossinck et al. 2015).

En nopales cultivados (*O. ficus-indica* y *O. albicarpa*), se identificaron seis virus: dos potex (SchVX y OpVX); dos tobamos (RCNaV y OV2) y un carlavirus (OpVH) (Salgado 2016), mientras que las cuatro especies de nopales silvestres (*O. pilifera*, *O. depressa*, *O. tomentosa* y *O. robusta*), fueron infectadas únicamente por tobamovirus (RCNaV y OV2) y en el caso de *O. pilifera* y *O. depressa*, además por un nucleorhabdovirus que no había sido identificado. Estas diferencias en la diversidad de virus presentes en plantas silvestres y cultivadas de nopales, podría sustentar la hipótesis del efecto dilución, la cual enuncia que “a mayor diversidad, menor riesgo de infección”, lo que explicaría que una mayor diversidad genética y una disminución en el manejo humano se traduce en un menor riesgo de infección (Pagán et al. 2012). Las especies de nopales cultivados han pasado por un largo proceso de domesticación para la obtención de tunas más dulces y jugosas y cladodios tiernos sin espinas. El cultivo por esqueje de esta planta disminuye la variabilidad genética, lo cual podría favorecer las infecciones mixtas de virus

como se ha observado en las plantas de nopal verdura y tunero. Es muy evidente la menor diversidad de virus en plantas de nopales silvestres en comparación con los cultivados, por lo que se puede sugerir que el manejo humano es una determinante en la relación entre virus-planta. Este fenómeno se ha observado en la especie de chile comúnmente conocido como chiltepín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) y su relación con los begomovirus que lo infectan (Pagán et al. 2012 y Rodelo et al. 2013).

Retomando el caso en plantas del género *Notocactus* (Cactaceae), donde se identificaron seis virus: cuatro potex y dos tobamos (Park et al. 2018). Este género de cactus originario de Sudamérica, ha sido cultivado en el país asiático antes mencionado para uso interés ornamental en este país asiático. Lo cual podría estar asociado a la infección en mezcla de los seis virus al igual que ocurre en las especies cultivadas de *Opuntia*. Sería interesante que se realizaran más trabajos de incidencia de virus en plantas silvestres *Notocactus* para poder establecer otras comparaciones.

CONCLUSIONES GENERALES

Derivado de los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que:

- Los virus *Opuntia virus 2* y el *Opuntia virus H* aislados de una planta de *O. ficus-indica* son nuevos miembros para los géneros tobamovirus y carlavirus respectivamente.
- Se obtuvo una clona infecciosa del *Opuntia virus 2*, la cual confirmó la naturaleza infecciosa del virus al producir arrugamiento sistémico en plantas de *N. benthamiana*.

- *Opuntia virus 2* presentó mayor incidencia al estar presente en especies de nopal cultivadas y silvestres analizadas; además el *nucleorhabdovirus* reportado pertenece a una nueva especie.
- Al comparar la diversidad entre plantas silvestres y cultivadas, en estas últimas se observó una mayor diversidad de virus, indicando que la domesticación de las plantas de nopal conlleva a una mayor susceptibilidad a la infección por virus.

APLICACIONES Y PERSPECTIVAS GENERALES

Respecto a la clona infecciosa del OV2, quedan pendientes más trabajos de transmisión mecánica a distintas plantas hospedadoras y en plantas de nopales sanos para observar los síntomas que podrían producirse, evitando la problemática surgida de utilizar savia de plantas de nopal con infecciones en mezcla de distintos grupos de virus.

Ya que para amplificar completo al OpVH, se tuvo que clonar en tres fragmentos, es importante diseñar experimentos a futuro para obtener una clona infecciosa de este virus y lograr una caracterización biológica del mismo.

Es necesario realizar más experimentos para evaluar la incidencia del OV2 y el RCNaV en distintas plantas de nopales a lo largo de México, lo cual sin lugar a dudas representaría un mejor panorama sobre la relación entre el virus y la planta hospedera.

En el caso del nucleorhabdovirus aislado de nopal, aunque es probable que infecte otras especies de cactáceas en la región de Zapotitlán en Puebla, es necesario realizar más

experimentos por medio de ensayos de RT-PCR con los oligonucleótidos que se diseñaron en este trabajo.

Otro punto a considerar es evaluar en futuros trabajos la carga viral en plantas cultivadas y silvestres para determinar si hay diferencias que pudieran representar un problema al detectar concentraciones bajas de ARN viral.

LITERATURA CITADA

- Adams, I. P., R. H. Glover, W. A. Monr, R. Mumford, E. Jackeviciene, M. Navalinskiene, M. Samuitiene, N. Boonham. 2009a. Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Molecular Plant Pathology* 10(4):537-545.
- Adams, M. J., Adkins, S., Blagard, C. et al. 2009b. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 9th Report on the taxonomy of the Betaflexiviridae available at https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/241/betaflexiviridae. Accessed 5 february 2020.
- Adams, M. J., Adkins, S., Blagard, C. et al. 2018. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Report on the taxonomy of the Virgaviridae. <http://www.ictv.global/report/virgaviridae>. Accessed 27 May 2020.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. y Ruiz, M. R. 2007. Ocurrencia de un tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia*, 41(7), 763-773.
- De La Torre, A. R., Salgado, O. H.; Salazar, S. M., Pallás, V.; Sánchez, N. J. A. y Valverde, R. A. 2016 (a). First Report of *Schlumbergera virus X* in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico. *Plant Disease* 100 (8): 1799.
- De La Torre, A. R.; Salgado, O. H.; Salazar, S. M.; Pallás, V.; Sánchez, N. J. A. y Valverde, R. A. 2016 (b). First Report of Rattail cactus necrosis-associated virus in Prickly Pear Fruit (*Opuntia albicarpa* Scheinvar) in Mexico. *Plant Disease* 100 (11): 2339.
- Dietzgen, R. G., Innes, D. J., Bejerman, N. 2015. Complete genome sequence and intracellular protein localization of *Datura* yellow vein nucleorhabdovirus. *Virus Research* 205: 7-11.

- Dovas, C. I., Efthimiou, K., Katis, N. I. 2004. Generic detection and differentiation of tobamovirus 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.
- Gaafar, Y. Z. A., Richert-Pöggeler, K. R., Maaß, C., Vetten, H. J., Ziebell, H. 2019. Characterisation of a novel nucleorhabdovirus infecting alfalfa (*Medicago sativa*). *Virology Journal* 16:55.
- 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>”
- Gibbs, A. J., Wood, J., Garcia, A. F., Ohshima, K., Armstrong, J. S. 2015. Tobamoviruses have probably co-diverged with their eudicotyledonous hosts for at least 110 million years. *Virus Evol* 1(1):vev019.
- Giri, L. y Chessin, M. 1975. A severe strain of *Tobacco mosaic virus* from cactus. *Phytopathology* 65: 824-825.
- 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.
- Hunt, D. 2016. CITES Cactaceae checklist. 3a edición. Royal Botanic Gardens Kew and International Organization for Succulent Plant Study.
- 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/agropecuaria/2007/agricola/nopal_df/CulnopDF.pdf.
- 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.
- 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 *Aporocactus flagelliformis*. Archives of Virology 157 (1): 185-187.
- Junqueira, B. R. T., Nicolini, C., Lucindab, N., Orílio, A. F., Nagata, T. 2013. A simplified approach to construct infectious cDNA clones of a tobamovirus in a binary vector. Journal of Virological Methods 198: 32–36.
- 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.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C y Tamura K. 2018. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
- Li, W.; Jaroszewski, L. y Godzik, A. 2001. Clustering of highly homologous sequences to reduce the size of large protein database Bioinformatics 17:282-283.
- 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.
- Liu, J., Zhang, L., Xu, F., Chai, M., Wu, X., Kim, U., Lv, D., Wu, X., Wu, X., Cheng, X. 2019. Molecular analysis of a divergent isolate of Potato virus H from potato reveals novel evolutionary feature of Carlaviruses. Can J Plant Pathol. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1625947>. Accessed 6 February 2020.
- 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.
- Maliarenko, V. M. y Mudrak, T. P. 2013. Cactus viruses in fasciated plants. *Biologija* 59 (2): 213-218.
- 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.
- Morishima, N., Ido, T., Hamada, H., Yoshimoto, E., Mizumoto, H., Takeuchi, S., Kiba, A., Hikichi, Y. y Okuno, T. 2003. Infectious in vitro transcripts from a cDNA clone of Tobacco mild green mosaic tobamovirus and its biological activity in host and nonhost plants and in their protoplasts. *Gen Plant Pathol* 69:335–338.
- Pagán, I., Gonzalez, J. P., Moreno, L. A., Rodelo, U. M., Fraile, A., Piñero, D., Garcia-Arenal, F. 2012. Effect of Biodiversity Changes in Disease Risk: Exploring Disease Emergence in a Plant-Virus System *PLoS Pathog* 8(7).
- Park, C. H., Song, E. G., and Ryu, K. H. 2018. Detection of co-infection of *Notocactus leninghausii* f. *cristatus* with six virus species in South Korea. *Plant Pathol.* 34: 65-70.

