



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIONEN CIENCIAS  
AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

## **"COINFECCIÓN DE VIRUS Y FITOPLASMAS EN EL SÍNDROME DE ENGROSAMIENTO DEL NOPAL (*Opuntia ficus-indica* Mill)"**

ALBA PRISCILIA SUASTE DZUL

T E S I S  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

La presente tesis titulada: "Coinfección de virus y fitoplasmas en el síndrome de engrosamiento del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) realizada por la alumna: Alba Priscilia Suaste Dzul bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

**FITOSANIDAD**

**FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

**CONSEJERO**



\_\_\_\_\_  
DRA. REYNA ROJAS MARTÍNEZ

**ASESOR**



\_\_\_\_\_  
DRA. EMMA ZAVALA MEJÍA

**ASESOR**



\_\_\_\_\_  
DRA. DAISY DE LA CARIDAD PÉREZ BRITO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Noviembre de 2011

# COINFECCIÓN DE VIRUS Y FITOPLASMAS EN EL SÍNDROME DE ENGROSAMIENTO DEL NOPAL (*Opuntia ficus-indica* Mill)

Alba Priscilia Suaste Dzul, MC.  
Colegio de Postgraduados, 2011

## RESUMEN

Durante el 2010, en el municipio de Nopaltepec, Estado de México, se han observado síntomas de amarillamiento, mosaico, proliferación, deformación de frutos y engrosamiento del cladodio en nopal tunero, algunos de estos síntomas se ha atribuido a la infección por fitoplasmas y otros son característicos de virus. Los estudios moleculares han sido incipientes para demostrar esta asociación, pues no se incluyen pruebas biológicas que determinen esto. Por lo tanto, los objetivos de esta investigación fue determinar la presencia de virus en muestras de nopal con el síndrome de engrosamiento del cladodio por medio del análisis del RNA bicatenario, microscopía electrónica, transmisión mecánica y RT-PCR, por otro lado, detectar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) la presencia de fitoplasmas en diferentes estratos del cladodio y raíz de plantas de nopal. La presencia de RNA bicatenario en tejidos de nopal con los síntomas antes mencionados, evidenció la presencia de un virus de RNA, mientras que con el microscopio electrónico de transmisión se observó partículas en forma de varilla flexible con una media modal de 950-1700 nm de longitud. El virus se transmitió mecánicamente a *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolory Datura stramonium*. Los resultados de las pruebas de RT-PCR indican que no se trata del TMV, miembros de la familia *Potyviridae* o especies del género *Potexvirus*. En conclusión, es probable que este virus no se encuentre reportado aun para este cultivo. La detección de fitoplasmas se realizó con la amplificación de un fragmento del gen 16S rRNA del fitoplasma, empleando los iniciadores universales P1/P7 y P1/Tint, mientras que para la PCR anidada se emplearon los R16F2/R16R2, en donde se obtuvo un fragmento de amplificación de 1 200 pb, el cual es característico para establecer la presencia de fitoplasma sp. El análisis de los patrones de restricción generados con endonucleasas reveló que el fitoplasma pertenecía al grupo 16SrXIII-Mexican periwinkle virescence. Estos resultados indican que en el síndrome de engrosamiento del cladodio del nopal existe una coinfección entre virus y fitoplasmas.

**COINFECTION OF VIRUSES AND PHYTOPLASMAS IN THE THICKENING  
SYNDROME OF THE CACTUS (*Opuntia ficus-indica* Mill)**

Alba Priscilia Suaste Dzul, MC.  
Colegio de Postgraduados, 2011

**ABSTRACT**

During 2010, in the municipality of Nopaltepec, Mexico, has been observed symptoms of yellowing, mosaic, proliferation, fruit deformation, and thickening of prickly pear cladode, some of these symptoms has been attributed to infection by phytoplasmas and others are characteristic of virus. Molecular studies have been incipient to demonstrate this association, it does not include biological tests to determine this. Therefore, the objectives of this research was to determine the presence of virus in samples of cactus with cladodes thickening syndrome, by double-stranded RNA analysis, electron microscopy, and RT-PCR, on the other hand, detected by Chain Reaction (PCR) the presence of phytoplasmas in different strata of the cladode and the roots of cactus plants. The presence of double-stranded RNA analysis in tissues of cactus with the above symptoms, showed the presence of an RNA virus, whereas, transmission electron microscope was observed rod flexible particles with a length of 950-1700 nm. The virus was transmitted mechanically to *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* y *Datura stramonium*. The results of RT-PCR tests indicate that is not TMV, members of the family *Potyviridae* or species of *Potexvirus*. In conclusion, it is likely that this virus is not yet reported for this crop. Phytoplasma detection was performed with the amplification of a fragment of the phytoplasma 16S rRNA gene, using universal primers P1/P7 and P1/Tint, while for the nested PCR were used R16F2/R16R2, we obtained an amplified fragment of 1200 bp, which is characteristic to establish the presence of phytoplasma sp. Analysis of restriction patterns generated with endonucleases revealed that the phytoplasma belongs to the Mexican periwinkle virescence-16SrXIII. These results indicate that in the thickening cactus cladode syndrome, exists coinfection between viruses and phytoplasmas.

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por otorgar beca durante los estudios de maestría.

Al **Colegio de Postgraduados** especialmente al programa de **Fitosanidad-Fitopatología** por fomentar mi desarrollo profesional y creatividad académica.

Al **laboratorio de Biología Molecular** de **SENASICA-DGSV** por permitir el uso de las instalaciones y equipos para la realización de parte de las pruebas moleculares para la detección de virus.

Al **Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No. 167304** por el apoyo económico al proyecto de investigación de tesis.

A la **Dra. Reyna I. Rojas Martínez** por la dirección de la presente tesis y correcciones realizadas en el manuscrito para el artículo, así como por formar parte de mi consejo particular. Principalmente por compartir sus experiencia y conocimientos.

A la **Dra. Emma Zavaleta Mejía** por haber tenido la paciencia de revisar y corregir el manuscrito para el artículo y tesis de investigación.

A la **Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito** por haber formado parte de mi consejo particular y contribuir en la revisión y corrección de la tesis.

Al **Dr. Daniel L. Ochoa Martínez** por haber contribuido en la corrección de la tesis, así como por permitir trabajar una parte experimental en el laboratorio de virus fitopatógenos y por hacer uso de los equipos y reactivos para concretar el trabajo de tesis.

## DEDICATORIA

*A mi madre María Guadalupe Dzul Pasos, por su amor, amistad, comprensión y apoyo incondicional. Gracias por estar siempre al pendiente de mi trabajo, porque a pesar de la distancia siempre te sentí cerca. Te amo.*

*A mi hermana Ellen por los cuidados y consejos interminables, Gehena por tu alegría y apoyo incondicional y a mi hermano Gerardo Suaste Dzul por tu espíritu incansable, los quiero mucho.*

*A mis amigas Mercedes, Lupita, Eréndira, Fabiola, Cristina, Blanca, Yolanda y Martha. Por todos los momentos inolvidables que pasamos juntas. Siempre estarán en mi corazón.*

*A mis amigos Raúl, Andrés, Alberto, Abimael, Dago, Juan Manuel, Jorge, Edgar, Tony, Carlos y Moisés, por su amistad y apoyo incondicional.*

## CONTENIDO

<b>COINFECCIÓN DE VIRUS Y FITOPLASMAS EN EL SÍNDROME DE ENGROSAMIENTO DEL NOPAL (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill)</b> .....	iii
<b>COINFECTION OF VIRUSES AND PHYTOPLASMAS IN THE THICKENING SYNDROME OF THE CACTUS (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill)</b> .....	iv
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	v
<b>DEDICATORIA</b> .....	vi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I. Virus Asociado al Engrosamiento del Cladodio en Nopal Tunero (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill)</b> .....	3
Resumen.....	3
Abstract.....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	5
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	6
Material vegetal.....	6
Transmisión mecánica, separación de virus y pruebas en plantas indicadoras.....	6
Purificación de la partícula viral.....	6
Microscopía Electrónica.....	7
Aislamiento de RNA bicatenario (RNA bc).....	7
Extracción de RNA total.....	7
RT-PCR para la detección de tobamovirus, potyvirus y potexvirus.....	7
Amplificación del gen endógeno gliceraldehído.....	8
<b>RESULTADOS</b> .....	10
<b>DISCUSIÓN</b> .....	12
<b>CONCLUSIONES</b> .....	14
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	15
<b>CAPITULO II. Detección Molecular de Fitoplasmas en Nopal Tunero (<i>Opuntia ficus-indica</i> Mill) con Síntomas de Engrosamiento del Cladodio</b> .....	19
Resumen.....	19
Abstract.....	20
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	21

<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	22
Material vegetal .....	22
Extracción del ADN .....	22
Detección de fitoplasmas por PCR.....	23
RFLP-PCR.....	24
Secuenciación y análisis del gen 16 S rDNA .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	25
<b>DISCUSIÓN</b> .....	26
<b>CONCLUSIONES</b> .....	28
Agradecimientos .....	28
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	29
<b>ANEXOS</b> .....	32



## LISTA DE CUADROS

		Pág.
<b>Cuadro</b>	Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este estudio para la	32
<b>1</b>	detección de TMV, potyvirus y potexvirus en nopal.	
<b>Cuadro</b>	Síntomas observados en las plantas indicadoras inoculadas	33
<b>2</b>	mecánicamente con macerado de epidermis de nopal con engrosamiento del cladodio.	
<b>Cuadro</b>	Resultados de la detección de fitoplasmas en las 35 muestras de	34
<b>3</b>	nopal tunero.	

## LISTA DE FIGURAS

		Pág.
<b>Figura 1</b>	Síntomas de <b>A)</b> mosaico, <b>B)</b> manchas cloróticas y <b>C)</b> engrosamiento y mosaico en el cladodios y fruto de nopal tunero, provenientes de la región de Nopaltepec, Estado de México.	35
<b>Figura 2</b>	Síntomas observados en plantas inoculadas mecánicamente con macerado de epidermis de nopal tunero. <b>A)</b> lesiones locales anulares en <i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi; <b>B)</b> lesiones locales necróticas en <i>N. glutinosa</i> y <b>C)</b> <i>Datura stramonium</i> .	35
<b>Figura 3</b>	Síntomas observados en plantas inoculadas mecánicamente con macerado de epidermis de nopal tunero. <b>A)</b> Lesiones locales cloróticas en <i>Chenopodium quinoa</i> ; <b>B)</b> <i>C. amaranticolor</i> ; y <b>C)</b> <i>N. occidentalis</i> .	36
<b>Figura 4</b>	Síntomas observados en plantas inoculadas mecánicamente con macerado de epidermis de nopal tunero. <b>A)</b> y <b>B)</b> mosaico en <i>N. benthamiana</i> .	36
<b>Figura 5</b>	Partículas virales en forma de varilla flexible (950-1700 nm) del virus asociado a los síntomas de engrosamiento del cladodio y mosaico en nopal tunero.	37
<b>Figura 6</b>	Patrón electroforético de RNA bc obtenido de plantas de <i>Nicotiana benthamiana</i> con mosaico inoculada con epidermis de nopal con mosaico y engrosamiento del cladodio. Línea M) Marcador molecular 1 Kb; 1) RNA bc sin digestión enzimática; 2) RNA bc tratado con DNAsa I; 3) RNA bc tratado con nucleasa S1.	37
<b>Figura 7</b>	Electroforesis del RNA total obtenido de plantas diferenciales inoculadas con cladodios de nopal con síntomas de mosaico y engrosamiento del cladodio. Línea 1) <i>Chenopodium quinoa</i> ; 2) <i>C. amaranticolor</i> ; 3) <i>Nicotiana benthamiana</i> .	38
<b>Figura 8</b>	Electroforesis del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos para GAPDH.	38

<b>Figura 9</b>	Electroforesis del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos específicos para TMV. Línea M) Marcador molecular de 100 pb; 1-7) plantas diferenciales con síntomas a partir de tejidos de nopal de la muestra Np16; 9-15) plantas diferenciales con síntomas separadas a partir de tejidos de nopal de la muestra Np26; 8 y 16) Control positivo <i>Tobacco mosaic virus</i> .	39
<b>Figura 10</b>	Electroforesis del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos universales para miembros de la familia <i>Potyviridae</i> . Línea M) Marcador molecular de 100 pb; 1-7) plantas indicadoras con síntomas a partir de tejidos de nopal de la muestra Np16; 8) control positivo <i>Potato virus Y</i> ; 9) control negativo.	39
<b>Figura 11</b>	Electroforesis del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos para <i>Potexvirus</i> . Línea M) Marcador molecular de 100 pb; 1-9) plantas indicadoras con síntomas a partir de tejidos de nopal de la muestra Np16 y Np26; 10) control positivo <i>Papaya Mosaic Virus</i> ; 11) control negativo.	40
<b>Figura 12</b>	Síntomas de <b>A)</b> amarillamiento en fruto. <b>B)</b> Deformación del fruto y engrosamiento del cladodio. <b>C)</b> Amarillamiento del cladodio. <b>D)</b> Proliferación. E. Mosaico en cladodio de nopal tunero.	41
<b>Figura 13</b>	Extracción del ADN total visualizado en un gel al 0.8% de concentración de agarosa. Línea 1) Np01; 2) Np02; 3) 03; 4) Np04; 5) Np 05; 6) Np06.	42
<b>Figura 14</b>	Productos de amplificación 1 800 pb, con los iniciadores P1/P7 para muestras de Nopaltepec, Edo. de México. Línea M) Marcador molecular 1 Kb; 1) Np01; 2) Np02; 3) Np03; 4) Np04; 5) Np05; 6) Np06; 7) Np07; 8) Np08; 9) Np09; 10) Np16; 11) Np17; 12) Np26; 13) control positivo ALC; 14) control negativo.	42
<b>Figura 15</b>	Productos de amplificación 1 600 pb, con los iniciadores P1/Tint para muestras de Nopaltepec, Edo. de México. Línea M) Marcador molecular 1 Kb; 1) Np01; 2) Np02; 3) Np03; 4) Np04; 5) Np05; 6) Np06; 7) Np07; 8) Np08; 9) Np09; 10) Np16; 11) Np17; 12) Np26;	43

13) control positivo ALC; 14) control negativo.

**Figura 16** Productos de amplificación de la PCR anidada con los iniciadores generales R16F2/R16R2, para algunas muestras de Nopaltepec, México. Línea M) Marcador molecular 100 pb; 1) Np01; 2)Np02;3)Np03; 4)Np04; 5)Np05; 6)Np06; 7) Np08; 8) Np09; 9) Np07; 10) Np16; 11) Np17; 12) Np26; 13) control positivo ALC. 43

**Figura 17** Análisis de los patrones de restricción (RFLP-PCR) a partir de los productos de amplificación de la PCR anidada (R16F2/R16R2) para muestras de nopal tunero con síntomas de engrosamiento, mosaico, amarillamiento, proliferación y deformación de frutos del cladodio procedentes de Nopaltepec, Edo. de México. Los productos de PCR fueron digeridos con *AluI* (línea 1), *HaeII* (2), *HaeIII* (3), *KpnI* (4), *TrU91* (5), *Tps5091* (6). Línea M1: Marcador molecular Lambda DNA digerido con *HindIII*; M2) Marcador molecular 100 pb. 44

## INTRODUCCIÓN

La familia *Cactaceae* es endémica del Continente Americano. Antes que el hombre distribuyera plantas de esta familia no existían en el resto del mundo, actualmente se encuentran desde Canadá hasta Argentina (Corrales y Flores, 2003). Esta familia es interesante y desafiante debido a su variación morfológica, diversas adaptaciones al medio ambiente y a sus sistemas de reproducción. Dentro de los grupos de la familia de las cactáceas, las opuntias son de las más exitosas y ampliamente distribuidas (Rebman y Pinkava, 2001). *Opuntia ficus-indica* es la cactácea de mayor importancia económica en el mundo, se le cultiva en Europa, Oriente Medio, África, Asia, Oceanía y América (Anderson, 1960; Barbera, 1995). El nopal tunero (*Opuntia ficus-indica* Mill) tiene como centro de origen a América tropical y subtropical, es también conocido como nopal, nochtli o nopalli, y “tuna” en Cuba. El género *Opuntia* (*sensu stricto*) está formado por 189 especies (Anderson, 2001), de las cuales se conocen 83 especies mexicanas de este género (Guzmán *et al.*, 2003). Hoy en día, este cultivo está presente en una gran variedad de condiciones agroclimáticas de forma silvestre o cultivada, además se ha difundido a África, Asia, Europa y Oceanía donde también se cultivan (FAO, 1995; Sáenz, 2006). El nopal se cultiva para la producción de fruta, la tuna, en ambos hemisferios y en todos los continentes, excepto la Antártida. La ausencia de datos estadísticos actualizados para la mayoría de los países en los que esta especie se cultiva, solo permiten una estimación aproximada de la superficie cultivada (Barbera e Inglese, 1993). Los frutos de nopal son muy apreciados, su distribución se extiende a países como Argentina, Estados Unidos (Curtis, 1977), Chile (Sudzuki *et al.*, 1993), Israel (Nerd y Mizrahi, 1993) y Sudáfrica (Wessels, 1988). A nivel mundial, México es el principal productor de tuna aportando 322, 102 t al año, concentrada en los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes, Jalisco, Guanajuato, y en la región sur-central del estado de Hidalgo, México, Tlaxcala y Puebla (SIAP, 2009). Por otro lado, Italia es el primer productor del Mediterráneo con cerca de 70, 000 t de rendimiento (Basile y Foti, 1997) donde Sicilia representa casi la totalidad de la producción italiana (Barbera e Inglese, 1993). Entre los principales problemas fitosanitarios que limitan la producción de nopal, tuna, nopalitas y forraje están las plagas como ácaros (*Aceria cactorum* Keifer), la chinche roja (*Hesperolabops gelastops* Kirk) y gris (*Chelinidea tabulata* Burm), entre otros, mientras que los patógenos *Alternaria* sp., *Macrophomina* sp. y *Erwinia carotovora* son los más importantes (Borrego y Burgos, 1986).

En México, se observó por primera vez el síntoma de engrosamiento del cladodio y en 1974 se inician estudios para determinar al agente causal de este síntoma, concluyéndose que era causado por virus o fitoplasmas (Borrego y Burgos, 1986; Pimienta, 1990). Recientemente, en el municipio de Nopaltepec, Edo. de México, se han observado síntomas de engrosamiento del cladodio, amarillamiento, mosaico, proliferación y deformación de frutos en nopal tunero, sin que se conozca(n) la(s) causa(s) de esta(s) alteraciones, por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar la etiología de esta enfermedad.

## **CAPÍTULO I. VIRUS ASOCIADO AL ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO EN NOPAL TUNERO (*Opuntia ficus-indica* Mill)**

**Alba Suaste-Dzul, Reyna Rojas-Martínez, D. L. Ochoa-Martínez, Emma Zavaleta-Mejía,** Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Fitosanidad-Fitopatología, Montecillo, Estado de México, CP 56230 México, **Daisy Pérez-Brito,** Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Laboratorio GeMBio, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, CP 97200 México, y **Camilo Hernández-Juárez,** Universidad Autónoma Chapingo, Parasitología Agrícola. CP 56230. Chapingo, Estado de México. Correspondencia: rojas@colpos.mx

### **Resumen**

En el municipio de Nopaltepec, Estado de México, se han observado síntomas de amarillamiento, mosaico, proliferación, deformación de frutos y engrosamiento del cladodio en nopal tunero, algunos de los cuales son característicos de fitoplasmas y otros de virus, los estudios moleculares han sido incipientes para demostrar esta asociación, pues no se incluyen pruebas biológicas que determinen esto. Con la idea de contribuir al conocimiento de la etiología de esta enfermedad, el objetivo de la presente investigación fue determinar la presencia de virus en muestras de nopal con engrosamiento del cladodio. El análisis del RNA bicatenario en tejidos de nopal con los síntomas antes mencionados, evidenció la presencia de un virus de RNA. Por otro lado, con el microscopio electrónico de transmisión se observó partículas en forma de varilla flexible con una longitud de 950-1700 nm. El virus se transmitió mecánicamente a *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* y *Datura stramonium*. Los resultados de las pruebas de RT-PCR indican que no se trata del TMV, miembros de la familia *Potyviridae* o especies del género *Potexvirus*.

**Palabras clave adicionales:** nopal, virus elongados, microscopía electrónica de transmisión.

## **Abstract**

In the municipality of Nopaltepec, Mexico, symptoms of yellowing, mosaic, proliferation, fruit deformation, and thickening prickly pear cladode, some of which are characteristic of phytoplasmas and other viruses, molecular studies have been incipient to demonstrate this association, it does not include biological tests to determine this. With the idea of contributing to the knowledge of the etiology of this disease, the aim of this research was to determine the presence of virus in samples of cactus cladode thickening. The double-stranded RNA analysis in tissues of cactus with the above symptoms, showed the presence of an RNA virus. On the other hand, transmission electron microscope was observed rod flexible particles with a length of 950-1700 nm. The virus was transmitted mechanically to *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolory* *Datura stramonium*. The results of RT-PCR tests indicate that is not a TMV, members of family *Potyviridae* or species of *Potexvirus*.