- Pasin, F., Menzel, W. y Darós, J. A. 2019. Harnessed viruses in the age of metagenomics and synthetic biology: an update on infectious clone assembly and biotechnologies of plant viruses. *Plant Biotechnology Journal*. 17:1010–1026.
- Peng, L., Grinstead, S., Kinard, G., Wu, L. P., Li, R. 2019. Molecular characterization and detection of two carlaviruses infecting cactus. *Arch Virol* 164: 1873-1876.
- Pirone, T.P. y Blanc, S. 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 34: 227-247.
- Reyes-Agüero, J.A., J.R. Aguirre, F. Castelán y A. González. 2009. Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de *Opuntia* en la altiplanicie meridional de México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, CONACYT, México D.F.
- Rodelo, U. M., Pagán, I., González, J. P., Betancourt, M., Moreno, L. A., Ayllón, M. A., Fraile, A., Piñero, D., García-Arenal, F. 2013. Landscape heterogeneity shapes host-parasite interactions and results in apparent plant–virus codivergence. *Molecular Ecology* 22: 2325–2340.
- Roossinck, M. J. 2012. Plant Virus Metagenomics: Biodiversity and Ecology. *Annu Rev Genet* 46:359-69.
- Roossinck, M. J., D. P. Martin, P. Roumagnac. 2015. Plant Virus Metagenomics: Advances in Virus Discovery. *Phytopathology* 105(6):716-727.
- Salgado, O. H. 2016. Caracterización molecular de virus asociados a manchas anulares en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) en México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 71 pags.

- Salgado, O. H., De La Torre, A. R., Sánchez, N. J. Á., Pallás, V. 2020. Identification and genomic characterization of a novel tobamovirus from prickly pear cactus. *Arch Virol* 165, 781–784.
- 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.
- Scheinvar L. 2004. Flora Cactológica del Estado de Querétaro. Diversidad y Riqueza. Fondo de Cultura Económica, México. 390 pags.
- Scheinvar, L., Olalde, G. y D. Sule. 2011. Especies silvestres de nopales mexicanos. Universidad Nacional. Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. GE005. México D.F
- 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.asp>
- x
- Song, Y. S., Min, B. E., Hong, J. S., Rhie, M. J., Kim, M. J., Ryu, K. H. 2006. Molecular evidence supporting the confirmation of Maracuja mosaic virus as a species of the genus Tobamovirus and production of an infectious cDNA transcript. *Arch Virol* 151:2337–2348.

- 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.
- 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.
- Van der Vlugt, R. A. A. y Berendesen M. 2002. Development of a general potyvirus detection method. *Journal of Plant Pathology* 108: 367-371.
- Wu, L. P., Yang, T., Liu, H. W., Postman, J., Li, R. 2018. Molecular characterization of a novel rhabdovirus infecting blackcurrant identified by high-throughput sequencing. *Archives of Virology* 163:1363–1366.
- 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.

ANEXOS



Identification and genomic characterization of a novel tobamovirus from prickly pear cactus

Héctor Salgado-Ortíz¹ · Rodolfo De La Torre-Almaraz¹ · Jesús Ángel Sánchez-Navarro² · Vicente Pallás²

Received: 16 November 2019 / Accepted: 16 December 2019 / Published online: 24 January 2020
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2020

Abstract

In this work, we describe the complete sequence and genome organization of a novel tobamovirus detected in a prickly pear plant (*Opuntia* sp.) by high-throughput sequencing, tentatively named “opuntia virus 2”. The full genome of opuntia virus 2 is 6,453 nucleotides in length and contains four open reading frames (ORFs) coding for the two subunits of the RNA polymerase, the movement protein, and the coat protein, respectively. Phylogenetic analysis using the complete nucleotide sequence revealed that the virus belongs to the genus *Tobamovirus* (family *Virgaviridae*), showing the highest nucleotide sequence identity (49.8%) with cactus mild mottle virus (CMMoV), being indicating that it belongs in the Cactaceae sub-group of tobamoviruses.

Prickly pear (*Opuntia* sp.) is an important crop in Mexican culture and gastronomy [1]. The main viruses affecting this crop are the potexviruses opuntia virus X and schlumbergera virus X and the tobamovirus rattail cactus necrosis-associated virus, which are associated with chlorotic ring spots [2–4]. In cacti, two tobamoviruses have been identified to date: cactus mild mottle virus (CMMoV), isolated from *Gymnocalycium mihanovichii* [5], and rattail cactus necrosis-associated virus (RCNaV), isolated from *Aporocactus flagelliformis* [6]. Tobamoviruses are economically important in agriculture, affecting plants belonging to the families Solanaceae and Cucurbitaceae [7, 8]. In 2017, prickly pear fruit and vegetable crops (*O. albicarpa* and *O. ficus-indica*) showing chlorotic annular spots (Fig. 1a) and

located on farms in the municipality of Otumba, state of Mexico, were subjected to high-throughput sequencing. To do that, total messenger RNA extracted from a mixed sample of symptomatic cladodes of the two species (*O. albicarpa* and *O. ficus-indica*) were sequenced, yielding approximately 30 million sequences of 75 bp each. All sequences were filtered and trimmed using Geneious 9.0 software (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand), and *de novo* assembly was performed using Trinity software, which uses Bruijn graphs [9]. Contigs were analyzed using BLASTx [10], and the identified ORFs were aligned using Geneious 9.0. A contig of 6456 nt from the mixed sample of prickly pear plants was identified, and it showed the highest percentage of sequence identity to CMMoV and RCNaV (49.8%) (Supplementary Table 1). The 5' and 3' termini of the new virus were determined by RACE analysis (Roche Diagnostics, Mannheim Germany) using specific primers (VP3374AsTobamo-5' and VP3373sTobamo-3'; Supplementary Table 2) designed from the combined RNA-seq sequence and total RNA extracted from a symptomatic *O. ficus-indica* plant collected from a farm in Otumba, state of Mexico. In the next step, the full genome of the new virus was amplified by RT-PCR using SuperScript III One-Step High Fidelity (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) system, total RNA extracted from the same sample used in RACE analysis, and the primers VP3379sTobamo_genome and VP3380sTobamo_genome (Supplementary Table 2), targeting the 5' and 3' end, respectively. An amplicon of 6.5 kb was obtained and cloned using a CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo

Handling Editor: Ralf Georg Dietzgen.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00705-020-04528-3>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Héctor Salgado-Ortíz
bio.h.salgado@gmail.com

¹ Unidad de Biotecnología y Prototipos, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, 54074 Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

² Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas, Universidad Politécnica de Valencia-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Ciudad Politécnica de la Innovación Ingeniero Fausto Elio, s/n, 46022 Valencia, Spain

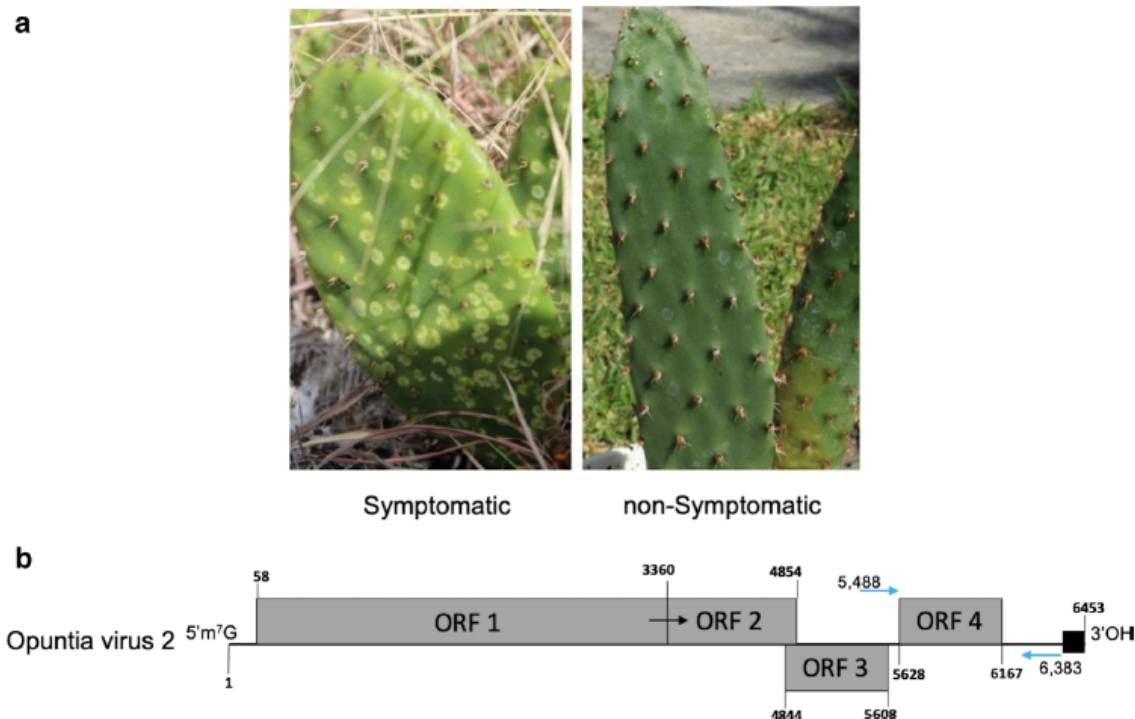


Fig. 1 a. *O. albicarpa* plants showing chlorotic annular spots (left) and plants showing no symptoms (right), **b.** Genomic organization of opuntia virus 2 isolated from nopal verdura. Numbers indicate the initial and last nucleotide of each ORF and the complete genome. The tRNA structure at 3' end is represented by a dark square. The black

arrow indicates the site of the readthrough leaky termination codon of the 128-kDa protein. The blue arrows indicate the location of the binding sites for the Tobamo_2nopF and Tobamo_2nopR primers used in the diagnostic RT-PCR assay

Fisher Scientific, Carlsbad, USA), and the sequence of an individual colony was determined using specific primers (Supplementary Table 2). The complete genome sequence of the selected individual clone has 6543 nt long (accession number MF434821) and showed 98.4% nucleotide sequence identity to the combined RNA-seq sequence. The complete genome of the new virus, which we tentatively named 'opuntia virus 2' (OV2), has the typical genomic organization of other members of the genus *Tobamovirus*: the 5' and 3' non-coding regions of 57 nt and 286 nt, respectively; two 5'-proximal ORFs (ORF 1 and ORF 2) of 3303 nt and 4797 nt coding for the two subunits of the RNA polymerase of 128 kDa and 187 kDa, respectively; an ORF 3 of 765 nt coding for the movement protein (MP) of 27.8 kDa; and, finally, the 3' proximal ORF 4 of 540 nt coding for the capsid protein (CP) of 19.2 kDa (Fig. 1b). Phylogenetic analysis of the complete genome sequence was performed using MEGA 7 [11], and a neighbor-joining tree was constructed using the Jukes-Cantor substitution model and 1500 bootstrap pseudoreplicates. A dendrogram was obtained by aligning the complete genome sequence of OV2 and tobamoviruses of 34 species (39 sequences) available in the GenBank database. Members of other genera of the family *Virgaviridae* were included as an outgroup. The genus *Tobamovirus* has

been historically divided into three subgroups based on natural host range, genomic organization and phylogenetic clustering. Based on the families of plants that are infected by tobamoviruses, these viruses have been divided into five (Brassicaceae, Cactaceae, Cucurbitaceae, Malvaceae, and Solanaceae/Orchidaceae) [5], or six subgroups (the previous five plus members infecting members of the family Passifloraceae) [12]. The phylogenetic tree included OV2 in the Cactaceae subgroup, and it was found to be closely related to other viruses isolated from cacti (CMMoV and RCNaV), with a bootstrap value of 100% (Fig. 2). Recently, Gibbs et al. [13] showed that, with the exception of three of the 29 species, all tobamoviruses fall into three clusters that have either asteroid or rosoid or caryophyllid hosts (i.e., the major subdivisions of eudicotyledonous plants). OV2 clustered in the caryophyllid group, as expected (Fig. 2), reinforcing the hypothesis that tobamoviruses and their hosts have probably co-diverged [13].

The prevalence of OV2 in cultivars of prickly pear plants and other wild species of *Opuntia*, collected from Puebla and Mexico City, was analyzed by RT-PCR (Superscript III One-step, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA) using specific primers (Tobamo_2nopF and Tobamo_2nopR) targeting a conserved region of the capsid protein gene. Total