**Additional keywords:** Prickly pear, elongated virus, transmission electron microscopy.



## INTRODUCCIÓN

En México el nopal ha sido importante en el desarrollo de las culturas regionales (Pimienta, 1997). *Opuntia ficus-indica* es la cactácea de mayor importancia económica en el mundo, se le cultiva en Europa, Oriente Medio, África, Asia, Oceanía y América (Anderson, 1960; Barbera, 1995). Los frutos de nopal son muy apreciados en países como Argentina, Estados Unidos (Curtis, 1977), Chile (Sudzuki *et al.*, 1993), Israel (Nerd y Mizrahi, 1993) y Sudáfrica (Wessels, 1988). México es el principal productor con 744, 250 t al año procedentes de los estados de Morelos, Distrito Federal, Baja California, Puebla, Zacatecas y Aguascalientes (SIAP, 2009). Este cultivo se ve afectado por diversas plagas, y enfermedades principalmente causadas por hongos fitopatógenos (como *Alternaria* sp. y *Macrophomina* sp.) y bacterias (Borrego y Burgos, 1986). En años recientes se ha observado un número creciente de plantas con síntomas caracterizados por el engrosamiento del cladodio, mosaico, amarillamiento, proliferación y deformación de frutos. Con base en la sintomatología, se sospechó que pudiera ser causada por algún virus, Felker *et al.* (2009) reportan en California que el engrosamiento del cladodio es causado por el *Tobacco bushy top virus*, y sugiere que es probable que los síntomas que se presentan en Italia, Sudáfrica y México sean provocados por este mismo virus. Por otro lado en 1976 se una enfermedad afectando a *Nopalea cochenillifera* L. consistente en un moteado suave en las pencas jóvenes y con base en los resultados de transmisión en plantas indicadoras, microscopia electrónica y serología, se determinó que se trataba del *Cactus virus X* (Lastra *et al.*, 1976); a la fecha diversas especies de virus se encuentran afectando cactáceas cultivadas como el *Sammons's opuntia virus* (SOV), *Cactus virus X* (CXV), el *Zygocactus virus X* (ZXV), el *Saguaro cactus virus* (SCV) y *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Giri y Chessin, 1975; Lastra *et al.*, 1976; Attothom *et al.*, 1978; Milbrath y Nelson, 1972; Hausbeck y Gildow, 1991). Con base en los antecedentes mencionados, el objetivo de la presente investigación fue caracterizar e identificar el (o los) viru(s) asociados al síndrome de engrosamiento y mosaico del cladodio mediante el análisis del RNA bicatenario (RNA bc), transmisión mecánica a plantas indicadoras, microscopía electrónica y por la técnica molecular de RT-PCR (transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa).

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

En el municipio de Nopaltepec, Estado de México, se colectaron 35 cladodios con síntomas de engrosamiento, amarillamiento, mosaico, proliferación y deformación de frutos (Fig. 1). Posteriormente, fueron sembradas en recipientes con suelo estéril y embebidas con Radix 10,000 ® (ácido indol-3-butírico 10,000 ppm) para favorecer el enraizamiento y así disponer de fuente de inóculo.

### **Transmisión mecánica, separación de virus y pruebas en plantas indicadoras**

Para realizar la inoculación mecánica se separaron porciones de epidermis de 2 cm<sup>2</sup> de cladodios con síntomas de engrosamiento y mosaico con navajas de bisturí y pinzas de disección, las cuales se maceraron en solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 7.0, con mortero y pistilo. El macerado se frotó con un hisopo en cuatro hojas jóvenes de las siguientes especies de plantas indicadoras: *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *N. glutinosa*, *N. clevelandii*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. benthamiana*, *Datura stramonium*, *Chenopodium quinoa* y *C. amaranticolor*, previamente espolvoreadas con carburundum 600 mallas. Como testigo se tuvo un conjunto de las plantas diferenciales antes indicadas inoculadas únicamente con solución amortiguadora de fosfatos.

Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero con una temperatura de 20-30°C durante 45 días registrando cada 72 horas los síntomas que se presentaron en cada planta inoculada. Con el propósito de corroborar los resultados, esta prueba se repitió dos veces. Las plantas que presentaron lesiones locales necróticas, cloróticas y mosaico, se utilizaron como fuente de inóculo para su transmisión mecánica en juegos de plantas indicadoras sanas, y así confirmar o descartar los mismos síntomas y lograr separar a las partículas virales en caso de haber una mezcla.

### **Purificación de la partícula viral**

La purificación parcial de la partícula viral se desarrolló de acuerdo al protocolo reportado por Lastra *et al.* (1976) a partir de 35 muestras de cladodios con los síntomas antes mencionados.

### **Microscopía Electrónica**

El purificado parcial obtenido de las diferentes muestras se utilizó para realizar la técnica de tinción negativa con acetato de uranilo 2% pH 6.8. La observación, medición y toma de microfotografías se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Jeol Mod. JEM 1200EX II (Colariccio *et al.*, 1996).

### **Aislamiento de RNA bicatenario (RNA bc)**

La extracción del RNA de doble cadena viral se realizó siguiendo el protocolo Dodds *et al.*, (1984), a partir de cladodios de nopal con síntomas típicos de engrosamiento, mosaico y deformación de frutos, así como de plantas indicadoras inoculadas mecánicamente que presentaron lesiones locales necróticas, cloróticas y mosaicos. Para corroborar que se trataba de RNA bc viral, la muestra obtenida se digirió con DNAsa I y nucleasa S1 (Promega, Madison, WI, USA) utilizando 10 µg mL<sup>-1</sup> durante 1 h a temperatura de 37°C, de acuerdo con las condiciones indicadas por el proveedor para cada enzima.

El RNA bc viral fue analizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 6% (p/v) en amortiguador TBE 1X (Tris-borato-EDTA), durante 1.5 h a 100 V, con marcador molecular de 100 pb (Invitrogen®). Una vez concluida la electroforesis los geles se tiñeron en solución de nitrato de plata.

### **Extracción de RNA total**

El RNA total se aisló a partir de tejido foliar de plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con epidermis de nopal que mostraban el síndrome mencionado, con el producto RNeasy® Mini Kit (QIAGEN) bajo las recomendaciones del proveedor. Este RNA se utilizó para la detección molecular de tobamovirus, potyvirus y potexvirus considerando la forma de la partícula viral observada al microscopio electrónico. Así mismo, se obtuvo RNA de *Solanum lycopersicum* inoculada mecánicamente con TMV (*Tobacco mosaic virus*), tejido liofilizado de papa infectado con PVY (*Potato virus Y*) y tejido liofilizado de papaya infectado con PapMV (*Papaya mosaic virus*) como testigos positivos, respectivamente.

### **RT-PCR para la detección de tobamovirus, potyvirus y potexvirus**

Para la síntesis de cDNA, se colocó en un tubo de PCR 2 µg de RNA, 10 µg de los oligonucleótidos TMV-CPF y TMV-CPR, específicos para el grupo de TMV, M4T para la familia *Potyviridae* y Potex-1RC generales para especies del género *Potexvirus*, para cada

caso respectivamente. La mezcla se incubó a 72°C por 10 min y enseguida se colocó en hielo. Posteriormente, se realizó una segunda mezcla con buffer 5X M-MLV (Promega®, Madison, WI, USA), 0.1M de DTT, 200 µM de dNTP's y 1 U de la enzima reversa transcriptasa M-MLV (10,000 U) (Promega®, Madison, WI, USA). La mezcla total se incubó a 37°C por 60 min, seguidos de un ciclo de 10 min a 70°C. En la PCR para TMV, se emplearon los oligonucleótidos TMV-CPF y TMV-CPR (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2007); para la familia *Potyviridae*, los oligonucleótidos M4 y Sprimer (Chen *et al.*, 2001), y para *Potexvirus*, Potex-2RC y Potex-5 (Van der Vlugt y Berendsen, 2002) (Cuadro 1). En todos los casos se tuvo un volumen final de 25 µL de reacción con los siguientes reactivos, amortiguador para PCR 1X (10X, 20 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.4) (Biogénica®), 0.2 mM de dNTP's, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), 10 pmol de cada iniciador, 1 U de *Taq* DNA polimerasa (Biogénica®) y 1 µg de DNAc objetivo. La amplificación para TMV se realizó en un termociclador Techne (TC-300), con una desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, seguido por 31 ciclos de 2 min a 95°C, 2 min a 56°C y 2 min a 72°C, y una extensión final de 5 min a 72°C (Gutiérrez *et al.*, 2004).

Las condiciones de amplificación para miembros de la familia *potyviridae* fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 0.5 min a 94°C, 1 min a 47°C y 2 min a 72°C, con extensión final de 10 min a 72°C (Chen *et al.*, 2001). Para el caso de potexvirus, se aplicó una desnaturalización inicial de 94°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 51.5°C y 2 min de 72°C, con una extensión final de 5 min a 72°C (Van der Vlugt y Berendsen, 2002). El producto de amplificación obtenido (250 pb, 1 700 pb y 600 pb, respectivamente), se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen®) al 1.5% (p/v) en amortiguador TAE 1 X (Tris-acetato- EDTA) a 100 V por 50 min teñido previamente con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb. Los geles se visualizaron en un transiluminador UV (Gel Doc 2000 Bio-Rad®) y las imágenes fueron capturadas y analizadas con el programa Quantity One 4.1.1.

### **Amplificación del gen endógeno gliceraldehído**

La verificación de la ausencia de inhibidores que interfieren en la estabilidad del DNAc para la reacción de PCR, se realizó con la amplificación del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con los iniciadores GLI-FW/GLI-RV (Cuadro 1) (Fernández-Herrera, 2011). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 95°C por

5 min, seguido de 30 ciclos de 0.5 min a 94°C, 0.5 min a 55°C y 1 min a 72°C, con extensión final de 7 min a 72°C. El producto de amplificación obtenido (217 pb), se visualizó bajo las mismas condiciones de la RT-PCR.

## RESULTADOS

Las especies indicadoras inoculadas mecánicamente con macerados de la epidermis de cladodios de nopal tunero con engrosamiento y mosaico, mostraron síntomas entre los 6 a 21 días después de la inoculación. La mayoría de los síntomas se presentó a los 6 días después de la inoculación con la muestra Np16 de nopal, mientras que para Np26 los síntomas se presentaron a los 10 días aproximadamente (Cuadro 2). Para el grupo de diferenciales inoculadas con el macerado proveniente de la muestra Np16 y Np26 fueron iguales, los cuales incluyeron lesiones locales necróticas en *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *N. glutinosa* y *Datura stramonium* (Fig. 2), mientras que en *Chenopodium quinoa*, *C. amaranticolor* y *N. occidentalis* se observaron lesiones locales cloróticas (Fig. 3), y únicamente en *N. benthamiana* se mostró un mosaico en las hojas inoculadas y nuevas, lo que indicó un movimiento sistémico del virus en esta planta (Fig. 4). No se observaron síntomas en *N. clevelandii* y *N. rustica*. Los síntomas observados en las diferenciales a partir de la inoculación de dos muestras de tejido de cladodio de nopal (Np16 y Np26), confirmó la presencia de un solo virus asociado al engrosamiento y mosaico del cladodio, pues en todos los ensayos de la inoculación mecánica se obtuvo el mismo patrón de síntomas. En las preparaciones hechas con el purificado parcial procedente de nopal con engrosamiento del cladodio, se observaron partículas virales en forma de varilla flexible, con una media modal de 950-1700 nm (Fig. 5). La morfología esta partícula es similar a las reportadas para los géneros *Potyvirus* y *Potexvirus* (Conti *et al.*, 2001), ya que los tamaños de longitud son inferiores a los resultados obtenidos en microscopía. Para el género *Potyvirus* se reporta una longitud de partícula de 680-900 nm (ICTV, 2005), mientras que para el género *Potexvirus* las dimensiones son de 470-580 nm (ICTV, 2005). El *Cactus virus X* tiene menor longitud (520 nm) comparada con la partícula viral aislada de los purificados parciales de las muestras de nopal del presente estudio (Lastra *et al.*, 1976), a pesar de esto y que no se encuentra reportado para México, se aplicó las pruebas moleculares para miembros del género *Potexvirus* al cual pertenece.

Después de la digestión enzimática con DNasa I y Nucleasa S1 de plantas diferenciales inoculadas mecánicamente con el macerado de la epidermis de nopal con síntomas de engrosamiento y mosaico, el patrón electroforético observado fue de tres bandas a 6 000 pb, 1 500 pb y 600 pb, respectivamente (Fig. 6). En la muestra de *N. benthamiana*, el RNA bc se

logró apreciar claramente lo cual sugiere que el virus se encontraba replicándose activamente en esta planta. El RNA total obtenido de cada muestra mostró buena calidad e integridad (Fig. 7), con una concentración de 631.1 ng/μL y niveles de pureza de 1.69 y 1.96 lo que indicó una mínima presencia de contaminantes. En la reacción de amplificación para el gen endógeno gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), se obtuvo un producto de amplificación de 217 pb aproximadamente para las muestras problema y los controles positivos (Fig. 8). La detección de TMV se realizó mediante la RT-PCR, usando los iniciadores TMV/CPF y TMV/CPR (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2007) que amplifican un segmento de la proteína de la cápside. En las muestras problema analizadas no se observó el producto de amplificación esperado (250 pb), solo en el caso de los controles positivos (Fig. 9). Este resultado indica que el virus de las muestras analizadas no pertenece al *Tobacco mosaic virus*. El ensayo de la RT-PCR para miembros de la familia *Potyviridae*, solo se obtuvo el fragmento esperado de 1.7 Kb con los iniciadores reportados por Chen *et al.* (2001) para el control positivo correspondiente a una muestra infectada con *Potato virus Y*, resultando negativo para las muestras problema (Fig. 10). De manera similar a lo antes expuesto, en el caso de la detección de especies de *Potexvirus*, solamente hubo amplificación del fragmento esperado (600 pb) en el testigo positivo (planta infectada con PapMV), no así para las muestras problema (Fig. 11). El hecho de que las muestras que presentaban síntomas típicos causados por virus y no se haya detectado la presencia de TMV, miembros de la familia *Potyviridae* o especies de *Potexvirus*, a pesar de que estos virus se encuentran reportados para nopal en México, sugiere que el virus asociado al síndrome de engrosamiento y mosaico en nopal tunero es un género diferente a los que se encuentran reportados hasta la fecha en nopal.

## DISCUSIÓN

Los síntomas obtenidos en la transmisión mecánica de las plantas indicadoras a partir de tejido de cladodio con engrosamiento y mosaico, permitieron establecer que no se trataba de TMV, ya que éste induce lesiones locales y mosaico sistémico en *Nicotiana tabacum* var. Xanthi (Astier *et al.*, 2006; Himmel, 2003) y en el presente estudio solo se obtuvieron lesiones locales anulares necróticas. De la Torre-Almaraz *et al.* (2007) reportan la presencia de una variante de TMV en nopal tunero, causando lesiones locales necróticas en *Nicotiana benthamiana* y *N. rustica*, mosaicos tenues en las hojas inoculadas de *N. tabacum* var. White Burley y *Capsicum annum* y sin síntomas en *Chenopodium quinoa*. Los cuales difieren a los obtenidos en el presente estudio, particularmente en el caso de *N. benthamiana*, donde se observó mosaico, lesiones locales cloróticas en *Chenopodium quinoa*, ningún síntoma en *N. rustica*, y únicamente lesiones locales anulares en *Nicotiana tabacum* var. Xanthi. Por otra parte, la familia *Potyviridae* contiene el mayor número de virus que infectan plantas (Kraus *et al.*, 2010), constituyendo desde el punto de vista económico el más importante grupo de virus fitopatógenos (Zerbini y Zambolim, 1999). Entre las plantas diferenciales que reaccionan a varios miembros del género potyvirus, se encuentra *Chenopodium. quinoa*, *C. amaranticolor* con lesiones locales necróticas, y *Capsicum annunm* con una necrosis inicial y posteriormente síntomas sistémicos en las hojas (Valenzuela *et al.*, 2003). Se tienen reportes de que virus del género *Potexvirus*, que tiene varias especies infectando nopal como el *Cactus virus X* (CXV) provoca lesiones locales cloróticas en *C. quinoa* y *C. amaranticolor*; y sin síntomas en *Datura stramonium* y *Nicotiana glutinosa* (Lastra *et al.*, 1976); otro potexvirus, es el *Zygocactus virus X* (ZXV), que causa mosaico sistémico en *Atriplex hastata* y lesiones locales necróticas y mosaico sistémico en *Chenopodium quinoa* (Brunt *et al.*, 1996). Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el virus asociado al engrosamiento del cladodio del nopal, no es tampoco algún género de la familia *Potyviridae* o especie del género *Potexvirus*. Diferentes estudios de microscopía indican que los tobamovirus son cilindros rígidos elongados de 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro, mientras que para los potyvirus su morfología se agrupa en filamentos virales flexibles con dimensiones de 680 nm-900 nm por 11-15 nm (Wei *et al.*, 2010); todos los potexvirus son morfológicamente similares, con filamentos flexuosos que miden de 470 hasta 580 nm de longitud y 13 nm de diámetro (AbouHaidar *et al.*, 1998). La partícula viral obtenida de cladodios de nopal con



síntomas de engrosamiento y mosaico fue en forma de varilla flexible (filamento flexible) con una media modal de 900-1700 nm de longitud. Basados en las diferencias en morfología y longitud de la partícula viral observada al microscopio electrónico, el virus bajo estudio es diferente a TMV, géneros de la familia *Potviridae* o especies de *Potexvirus* con los que se comparó. El RNA bc de varios miembros de tobamovirus, potyvirus y potexvirus se describieron y compararon en un estudio realizado por Valverde *et al.* (1986) para la evaluación del uso potencial en el diagnóstico de estos virus. Se detectó en plantas infectadas con tobamovirus (TMV-type y TMV-U5) una banda de RNA bc de alto peso molecular ( $4.3 \times 10^6$  D) y dos bandas en común con mayor movilidad de  $2.1 \times 10^6$  y  $0.42 \times 10^6$  D. Para varios miembros del género potyvirus (uno de ellos fue *Potato virus Y*), se obtuvo una banda de  $6.5 \times 10^6$ ; además patrones similares del RNA bc entre los potexvirus analizados (*Potato virus X* y *Cactus virus X*) evidenciaron un patrón de las formas replicativas con peso molecular de  $5 \times 10^6$  y  $4.6 \times 10^6$  D. Estos patrones electroforéticos, no son similares a los obtenidos en esta investigación, ya que se obtuvo tres bandas de RNA bc ( $4.2 \times 10^{16}$ ,  $1.5 \times 10^{16}$  D) para el virus asociado al engrosamiento del cladodio, esto indicó que el virus de nopal quizás no se encuentra reportado para el cultivo. Considerando que en el análisis realizado para la amplificación del gen endógeno constitutivo GAPDH, todos los cDNA's de las muestras problema amplificaron, indicando certeza de que en la RT-PCR no existían inhibidores de la reacción, y que por lo tanto el virus analizado en este estudio no se trataba de TMV, géneros de la familia *Potviridae* o especies del género *Potexvirus*, ya que se comparó con este gen endógeno de referencia que es estable y que presenta eficiencia de amplificación similar al gen problema (Lewin, 1996).

## **CONCLUSIONES**

Por el análisis del RNA bicatenario (RNA bc), transmisión mecánica a plantas indicadoras, microscopía electrónica y la técnica molecular de RT-PCR utilizadas en este trabajo, se evidenció la presencia de un virus fitopatógeno asociado al engrosamiento del cladido, no obstante este no corresponde al género *Tobamovirus*, *Potyvirus* o *Potexvirus*, los cuales son reportados frecuentemente en nopal. Por lo tanto, es probable que este virus, aun no se encuentre reportado para este cultivo.

## LITERATURA CITADA

- AbouHaidar MG, Xu H, and Hefferon KL. 1998. Plant Virology Protocols. Methods in Molecular Biology 81:131-143.
- Anderson E. 1960. The evolution of domestication. pp. 67-83. In: S. Tax (eds.). The evolution of man. Chicago University Press. 284 p.
- Anderson EF. 2001. The cactus family. Vol. I. Editorial Timber Press, Portland, USA. 776 p.
- Astier S, Albouy J, Maury Y, Robaglia C, Lecoq H. 2006. Principles of plant virology, genome pathogenicity, virus ecology. First edition. Science Publisher. 472 p.
- Attothom S, Weathers LG and Gumpf DJ. 1978. Identification and characterization of a potexvirus from California barrel cactus. Phytopathology 68:1401-1406.
- Barbera G. 1995. History, economic and agroecological importance. pp.1-11. In: G. Barbera, P. Inglese, E.B. Pimienta, and E.J. Arias (eds.). Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO, Roma, Italy. 280 p.
- Borrego EF, y Burgos N. 1986. El Nopal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, México. pp.7 y 85.
- Brunt AAK, Cabtree MJ, Dallwitz AJ, Gibbs JW. 1996. Viruses of plant. Description and list from the (VIDE) data base (AL) international. CAB International. Cambridge, Massachussets, USA. 1484 p.
- Chen J, Chen J and Adams MJ. 2001. A universal PCR primer to detect members of the *Potyviridae* and its use to examine the taxonomic status of several members of the family. Archives of Virology 146:757-766.
- Colariccio A, Eiras M, Vicente M, Chagas CM, Harakava R.1996. Caracterização parcial de umisolado do vírus do mosaico do pepino de *Musa* sp. "nanição". Fitopatologia Brasileira 21:268-274.
- Conti M, Gallitelli D, Lisa V, Lovisolo O, Martelli GP, Ragozzino A, Rana GL, Vovlas C. 2001. Principales virus de las plantas hortícolas. Ediciones Mundi Prensa. Barcelona, España. 206 p.

- Corrales GJ, y Flores VC. 2003. Nopalitos y tunas. Producción, comercialización, poscosecha e industrialización. CIESTAAM, Programa de nopal. Universidad Autónoma Chapingo.
- Curtis JR. 1977. The development of commercial prickly pear farming in the Santa Clara Valley, California. *Cactus and Succulent Journal* 47:35-37.
- De La Torre Almaraz R, Salazar Segura M y Ruiz Medrano R. 2007. Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41:763-773
- Dodds JA, Morris TJ and Jordan RL. 1984. Plant Viral Double-Stranded RNA. *Annual Review of Phytopathology* 22:151-168.
- FAO, 1995. Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. Food and Agriculture Organization (FAO). Rome, Italy. In: <http://postharvest.ucdavis.edu/datastorefiles/234-576.pdf> (Consulta, noviembre 2011).
- Felker P, Bunch R, Russo G and Tani JA. 2009. Progreso en la identificación del agente causal de Engrosamiento del cladodio o macho. In: *Producción y aprovechamiento del Nopal*. 467 p.
- Fernández-Herrera E. 2011. Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile CM-334 resistente a *Phytophthora capsici* e infectado por *Nacobbus aberrans*. Tesis de doctorado en ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, México. 84 p.
- Giri L and Chessin M. 1975. A severe strain of tobacco mosaic virus from cactus. *Phytopathology* 65:824-825.
- Gutiérrez VC, Ruiz R, Piedra E y De La Torre R. 2004. Caracterización de una variante del virus mosaico del pepino (CMV) asociada con los síntomas de moteado amarillo de la azucena (*Hippeastrum x hybridum* Leopoldii) en México. *Agrociencia* 38:343-354.
- Guzmán U, Arias S, Dávila P. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 315 p.