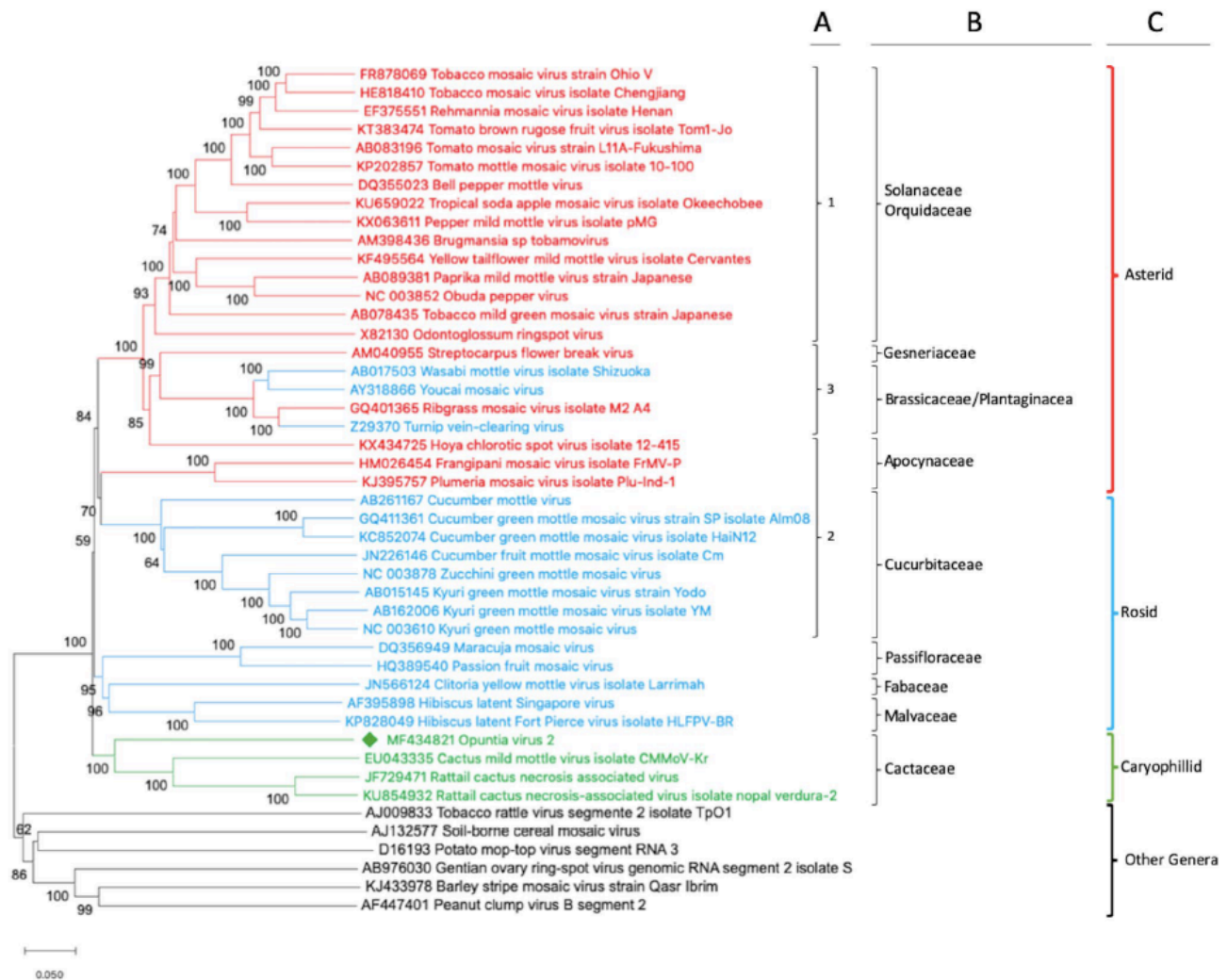


Fig. 2 Phylogenetic analysis of members of the genus *Tobamovirus* using the complete nucleotide sequences of members of 34 species available in the GenBank database plus the new virus, opuntia virus 2, identified in prickly pear cactus (MF434821), which is indicated by a diamond (◆). Tobamovirus clustering based on the phylogenetic relationships of the original host is conserved with respect to different classification approaches: A. Historical classification based on natural host range, genomic organization, and site of assembly origin. B.

Classification in host families according to Song et al. 2006 [12]. C. Division on three groups of eudicotyledonous host plant lineages – asterids, rosids, and caryophyllids – according to Gibbs et al. 2015 [13]. Numbers indicate the bootstrap percentage value (1500 pseudoreplicates) for each node. Branches with bootstrap values less than 50% were collapsed. ‘Other genera’ refers to members of other genera in the family *Virgaviridae*. The scale bar shows the number of substitutions per site

RNA extracted from germinated *O. albicarpa* plants was used as a negative control. For the analysis, we selected 20 symptomatic wild (*O. pilifera*: 3 plants; *O. depressa*: 2 plants; *O. tomentosa*: 2 plants; *O. robusta*: 2 plants; *O. streptacantha*: 1 plant) and commercial (*O. albicarpa*: 7 plants; *O. ficus-indica*: 3 plants) plants. The expected amplicon of 890 nt (extending from the CP gene to the 3’ end) was obtained in all of the samples analyzed, indicating an association of symptoms with OV2 infection. No amplification was observed in the negative control. To confirm the presence of the new virus, the amplicons obtained from *O. streptacantha*, *O. pilifera*, *O. depressa*, *O. robusta* and *O. ficus-indica*

samples were extracted from a gel, using a Wizard DNA Clean-up System (Promega, Madison, USA) and sequenced directly. All amplicons corresponded to OV2, with identity values ranging from 94.2% to 96.6%.

Based on the results presented here, we propose that opuntia virus 2 should be placed in the genus *Tobamovirus*, family *Virgaviridae*. Based on species demarcation criteria proposed by the International Committee of Taxonomy of Virus [14], opuntia virus 2 should be considered a member of a new species in the genus *Tobamovirus* due to the low level of sequence identity (less than 90%) of the complete genome to those of other tobamoviruses. Further work is

needed to evaluate more precisely the frequency of OV2 infection in other prickly pear plants grown in commercial plots or wild *Opuntia* species throughout the country, where the specific primers described here could be a useful tool.

Acknowledgements The first author would like to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the Grant (number 446131) that supported his Doctoral scholarship, and Posgrado de Ciencias Biológicas of Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We thank the Instituto de Biología-UNAM for giving us access to their computer cluster.

Funding This study was funded by project no. IN216317 of UNAM-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) and by Grant BIO2017-88321-R from the Spanish Agencia Estatal de Investigación (AEI) and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval This article does not contain any studies performed on human participants or animals by any of the authors.

References

1. Sánchez LDL, López GC, Ávalos HI (2013) Nomenclatura vernácula, uso y manejo de *Opuntia* spp. en Santiago Bayacora, Durango, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19:367–380
2. Alonso BB, Mora AG, Valdovinos PG, Ochoa MDL, Rodríguez LE, De La Torre AR (2015) Asociación de un Potexvirus como agente causal de manchas cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. *Rev Mex Fitopatol* 33:75–86
3. De La Torre AR, Salgado OH, Salazar SM, Pallás V, Sánchez NJA, Valverde RA (2016) First report of Schlumbergera virus X in prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico. *Plant Dis* 100(8):1799
4. De La Torre AR, Salgado OH, Salazar SM, Pallás V, Sánchez NJA, Valverde RA (2016) First report of Rattail cactus necrosis-associated virus in prickly pear fruit (*Opuntia albicarpa* Scheinvar) in Mexico. *Plant Dis* 100(11):2339
5. Min BE, Chung BN, Kim MJ, Ha JH, Lee BY, Ryu KH (2006) Cactus mild mottle virus is a new cactus-infecting tobamovirus. *Arch Virol* 151(1):13–21
6. Kim NR, Hong JS, Song YS, Chung BN, Park JW, Ryu KH (2012) The complete genome sequence of a member of a new species of tobamovirus (rattail cactus necrosis-associated virus) isolated from *Aporocactus flagelliformis*. *Arch Virol* 157(1):185–187
7. Adams MJ, Antoniw JF, Kreuze J (2009) Virgaviridae: a new family of rod-shaped plant viruses. *Arch Virol* 154(12):1967–1972. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0506-6>
8. Lecoq H, Desbiez C (2012) Viruses of cucurbit crops in the Mediterranean region: an ever-changing picture. *Adv Virus Res* 84:67–126
9. Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Regev A (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-Seq: reference generation and analysis with Trinity. *Nat Protoc* 8(8):1–43
10. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389–3402
11. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol* 33(7):1870–1874
12. Song YS, Min BE, Hong JS, Rhie MJ, Kim MJ, Ryu KH (2006) Molecular evidence supporting the confirmation of Maracuja mosaic virus as a species of the genus Tobamovirus and production of an infectious cDNA transcript. *Arch Virol* 151:2337–2348
13. Gibbs AJ, Wood J, Garcia-Arenal F, Ohshima K, Armstrong JS (2015) Tobamoviruses have probably co-diverged with their eudicotyledonous hosts for at least 110 million years. *Virus Evol* 1(1):vev019
14. Adams MJ, Adkins S, Blagard C et al (2018) International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) Report on the taxonomy of the Virgaviridae. <http://www.ictv.global/report/virgaviridae>. Accessed 19 Oct 2018

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

MATERIAL SUPLEMENTARIO. CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS VIRUS OV2 Y OPVH EN PLANTAS DE NOPAL CULTIVADAS