- Hausbeck MK, and Gildow FE. 1991. First report of *Tomato spotted wilt virus* on Thanksgiving cactus. *Plant Disease* 75:215.
- Himmel PT. 2003. Tobacco mosaic virus. *Compendium of pepper diseases*. APS Press. Pág. 38-39.
- International Committee on Taxonomy of viruses (ICTV). 2005. *Virus Taxonomy*. C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball (eds). pp.821 y 1091. Elsevier Academic Press. San Diego, California, USA. 1259p.
- Kraus J, Cleveland S, Putnam ML, Keller KE, Martin RR and Tzanetakis IE. 2010. A new Potyvirus sp. infects verbena exhibiting leaf mottling symptoms. *Plant Disease* 94:1132-1136.
- Lastra JR, Gaskin D, De Uzcátegui RC. 1976. Virus X del Cactus en Venezuela. *Agronomía Tropical* 26:303-310.
- Lewin B. 1996. *Genes IV*. 2ª. Edición. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España. 1121 p.
- Milbrath MG and Nelson MR. 1972. Isolation and characterization of a virus from saguaro cactus. *Phytopathology* 62:739-742.
- Nerd A and Mizrahi Y. 1993. Modern cultivation of prickly pear in Israel: fertigation. *Acta Horticulturae* 349:235-237.
- Pimienta BE. 1997. El nopal en México y el mundo. In: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. *Cactáceas, Suculentas Mexicanas*. CVS Publicaciones, México, D.F. 87-95 p.
- Pimienta BE 1990. *El nopal tunero*. Primera edición. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara, Jalisco, México. 246 p.
- Rebman JP and Pinkava DJ. 2001. *Opuntia cacti of North America-An overview*. Florida Entomologist 84:474-483.
- Sáenz C. 2006. *Utilización Agroindustrial del Nopal*. Servicio de Tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria (AGST) con la colaboración de la Red Internacional de Cooperación Técnica del Nopal (FAO-CACTUSNET). Roma, Italia.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2009. *Producción Agrícola, cíclicos perennes de nopalitos*. In: <http://www.siap.gob.mx/>. (Consulta: agosto 2011).

- Sudzuki F, Muñoz C and Berger H. 1993. El Cultivo de la Tuna (Cactus Pear). Universidad de Chile, Santiago. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. 88 p.
- Valenzuela-Herrera V, Redondo-Juárez E y Bujanos-Muñiz R. 2003. Detección de virus por serología y plantas indicadoras en el tubérculo-semilla y plantas de cultivo de meristemos en papa (*Solanum tuberosum* L.) var. Alfa. Revista Mexicana de Fitopatología 21:176-180.
- Valverde RA, Dodds JA and Heick JA. 1986. Double-stranded ribonucleic acid from plants infected with viruses having elongated particles and undivided genomes. Phytopathology 76:459-465.
- Van der Vlugt RAA and Berendsen M. 2002. Development of a general potyvirus detection method. European Journal of Plant Pathology 108:367-371.
- Wei T, Zhang C, Hong J, Xiong R, Kasschau KD. 2010. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. PLoS Pathogens 6:e1000962.
- Wessels AB. 1988. Spineless Prickly Pear. First Perskor Publishers, Johannesburg. Cape Town, South Africa. Luxor publications. 168-169 p.
- Zerbini FM and Zambolim EM. 1999. A familia Potyviridae. Revisão Anual de Patologia de Plantas 7:1-66.

**CAPITULO II. DETECCIÓN MOLECULAR DE FITOPLASMAS EN NOPAL  
TUNERO (*Opuntia ficus-indica* Mill) CON SÍNTOMAS DE ENGROSAMIENTO DEL  
CLADODIO**

**Alba Suaste-Dzul, Reyna Rojas-Martínez, Emma Zavaleta-Mejía,** Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Fitosanidad-Fitopatología, Montecillo, Estado de México, CP 56230 México, y **Daisy Pérez-Brito,** Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., Laboratorio GeMBio, Colonia Chuburná de Hidalgo, Mérida, Yucatán, CP 97200 México. Correspondencia: rojas@colpos.mx

**Resumen**

Durante 2010 se detectaron en la zona tunera de Nopaltepec, Estado de México, plantas de nopal con síntomas de deformación y engrosamiento del cladodio, mosaico, amarillamiento, proliferación y deformación de frutos en toda la planta o en parte de ella. Dado que el síndrome se ha atribuido a la infección por fitoplasmas, el objetivo de esta investigación fue detectar mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la presencia de fitoplasmas en diferentes estratos del cladodio y raíz de plantas de nopal. El DNA extraído de las muestras de plantas con síntomas y asintomáticos, se amplificó primero con los iniciadores universales P1/P7 y P1/Tint, y posteriormente mediante PCR anidada utilizando los iniciadores R16F2/R16R2, se obtuvo un fragmento de 1 200 pb. El análisis de los patrones de restricción generados con endonucleasas reveló que el fitoplasma pertenece al grupo 16SrXIII-Mexican periwinkle virescence.

**Palabras clave adicionales:** *Mollicutes*, PCR anidada, RFLP-PCR, gen 16S rRNA.

**Abstract**

During 2010 were detected in the Nopaltepec, Mexico, cactus plants with symptoms of distortion and thickening of the cladode, mosaic, yellowing, proliferation and deformation of fruits in the whole plant or part of it. Since the syndrome has been attributed to phytoplasma infection, the aim of this study was detected by Chain Reaction (PCR), the presence of phytoplasmas in different strata of the cladode and the roots of cactus plants. The DNA extracted from cladodes with symptoms and asymptomatic, was amplified first with universal primers P1/P7, and P1/Tint, fragment of phytoplasma 16S rRNA gene, followed by nested PCR using the primers R16F2/R16R2, a fragment of 1 200 bp was obtained. Analysis of restriction patterns generated with endonucleases revealed that the phytoplasma belongs to the Mexican periwinkle virescence-16SrXIII.

**Additional Keywords:** *Mollicutes*, Nested PCR, RFLP-PCR, 16S rRNA gene.



## INTRODUCCIÓN

Los fitoplasmas son organismos procariontes sin pared celular, Gram positivos, que se encuentran agrupados en la clase *Mollicutes* (Bertaccini *et al.*, 1999; Hogenhout y Segura, 2010). Hasta el momento no se ha logrado su cultivo *in vitro* por lo que su detección, identificación y clasificación se ha realizado mediante el uso de técnicas moleculares como PCR y RFLP (Hodgetts *et al.*, 2007). Los fitoplasmas se han asociado con más de 700 enfermedades de importancia económica en plantas hortícolas, forrajeras, ornamentales y silvestres (Weintraub y Beanland, 2006). En diferentes partes del mundo como Estados Unidos, Italia, China y Líbano se ha reportado la presencia de fitoplasmas en cactáceas (Choueiri *et al.*, 2005; Tessitori *et al.*, 2005; Bertaccini *et al.*, 2007; Cai *et al.*, 2008). En México, algunas ornamentales de *Opuntia* sp. en las que se han detectado fitoplasmas presentan características anatómicas inusuales como son proliferación de brotes, tallos amarillos, mosaicos y coloraciones púrpuras, alteraciones que les confieren un valor económico adicional pues son ofrecidas en altos precios a coleccionistas de cactus en diversos viveros comerciales (Aviña-Padilla *et al.*, 2009). En la zona de San Martín de la Pirámides, Edo. de México, en el cultivo de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica* Mill) se ha reportado una enfermedad conocida como “planta macho” atribuida a la presencia de fitoplasmas (Hernández-Pérez *et al.*, 2009), en los últimos años se le ha considerado como el principal factor limitante de la producción de tunas en el país, ya que las plantas afectadas presentan deformación, proliferación de brotes, engrosamiento y desarrollo de cordiforme del cladodio y detención del crecimiento. En el municipio de Nopaltepec, Estado de México, se observaron en plantas de nopal tunero síntomas que pudieran estar asociados a la presencia de fitoplasmas, como engrosamiento, mosaico, amarillamiento en cladodios, proliferación y deformación de frutos. Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue detectar mediante PCR la presencia de fitoplasmas en nopal tunero con el síndrome descrito.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal**

En una huerta comercial de nopal perteneciente a la comunidad de San Felipe Teotitlán, se colectaron cladodios con síntomas de engrosamiento, amarillamiento, mosaico, proliferación y deformación de frutos, así como de cladodios asintomáticos (Fig. 12). Se colectó un total de 35 cladodios en los meses de enero y julio de 2011, éstos se embebieron en Radix 10 000 ® (ácido indol-3-butírico 10 000 ppm) y se sembraron en macetas con suelo estéril. Las macetas se mantuvieron en el invernadero

### **Extracción del ADN**

Para la extracción de ADN se tomó tejido de la parte superior, media y basal de cada uno de los 35 cladodios colectados con síntomas de engrosamiento, proliferación, deformación de frutos y manchas anulares. De las plantas mantenidas en invernadero se tomó tejido radical para llevar a cabo la extracción de ADN.

El ADN se extrajo con el producto DNeasy Mini Kit (QIAGEN®) de la siguiente manera: se pesaron 30-40 mg de tejido y se maceraron con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino sin dejar que la muestra se descongelara. Se añadió al tejido macerado 400 µL de buffer de extracción AP1 y se incubó a 65 °C en baño maría (Wheaton Rotary Vacuum Evaporator NE-1) por 10 min con homogenización ocasional. Enseguida se agregaron 130 µL de buffer AP2 y se incubó durante 5 min en hielo, se centrifugó por 5 min a 14 000 rpm en una centrifuga Silent SPIN (Continental Lab Products), el sobrenadante se transfirió a una columna de color lila (QIA shredder Mini Spin), y se volvió a centrifugar a 14 000 rpm durante 2 min. El nuevo sobrenadante se colocó en un tubo eppendorf estéril. Enseguida se agregaron 1.5 V del buffer AP3 y se transfirió a la columna DNeasy Mini Spin, centrifugándose por 1 min a 8 000 rpm. Una vez capturado el ADN, la columna se lavó dos veces en 500 µL del buffer AW y se centrifugó por 2 min a 14 000 rpm. La columna se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 mL, se adicionaron 50 µL de buffer AE (previamente calentado a 65 °C), se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 8 000 rpm.

La determinación de la calidad e integridad del ADN se hizo a través de electroforesis en agarosa al 1% (p/v) en buffer TAE 1X (Tris acetato-EDTA) a 90 V por 40 min y la

cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1 000 V 3.2.1) según el método descrito por Sambrook *et al.* (1989).

### **Detección de fitoplasmas por PCR**

Para detectar la presencia de fitoplasmas en las muestras de nopal se realizó una doble amplificación por PCR. En la primera reacción (PCR directa) se utilizó el par de iniciadores universales P1 (Deng y Hiruki, 1991) y P7 (Schneider *et al.* 1995) que amplifican un fragmento de 1 800 pb, y la combinación de iniciadores P1/Tint (Smart *et al.* 1996) que amplifican un fragmento de 1 600 pb, en un volumen de reacción final de 25 µL, que contenía 1X de amortiguador para PCR (10x, 100 mM tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8.3) (Biogénica), 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Biogénica), 20 pmol de cada iniciador (Invitrogen®), 1 U de ADN polimerasa Amplificasa® (Biogénica) y 200 ng de ADN objetivo. La amplificación se realizó en un termociclador Techne® TC-300, con un primer paso de desnaturalización a 94°C por 5 min, seguido por 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1.5 min a 54°C y 2 min a 72°C, y un paso final de extensión de 10 min a 72°C.

Para aumentar la sensibilidad de detección, se realizó la segunda amplificación (PCR anidada) con los iniciadores R16F2/R16R2 (Gundersen y Lee, 1996) que amplifican la región 16S rDNA de los fitoplasmas, se utilizó como molde el ADN del producto de amplificación de la primera reacción de PCR, diluido en agua destilada estéril [1:20 (v/v)] empleándose las mismas concentraciones y reactivos que en la PCR directa. La amplificación se desarrolló en un termociclador Techne® TC-300, iniciando con una desnaturalización de 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 30 s, 1.5 min a 53 °C y 72 °C durante 1.5 min, y un paso final de 10 min a 72 °C. Los productos de amplificación obtenidos (1 200 pb) se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (p/v) en amortiguador TAE 1X a 100 V por 50 min, previamente teñido en bromuro de etidio. El marcador de peso molecular empleado como referencia fue de 100 pb (Roche©). Las imágenes del gel se visualizaron y analizaron con luz ultravioleta en un fotodocumentador UV (Bio Rad©, Gel Doc 2000) con el programa QuantityOne 4.1.1. En todos los casos se utilizó como control positivo ADN de coco infectado con el fitoplasma del Amarillamiento Letal del Cocotero (ALC). Como control negativo se utilizó agua bidestilada estéril libre de DNAsas y RNAsas.

### **RFLP-PCR**

Para determinar el grupo al cual pertenece el fitoplasma detectado, el fragmento amplificado se sometió a un análisis de RFLP. El fragmento se digirió con las endonucleasas de restricción *AluI*, *HaeII*, *HaeIII*, *KpnI*, *Tru91* y *Tsp5091* (Promega® Madison WI, USA) y los productos de restricción se separaron en geles de agarosa 1.5 % teñidos con bromuro de etidio. Los patrones de RFLP obtenidos se compararon con los reportados en la literatura (Lee *et al.*, 1998).

### **Secuenciación y análisis del gen 16 S rDNA**

El producto de PCR anidada se purificó (Wizard Promega®) y secuenció (Automatic Sequencer 3700xl DNA Analyzer, Applied Biosystem®). Las secuencias del 16S rADN obtenidas se compararon con las de referencia en el GenBank, usando la herramienta BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

## RESULTADOS

El ADN genómico total de las 35 muestras procesadas mostró buena integridad y calidad con una concentración varió de 300 hasta 900 ng/ $\mu$ L, lo cual puede considerarse un excelente rendimiento si se tiene en cuenta que la planta de nopal posee grandes cantidades de carbohidratos, compuestos hidrofílicos y mucílago que dificultan la extracción de los ácidos nucleicos (Nobel *et al.*, 1992) (Fig. 13). Los niveles de pureza tuvieron una absorbancia de 1.7 a 2.0, indicando presencia mínima de polisacáridos, fenoles y taninos, que dificultan la extracción de ADN de calidad e inhiben la reacción de PCR (Tapia-Tussell *et al.*, 2005). En las muestras provenientes de los diferentes estratos (superior, medio y basal) de los 35 cladodios sintomáticos y asintomáticos no se logró detectar la presencia de fitoplasmas, la detección fue positiva solamente en las muestras de raíces de plantas de nopal.

En la primera reacción de PCR con los iniciadores P1/P7, se observó el producto de amplificación de 1 800 pb en el positivo y sólo en algunas de las muestras analizadas (Fig. 14). Con el par de iniciadores P1/Tint, el producto de amplificación esperado de 1 600 pb siempre se obtuvo tanto en las muestras de tejido radical de plantas enfermas como en el control positivo del amarillamiento letal del cocotero (ALC) (Fig. 15). En la Fig. 16, se observan fragmentos de 1 200 pb obtenidos con PCR anidada que se reportan para establecer la presencia de fitoplasmas sp. (Líneas 1-8, y 10-13), en esta última se ubicó el control positivo para ALC (línea 13). De las 35 muestras de nopal analizadas por PCR anidada en este estudio, 34 resultaron positivas a fitoplasmas sp. (Cuadro 3). La comparación de la secuencia de nucleótidos del fragmento amplificado con las reportadas en la base de datos del GenBank indicó que el genoma amplificado corresponde a un fitoplasma. El análisis de RFLP obtenidos con las endonucleasas de restricción *HaeIII*, *KpnI* y *MseI* (*TrU91*), indicó el fitoplasma pertenece al grupo 16SrXIII (Mexican periwinkle virescence) (Lee *et al.*, 1998) (Fig. 17).

## DISCUSIÓN

Los síntomas de engrosamiento, proliferación y deformación de frutos han sido asociados a la presencia de fitoplasmas (Bertaccini *et al.*, 2007; Hernández-Pérez *et al.*, 2009); sin embargo, en las plantas colectadas en la zona tunera de Nopaltepec, Edo. de México, también detectamos la presencia de virus en muestras de nopal con mosaico y amarillamiento (datos no publicados). Lo anterior indica que el síndrome observado puede ser producto de la coinfección de las plantas de nopal por virus y fitoplasmas, de ahí que el diagnóstico basado solamente en síntomas puede ser impreciso.

Es bien conocido que los fitoplasmas se encuentran en tejido del floema de la planta y con frecuencia en muy bajos títulos (Lee *et al.*, 1995; Wei *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2002) por lo que en muchas ocasiones veces no se pueden detectar en la primera PCR, en nuestro caso con el uso del par de iniciadores P1/Tint se logró amplificar siempre el genoma del fitoplasma en la PCR directa. La detección errática en la primera reacción de amplificación, posiblemente se debió a que el fitoplasma se encontraba en muy baja concentración (Hodgetts *et al.*, 2007). En el caso de la muestra Np07 no se detectó la presencia del fitoplasma ni en la PCR directa ni en la PCR anidada a pesar de presentar el síntoma de engrosamiento, este hecho pudo deberse a la baja titularidad del patógeno en la planta. La dificultad para detectar al fitoplasma en los cladodios del nopal se puede explicar por la variación que existe en su distribución en la planta de acuerdo con la época del año la distribución de los mismos en la planta varía según la época del año. En el caso del declinamiento del peral (*Pear decline phytoplasma*) ocasionado por fitoplasmas se ha observado que éstos ya no se detectan en las partes aéreas de los árboles durante los meses de invierno debido a las bajas temperaturas y que perviven en las raíces nuevas para recolonizar el tallo y las ramas en la primavera siguiente. Este comportamiento se explica por la nula producción de nuevos elementos cribosos y la disminución considerable de la actividad de los elementos maduros durante el invierno (Errea *et al.*, 2002). También *Mulberry drawf phytoplasma* no se detectó durante el invierno en los órganos reproductores y las yemas de árboles de mora pero sí en las raíces (Jian *et al.*, 2004).

Es importante destacar que en las cuatro muestras de nopal asintomáticas también se encontraron fitoplasmas, por lo que es necesario emplear técnicas moleculares para la detección precisa y confiable de este patógeno, sobre todo durante el proceso de obtención de

material propagativo para el establecimiento de nuevas plantaciones. En campo la presencia de plantas asintomáticas puede tener implicaciones importantes en el progreso temporal y espacial de la enfermedad. En México se reportó por primera vez el síntoma de engrosamiento del cladodio y posteriormente también se encontró en Sudáfrica e Italia, sin que se conociera al agente causal (Pimienta, 1990); otros síntomas mostrados por las plantas afectadas incluían proliferación de flores, deformación y amarillamiento de cladodios jóvenes. Hernández-Pérez *et al.* (2009) reportaron que el fitoplasma asociado con el síndrome de engrosamiento y proliferación del nopal tunero en San Martín de las Pirámides, Estado de México, pertenece al grupo 16SrII, mientras que en la presente investigación la secuencia obtenida correspondió al grupo 16SrXIII; esto sugiere que más de un grupo de fitoplasmas puede estar asociado con esta enfermedad.

## **CONCLUSIONES**

En cladodios con síntomas de engrosamiento, proliferación, mosaico y amarillamiento provenientes del municipio de Nopaltepec, Edo. de México, se detectó consistentemente la presencia de un fitoplasma del grupo 16SrXIII.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgar beca al primer autor del artículo durante los estudios de maestría.



## LITERATURA CITADA

- Aviña-Padilla K, Parra-Cota F, Ochoa-Sánchez JC, Perales-Segovia C, Martínez-Soriano JP. 2009. Phytoplasmas associated to diseases of ornamental cacti in Mexico. *Journal of Biological Sciences* 9:268-271.
- Bertaccini A, Calari A and Felker P. 2007. Developing a method for phyoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bulletin of Insectology* 60:257-258.
- Bertaccini A, Fránová J, Paltrinieri S, Martín M, Navrátil L, Nebesárova C and Simkova J. 1999. Leek proliferation: a new phytoplasma disease in the Czech Republic and Italy. *European Journal of Plant Pathology* 105:487-493.
- Cai H, Wei W, Davis RE, Chen H and Zhao Y. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* species: virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:1448-1457.
- Choueiri E, Massad R and Jreijiri F. 2005. First report of a 16SrII group phytoplasma associated with shoot proliferation of a cactus (*Opuntia monacantha*) in Lebanon. *Plant Disease* 89:1129-1129.
- Deng S and Hiruki C. 1991. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology* 81:1475-1479.
- Errea P, Aguelo V and Hormaza, JI. 2002. Seasonal variations in detection and transmission of pear decline phytoplasma. *Journal of Phytopathology* 150:439-443.
- Gundersen DE and Lee IM. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs. *Phytopathologia Mediterranea* 35:144-151.
- Harrison NA, Myrie W, Jones P, Carpioi ML, Castillo MM, Doyle M and Oropeza C. 2002. 16S rRNA interoplon sequence heterogeneity distinguishes strain populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Annals of the Applied Biology* 141:183-193.