Cuadro suplementario 1. Listado de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RACE, RT-PCR de genoma completo para el OV2 y para la construcción de la clona infectiva del OV2.

| Nombre | Forward/ Reverse | secuencia 5'-3' | Localización (accession MF434821) |
|--------------------------|---------------------|--|--------------------------------------|
| VP3374AsTobamo_5'end | Reverse | ACTTAGGACGGCGGTCTTGA | 180-199 |
| VP3373sTobamo_3'end | Forward | AGTTTCCTTATAACTGCACG | 6280-6299 |
| Tobamo_2nopF | Forward | CATTCCAAAGGCTGCCAACC | 5488-5507 |
| Tobamo_2nopR | Reverse | ACAGAGCGTAAACCAGACGG | 6383-6364 |
| VP3379sTobamo_genome | Forward | GTTTTTTATTACAAGAACAAGCACATTTTAC | 1-31 |
| VP3380AsTobamo_genome | Reverse | TGGGCCCTACCCGGGGTAA | 6453-6424 |
| VP33401sTobamo_sequence | Forward | TCACAGCCTTTATGACATC | 648-666 |
| VP33402sTobamo_sequence | Forward | CAGCTTACCTATGAGAGTG | 1288-1306 |
| VP33403sTobamo_sequence | Forward | GCCTTCTGCTTCAACTCCTA | 1929-1948 |
| VP33404sTobamo_sequence | Forward | AAGCTGTGAGTATGCTGCG | 2591-2609 |
| VP33406AsTobamo_sequence | Reverse | CCTAAGACGCAACGACCCTA | 3807-3788 |
| VP33407AsTobamo_sequence | Reverse | CCTGACCTGAACATCGTCA | 4503-4485 |
| VP3390AsTobamo_sequence | Reverse | GGCGAACAGTCTTGTACACAG | 5033-5013 |
| VP3353AsTobamo_sequence | Reverse | GCAAGCTGGGATCGCAACT | 5779-5761 |
| VP4000sTobamo_5'-T7 | Forward | <i>CTAATACGACTCACTATAGTATTTTATTACA-</i> <i>AGAACAAGCACATTTTAC</i> | 1-32 |
| VP3439AsTobamo | Reverse | TGGGCCCTSCCCGGGGTAAGGGT | 6430-6453 |

La secuencia del promotor T7 se indica en letras cursivas

Cuadro suplementario 2. Listado de oligonucleótidos utilizados en los ensayos de RACE y RT-PCR de genoma completo para el OpVH.

| Nombre | Forward/ Reverse | secuencia 5'-3' | Localización (accession KU854930) |
|--------------------------------|---------------------|---------------------------------|---|
| Carla_1126-final-genome | Forward | ACAGCCATAAAATTCATGG | 1126-1145 |
| VP2884sCarl_ | Forward | GTGCCCTGATGCCACTTAC | 6572-6590 |
| VP2885AsCarl | Reverse | AAAACAAATTTTTTATAG | 8365-8384 |
| VP3356AsCarla-185_5'end | Reverse | TGTAATTGAACCATGCGAAGT | 176-196 |
| VP3358AsCarl_6692-subTGB2 | Reverse | AGATGGTGCTGCAAAATCGCC | 6691-6710 |
| VP3419sCarla_1-complete genome | Forward | CGATAAACACTCCCGAAAATAATAGAATTTA | 1-31 |
| VP3440sCarl_414-sequence | Forward | GCAAGCTATTAATCGCTATGTCAG | 414-437 |
| VP3459sCarl_1778-genome | Forward | TGCGGCGCCCAATCTATTA | 1778-1796 |
| VP3461sCarla_4101-genome | Forward | CAAGTGCTACACGTTCCGGT | 4101-4119 |
| VP3462sCarla_4801-genome | Forward | TTCGCGCCATGCAATATG | 4801-4819 |
| VP3441AsCarl_3494-genome | Reverse | CACAGCCGAAAGTCCCTAGAAT | 3472-3493 |
| VP3442sCarl_3367-genome | Forward | TGTTTACTTGAGGGGATGACTG | 3367-3388 |
| VP3418sCarl_7158-genome | Forward | CAAGTGAGTCCGGACAGCG | 7158-7176 |
| VP3491sOpVH8191-3'end | Forward | GTGTGTTTCCACCTATTTGC | 8191-8210 |
| VP3492sOpVH8236-3'end | Forward | GTAGGCCTGGTATCAATGCG | 8236-8255 |

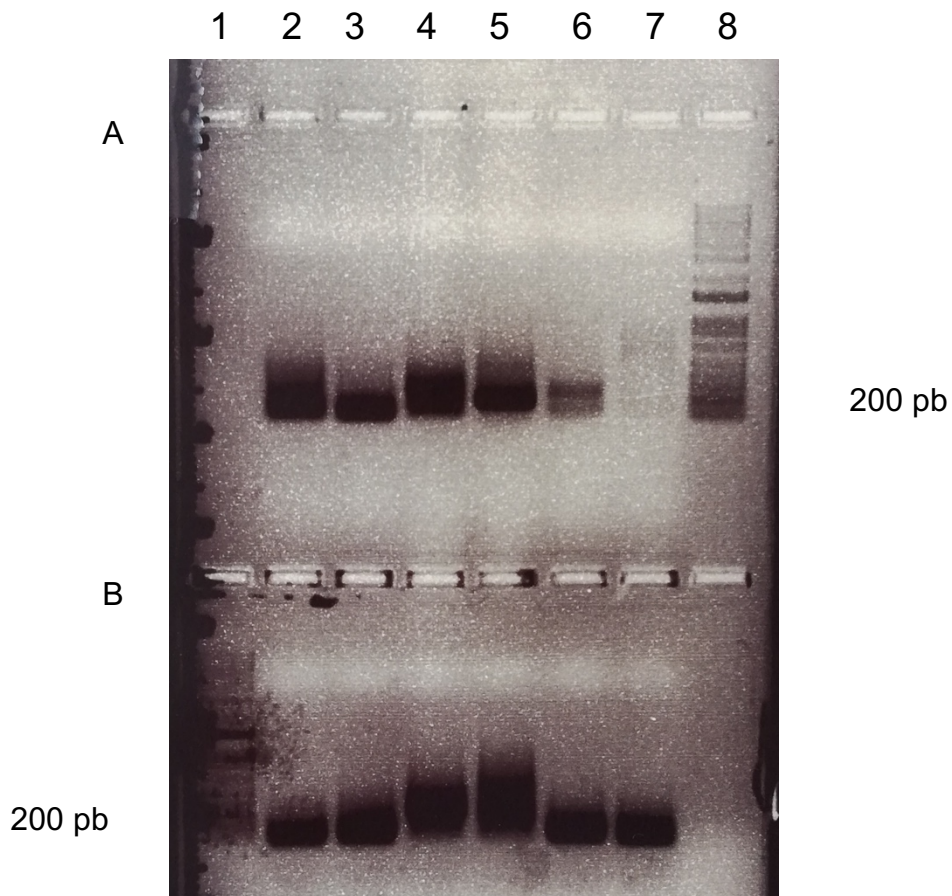


Fig. compl. 1. Ensayos de 3' RACE para los extremos 3' terminal (A) y 5' terminal (B) del OV2. **A.** Carril 1. vacío; Carril 2. *O. ficus-indica* M1; Carril 3. *O. ficus-indica* M2; Carril 4. *O. ficus-indica* M3; Carril 5. *O. ficus-indica* M4; Carril 6. *O. ficus-indica* M5; Carril 7. *O. ficus-indica* M6; Carril 8. 1kb ladder; **B.** Carril 1. 1kb plus; Carril 2. *O. ficus-indica* M1; Carril 3. *O. ficus-indica* M2; Carril 4. *O. ficus-indica* M3; Carril 5. *O. ficus-indica* M4; Carril 6. *O. ficus-indica* M5; Carril 7. *O. ficus-indica* M6; Carril 8. *O. ficus-indica* M6.

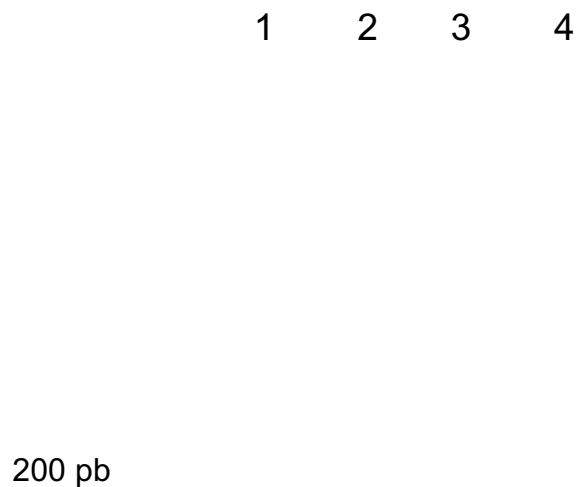


Fig. compl. 2. Ensayos de 3' RACE para los extremos 3' terminal y 5' terminal del OpVH. Carril 1. 1kb ladder; Carril 2. *O. ficus-indica* M1 5' terminal; Carril 3. *O. ficus-indica* M1 3' terminal; Carril 4. Vacío.

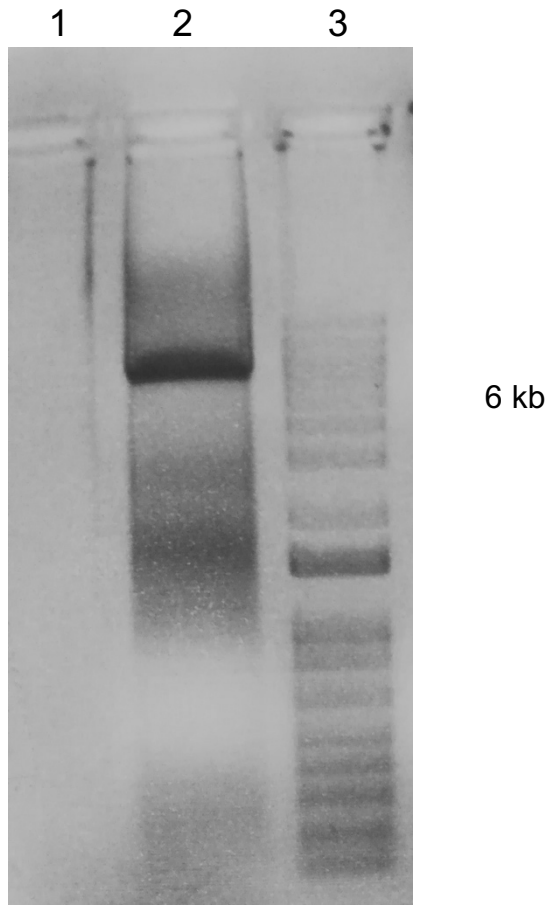


Fig. compl. 3. Ensayo de RT-PCR para el genoma completo de OV2. Carril 1. vacío; Carril 2. *O. ficus-indica* M1; Carril 3. 1kb ladder.

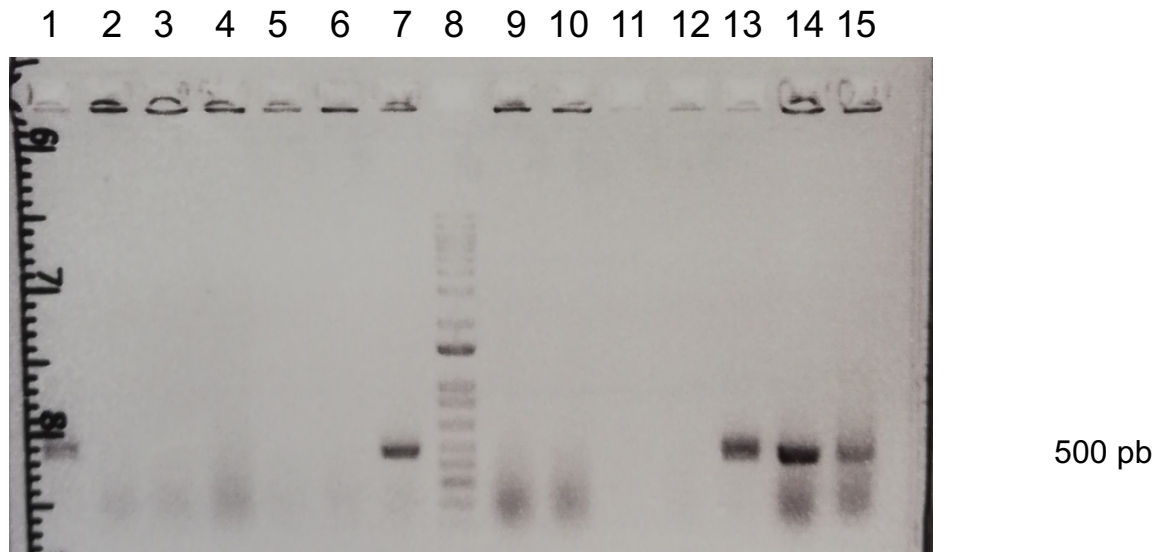


Fig. compl. 4. PCR colony para OV2, se analizaron 14 colonias individuales carril 1-7 y 9-15), carril 8 es el 1kb.

Digestión con BglII

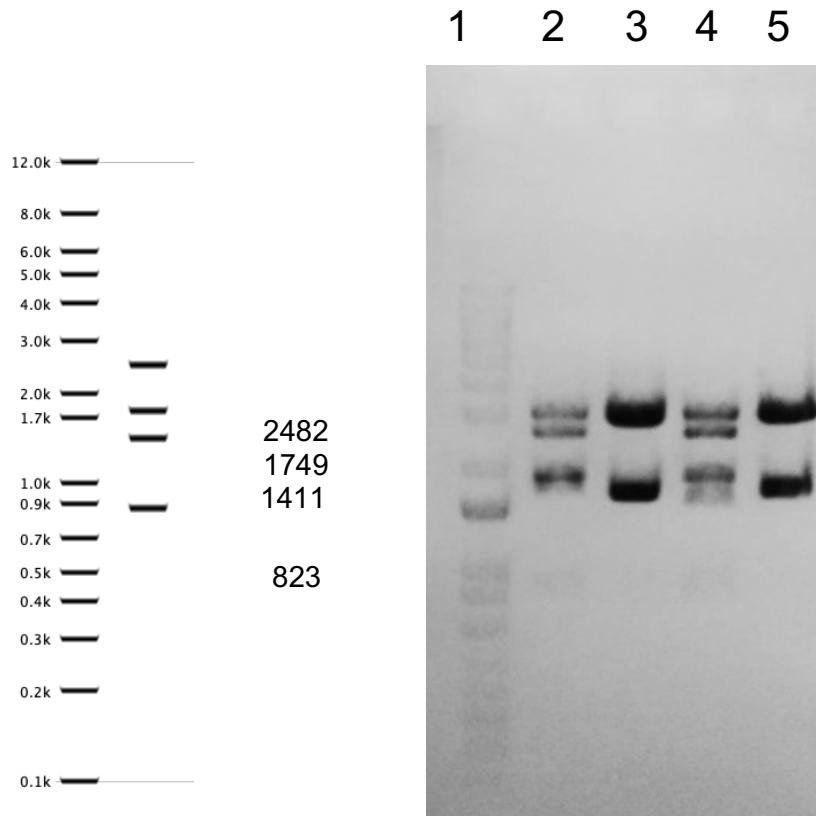


Fig. compl. 5. Ensayo de digestión con la enzima BglII y el plásmido con el genoma completo del OV2, se incubo por 30 min a 37 °C. A la izquierda el patrón de bandeado calculado para la digestión del plasmido con BglII calculado en Geneious ver. 9.1. Carril 1. 1kb ladder; Carril 2. Colonia 7; Carril 3. Colonia 13; Carril 4. Colonia 14 y Carril 5. Colonia 15.