- Hernández-Pérez R, Noa-Carrazana JC, Gaspar R, Mata P and Flores-Estévez N. 2009. Detection of phytoplasma on indian fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico central region. *OnLine Journal of Biological Sciences* 9:62-66.
- Hodgetts J, Ball T, Boonham N, Mumford R and Dickinson M. 2007. Use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants. *Plant Pathology* 56:357-365.
- Hogenhout SA and Segura M. 2010. Phytoplasma genomics, from sequencing to comparative and functional genomics-What have we learnt?.pp.19. In: P.G. Weintraub, and P. Jones (eds.). *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Vol. I. CAB International. Cambridge, Massachusetts, USA. 331 p.
- Jiang H, Wei W, Saiki T, Kawakita H, Watanabe K and Sato M. 2004. Distribution patterns of mulberry dwarf phytoplasma in reproductive organs, winter buds, and roots of mulberry trees. *Journal of General Plant Pathology* 70:168-173.
- Lee IM, Gundersen-Rindal D, Davis RE and Bartoszyk I. 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16s rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48:1153-1169.
- Lee IM, Bertaccini A, Vibio M and Gundersen DE. 1995. Detection of multiple phytoplasmas in perennial fruit trees with decline symptoms in Italy. *Phytopathology* 85:728-735.
- Lee IM, Martini M, Bottner KD, Dane RA, Black MC and Troxclair N. 2003. Ecological implications from a molecular analysis of phytoplasmas involved in an aster yellows epidemic in various crops in Texas. *Phytopathology* 93:1368-1377.
- NCBI, National Center for Biotechnology Information. 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Bethesda MD, USA. (Consulta, noviembre 2011.)
- Nobel PS, Cavelier J and Andrade J.L. 1992. Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *Journal of Experimental Botany* 43: 641-648.
- Pimienta BE 1990. *El nopal tunero*. Primera edición. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara, Jalisco, México. 246 p.
- Sambrook DJ, Fritsch EF and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Third edition. Vol. I. Cold spring harbor laboratory Press, New York, USA. 728 p.

- Schneider B, Seemüller E, Smart CD and Kirkpatrick BC. 1995. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. pp.369-379. In: S. Razin, and J.G. Tully (eds.). Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology. Vol. I. Academic Press, New York, USA. 483 p.
- Smart CD, Schneider B, Blomquist CL, Guerra LJ, Harrison NA, Ahrens U, Lorenz KH, Seemüller E and Kirkpatrick BC. 1996. Phytoplasma specific PCR primers based on sequence of the 16S-23S rRNA spacer region. Applied and Environmental Microbiology. 62:2988-2993.
- Tapia-Tussell R, Quijano-Ramayo A, Rojas-Herrera R, Larqué-Saavedra A y Pérez-Brito D. 2005. A fast, simple and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. Molecular Biotechnology 31:137-139.
- Tessitori M, Masenga V and Marzachi C. 2005. First report of a phytoplasma associated with abnormal proliferation of cladodes in cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) in Italy. Plant Disease, New Disease Reports 11:47.
- Wei W, Kawakita H and Sato M. 2000. Detection of a small population of mulberry dwarf (MD)-phytoplasmas in symptomless-mulberry trees by nested PCR. Journal of Sericultural Science of Japan 69:261-269.
- Weintraub PG and Beanland L. 2006. Insect vectors of phytoplasmas. Annual Review of Entomology 51:91-111.

## ANEXOS

**Cuadro 1.** Secuencia de oligonucleótidos utilizados en este estudio para la detección de tobamovirus, potyvirus y potexvirus en nopal.

Iniciadores	Secuencia de los iniciadores	Referencia
TMV/CPF <sub>(a)</sub>	5'-GCIYTIGGIAAYCARTTYCARACICARCA-3'	De La Torre-
TMV/CPR <sub>(b)</sub>	5'-IGCRTCIARIGTYTCIGCIGTIGTIGGRTT-3'	Almaraz <i>et al.</i> (2007)
M4T <sub>(c)</sub>	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC (T) <sub>15</sub> -3'	
Sprimer <sub>(d)</sub>	5'-GGXAAYAAAYAGYGGXCAZCC-3'	Chen <i>et al.</i> (2001)
M4 <sub>(e)</sub>	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'	
Potex-1RC <sub>(f)</sub>	5'-TCAGTRTTDGCRTCRAARGT-3'	Van der Vlugt y
Potex-2RC <sub>(g)</sub>	5'-AGCATRGCNSCRTCYTG-3'	Berendsen (2002)
Potex-5 <sub>(h)</sub>	5'-CAYCARCARGCMAARGAYGA-3'	
GLI-FW <sub>(i)</sub>	5'-GGCCTTATGACTACAGTTCCTCC-3'	Fernández-
GLI-RV <sub>(j)</sub>	5'-GACCAACCACAGAGACATCCACAG-3'	Herrera (2011)

**a-b.** Iniciadores empleados en la síntesis de DNAc y la detección de Tobamovirus. **c.** Iniciador empleado en la síntesis de DNAc para la reacción de Potyvirus. **d-e.** Iniciadores empleados en la detección de Potyvirus. **f.** Iniciador empleado en la síntesis de DNAc para la reacción de Potexvirus. **g-h.** Iniciadores empleados en la detección de Potexvirus. **i-j.** Iniciadores empleados en la verificación del DNAc con la amplificación del gen endógeno gliceraldehído.

**Cuadro 2.** Síntomas observados en las plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con macerado de epidermis de nopal con engrosamiento del cladodio.

<b>Hospedantes</b>	<b>Síntomas</b>	<b>Tiempo (ddi*)</b>	
		<b>Np16</b>	<b>Np26</b>
<i>Nicotiana tabacum</i> var. Xanthi	Lln	6	10
<i>N. glutinosa</i>	Lln	6	6
<i>N. clevelandii</i>	N/S	--	--
<i>Chenopodium quinoa</i>	Llc	6	7
<i>C. amaranticolor</i>	Llc	9	10
<i>N. occidentalis</i>	Llc	18	21
<i>N. rustica</i>	N/S	--	--
<i>N. benthamiana</i>	Mos	18	12
<i>Datura stramonium</i>	Lln	6	6

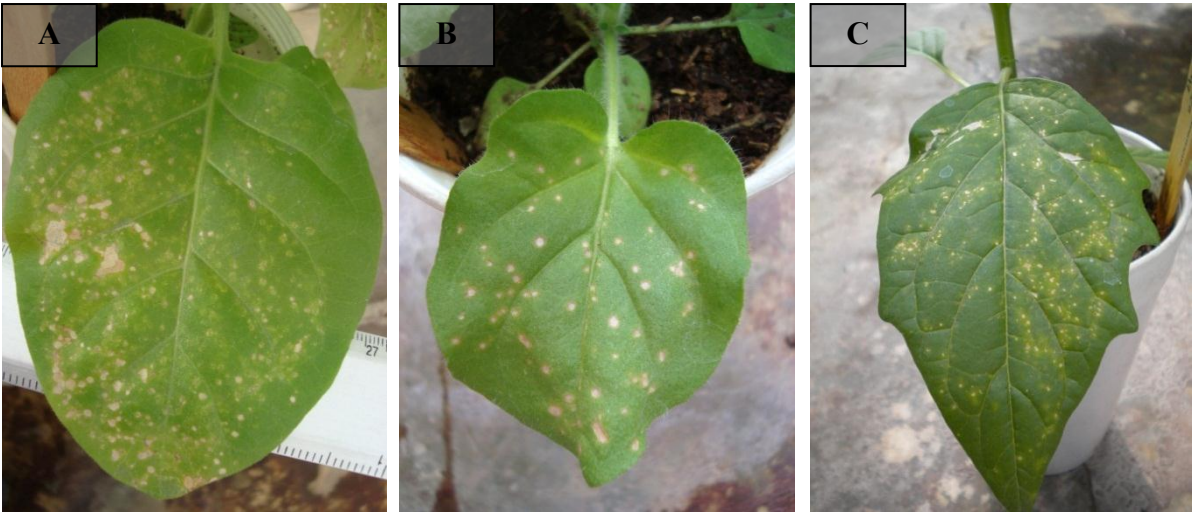
**\*ddi:** días después de la inoculación. **Lln:** lesiones locales necróticas; **Llc:** lesiones locales cloróticas; **Mos:** Mosaico; **N/S:** ningún síntoma.

**Cuadro 3.** Resultados de la detección de fitoplasmas en las 35 muestras de nopal tunero.

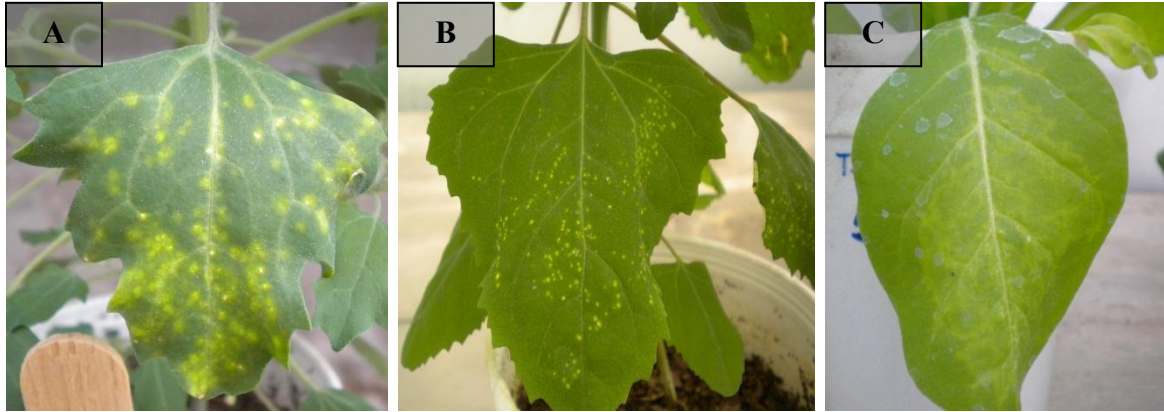
<b>Clave</b>	<b>Síntoma</b>	<b>Fitoplasma</b>
Np01	Engrosamiento	+
Np02	Asintomática	+
Np03	Asintomática	+
Np04	Asintomática	+
Np05	Proliferación	+
Np06	Proliferación	+
Np07	Engrosamiento	-
Np08	Engrosamiento y amarillamiento	+
Np09	Engrosamiento y mosaico	+
Np10	Mosaico y proliferación	+
Np11	Amarillamiento	+
Np12	Mosaico	+
Np13	Mosaico y deformación cladodio	+
Np14	Asintomática	+
Np15	Engrosamiento y mosaico	+
Np16	Engrosamiento y mosaico	+
Np17	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np18	Engrosamiento	+
Np19	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np20	Engrosamiento y mosaico	+
Np21	Amarillamiento	+
Np22	Mosaico	+
Np23	Engrosamiento y mosaico	+
Np24	Engrosamiento y mosaico	+
Np25	Mosaico	+
Np26	Mosaico	+
Np27	Engrosamiento y mosaico	+
Np28	Engrosamiento y deformación de frutos	+
Np29	Amarillamiento y deformación de frutos	+
Np30	Mosaico	+
Np31	Engrosamiento y amarillamiento	+
Np32	Engrosamiento y mosaico	+
Np33	Engrosamiento y mosaico	+
Np34	Mosaico y proliferación	+
Np35	Amarillamiento	+