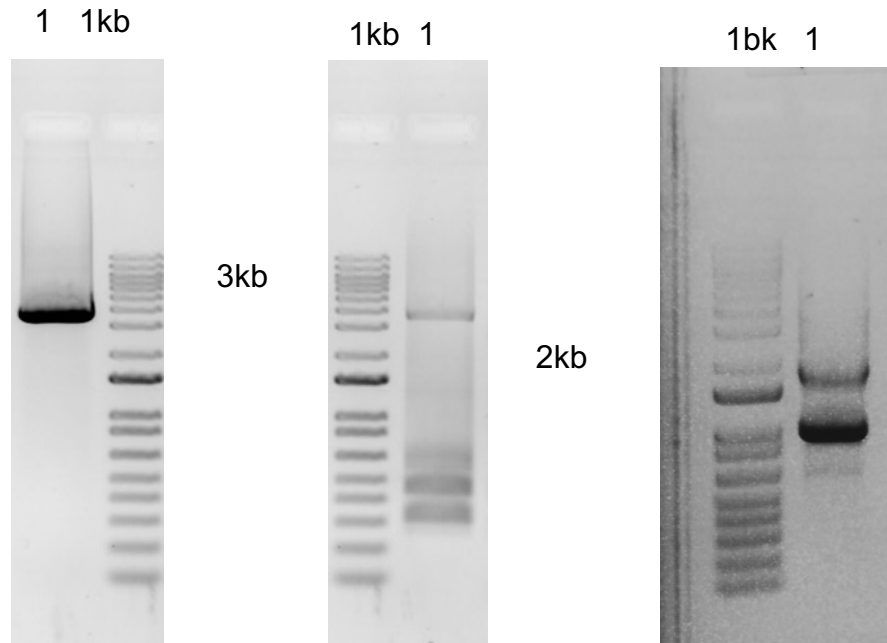


Fig. compl. 6. Ensayos de RT-PCR para amplificar los tres fragmentos del genoma completo del OpVH, en los tres se utilizo *O. ficus-indica* como muestra. De izquierda a derecha: primer fragmento de 3 kb que corresponde al nucleótido 1-3493, el siguiente al fragmento de 3kb que va del 3493-6710 y el ultimo a la derecha que corresponde al fragmento de 2 kb y va del 6572-8385. 1kb. 1kb ladder.

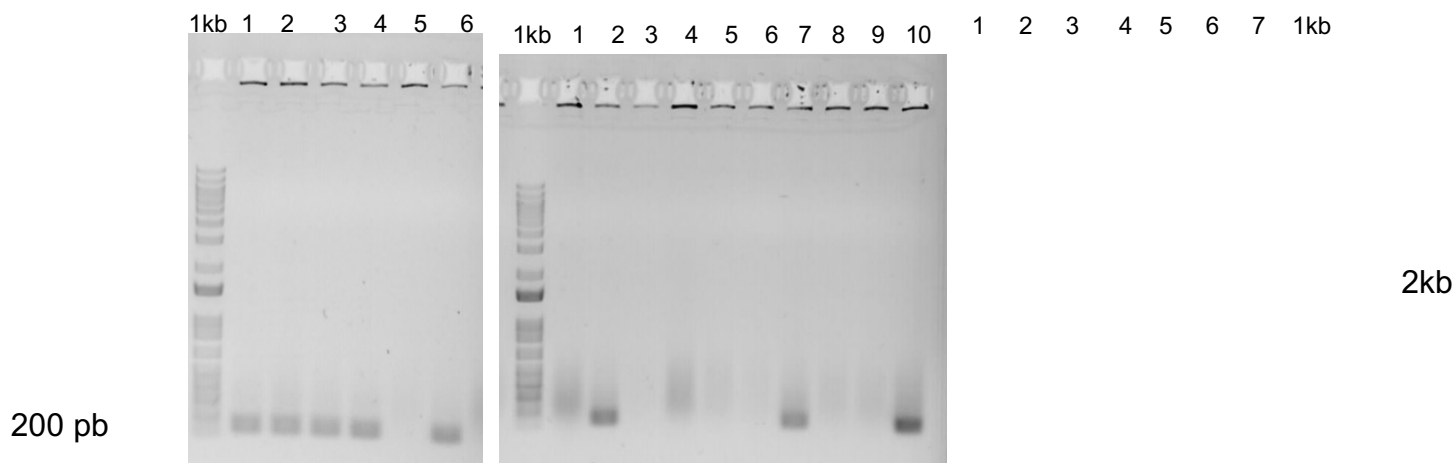


Fig. compl. 7. PCR *colony* para e OpVH, 1kb: 1kb *ladder*. El resto de carriles pertenecen a colonias individuales. De izquierda a derecha: primer fragmento de 3 kb que corresponde al nucleótido 1-3493, el siguiente al fragmento de 3kb que va del 3493-6710 y el último a la derecha que corresponde al fragmento de 2 kb y va del 6572-8385.

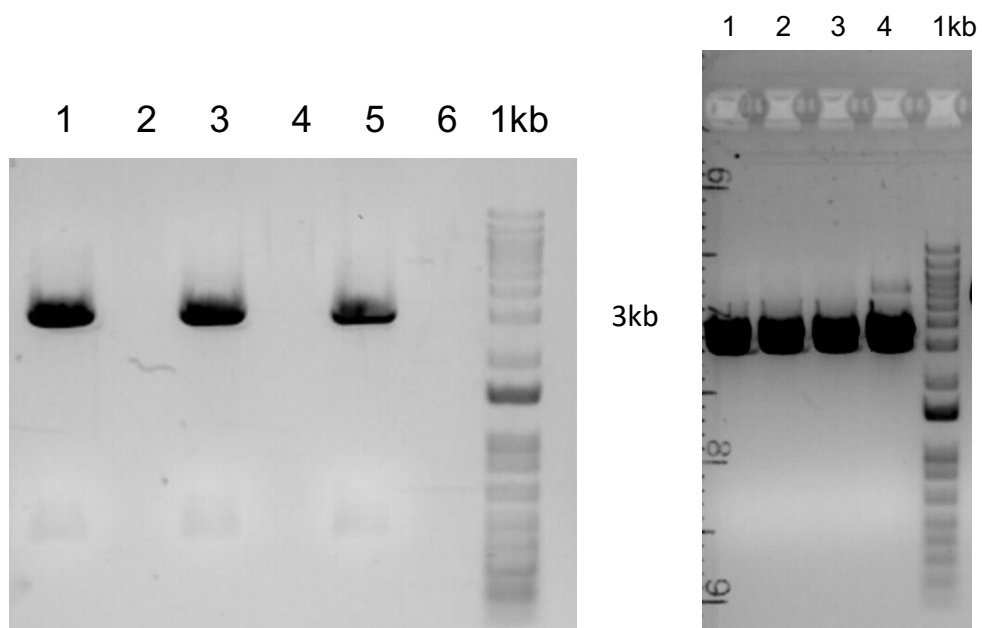
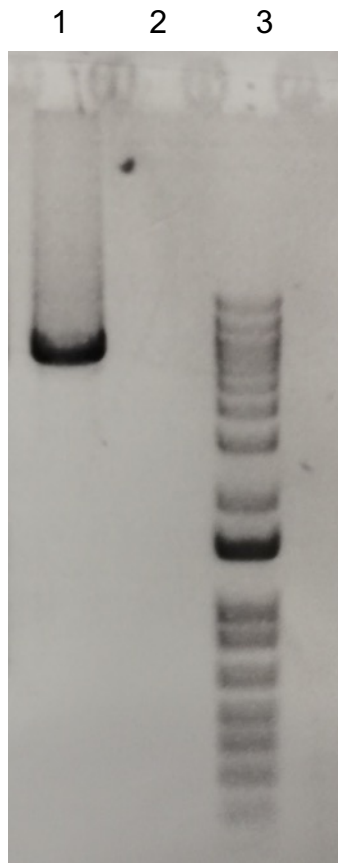


Fig. compl. 8. Ensayos de digestión con la enzima BglII y el plásmido pJet con el inserto de los dos primeros fragmentos del genoma del OpVH, se incubó por 30 min a 37 °C. De izquierda a derecha: primer fragmento de 3 kb que corresponde al nucleótido 1-3493, el siguiente al fragmento de 3kb que va del 3493-6710. 1kb: 1kb *ladder*. Carril 1 -6: colonias seleccionadas por PCR *colony*.

Clona del OV2 + T7



Transcritos *in vitro* OV2

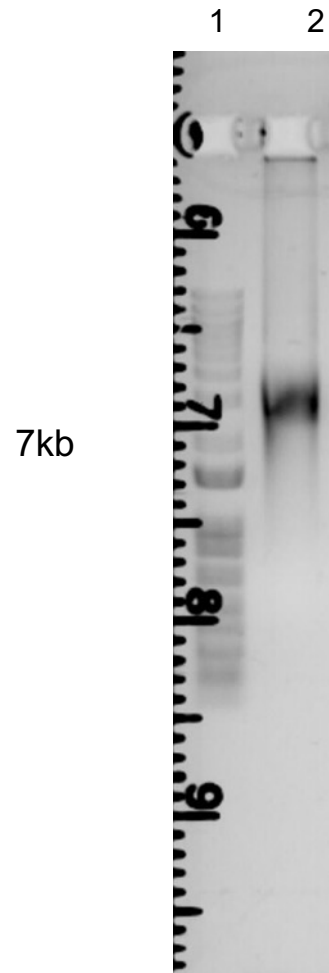


Fig. compl. 9. RT-PCR para amplificar la clona del OV2+ el promotor T7 (a la izquierda) y transcritos *in vitro* del OV2 infecciosos (a la derecha). 1kb: 1kb ladder.

MATERIAL SUPLEMENTARIO. CAPÍTULO 2. IDENTIFICACIÓN DE VIRUS EN PLANTAS DE NOPAL SILVESTRES

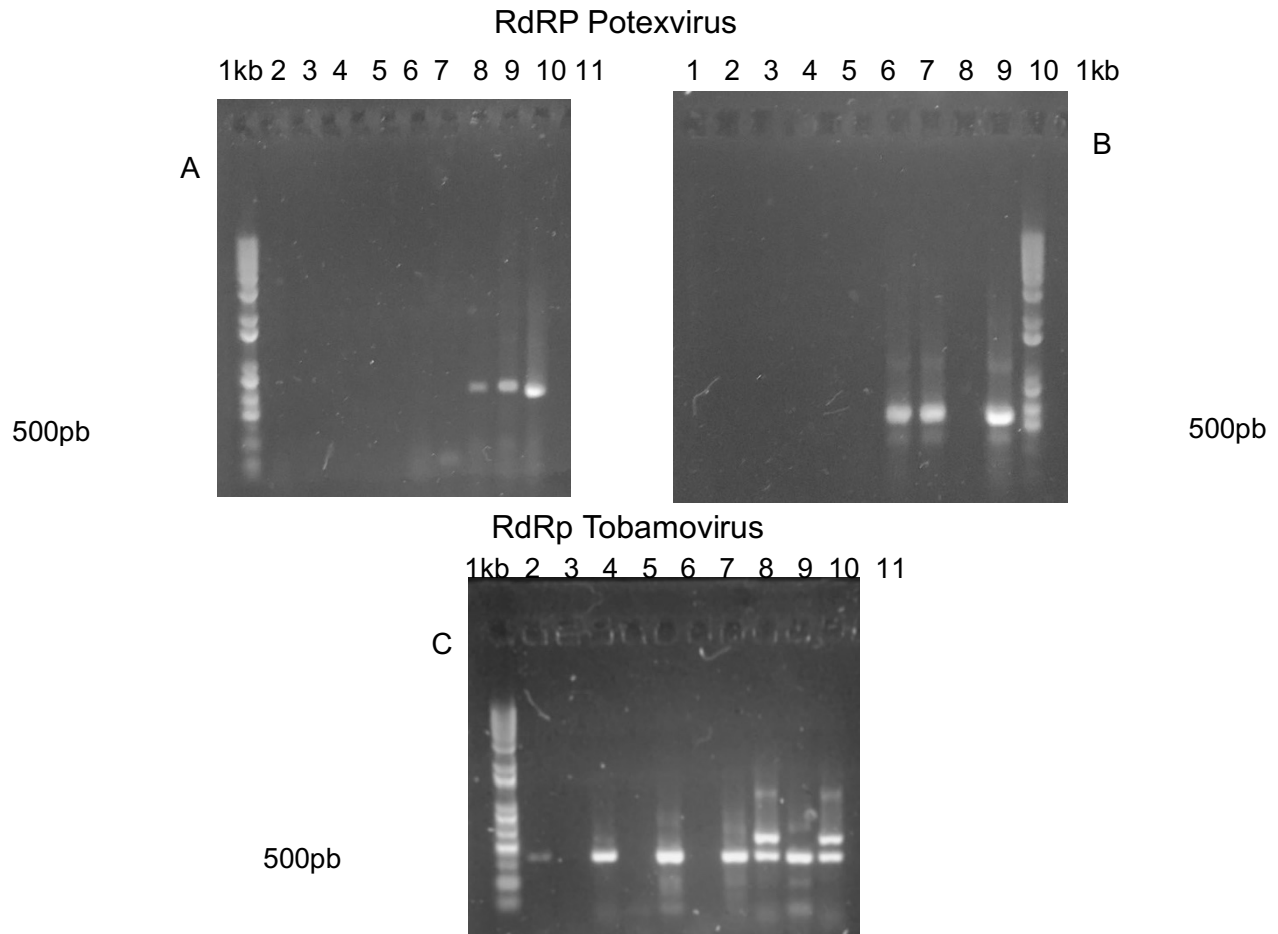


Fig. compl. 10. Ensayos de RT-PCR con oligonucleótidos que flanquean una región conservada del gen RdRP para Potexvirus **A.** (Potex5/Potex1): Carril 2. *O. pilifera* M1; Carril 3. *O. pilifera* M2; Carril 4. *O. pilifera* M3; Carril 5. *O. pilifera* M4; Carril 6. *O. pilifera* M5; Carril 7. *O. depressa* M1; Carril 8. *O. depressa* M2; Carril 9. *O. depressa* M3; Carril 10. *O. depressa* M4; Carril 11. *O. ficus-indica* (+). **B.** (Potex5/Potex2): Carril 1. *O. pilifera* M1; Carril 2. *O. pilifera* M2; Carril 3. *O. pilifera* M3; Carril 4. *O. pilifera* M4; Carril 5. *O. pilifera* M5; Carril 6. *O. depressa* M1; Carril 7. *O. depressa* M2; Carril 8. *O. depressa* M3; Carril 9. *O. depressa* M5; Carril 10. *O. ficus-indica* (+). Para el gen de la RdRp de Tobamovirus **C.** (TobNup3/TobNdo4): Carril 2. *O. pilifera* M1; Carril 3. *O. pilifera* M2; Carril 4. *O. pilifera* M3; Carril 5. *O. pilifera* M4; Carril 6. *O. pilifera* M5; Carril 7. *O. depressa* M1; Carril 8. *O. depressa* M2; Carril 9. *O. depressa* M4; Carril 10. *O. depressa* M5; Carril 11. *O. ficus-indica* (+)