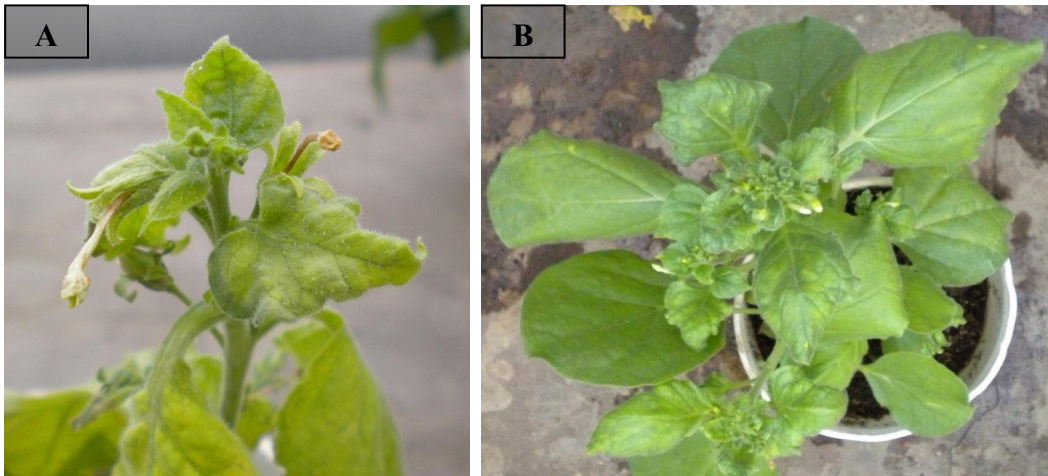
**Fig. 1.** Síntomas de **A)** mosaico, **B)** manchas cloróticas y **C)** engrosamiento y mosaico en el cladodios y fruto de nopal tunero, provenientes de la región de Nopaltepec, Estado de México.



**Figura 2.** Síntomas observados en plantas inoculadas mecánicamente con macerado de epidermis de nopal tunero. **A)** lesiones locales anulares en *Nicotiana tabacum* var. Xanthi; **B)** lesiones locales necróticas en *N. glutinosa* y **C)** *Datura stramonium*.

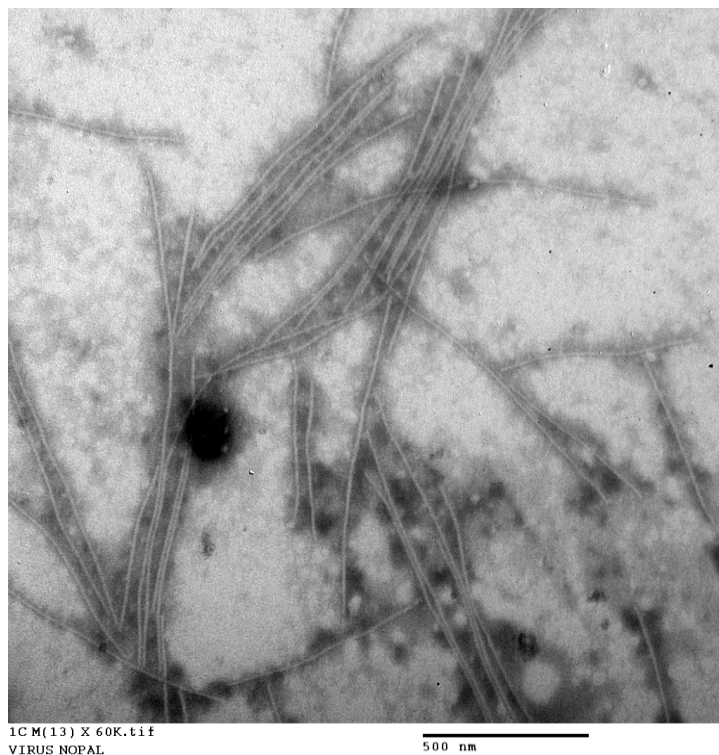


**Figura 3.** Síntomas observados en plantas inoculadas mecánicamente con macerado de epidermis de nopal tunero. **A)** Lesiones locales cloróticas en *Chenopodium quinoa*; **B)** *C. amaranticolor*; y **C)** *N. occidentale*.

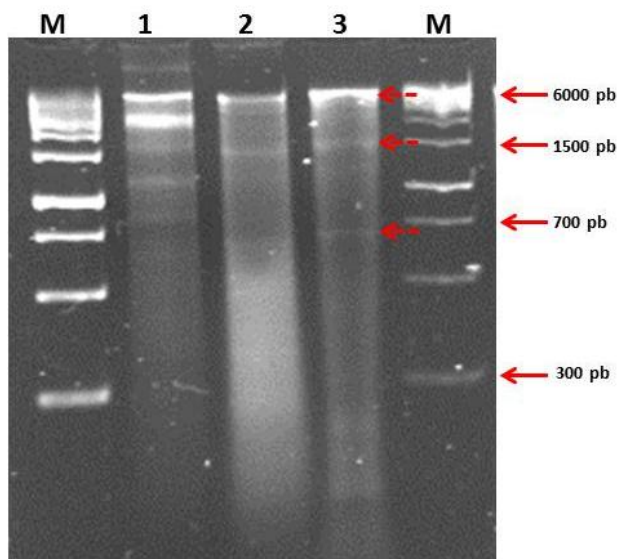


**Figura 4.** Síntomas observados en plantas inoculadas mecánicamente con macerado de epidermis de nopal tunero. **A) y B)** mosaico en *N. benthamiana*.

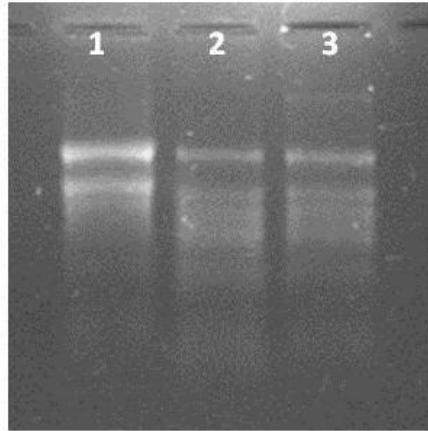




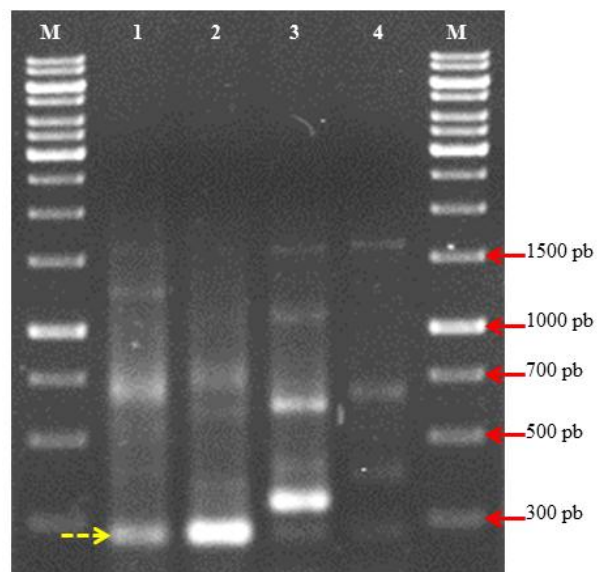
**Figura 5.** Partículas virales en forma de varilla flexible (950-1700 nm) del virus asociado a los síntomas de engrosamiento del cladodio y mosaico en nopal tunero.



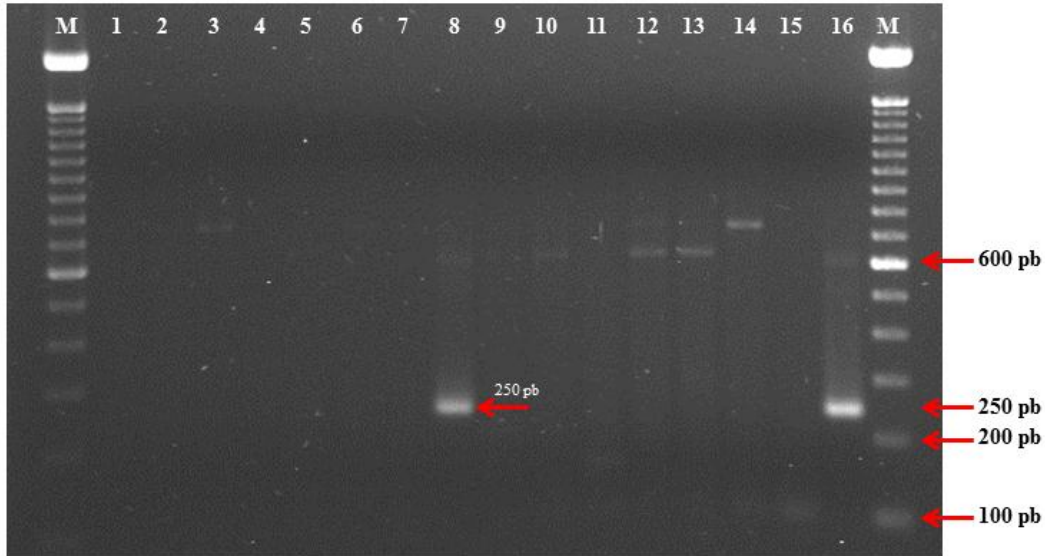
**Figura 6.** Patrón electroforético de RNA bc obtenido de plantas de *Nicotiana benthamiana* con mosaico inoculada con epidermis de nopal con mosaico y engrosamiento del cladodio. Línea M) Marcador molecular 1 Kb; 1) RNA bc sin digestión enzimática; 2) RNA bc tratado con DNAsa I; 3) RNA bc tratado con nucleasa S1.



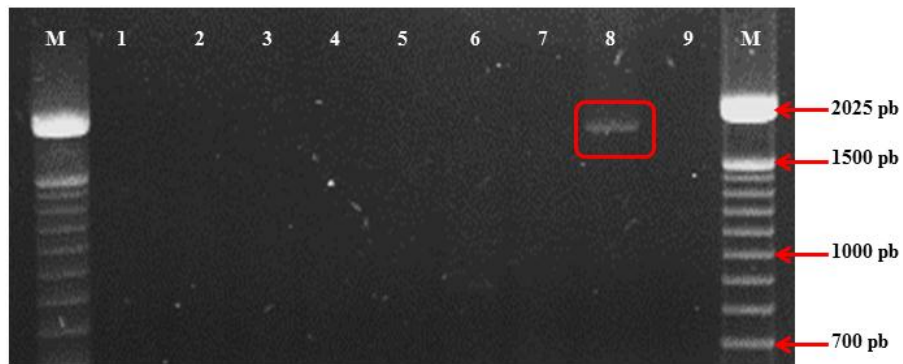
**Figura 7.** Electroforesis del RNA total obtenido de plantas diferenciales inoculadas con cladodios de nopal con síntomas de mosaico y engrosamiento del cladodio. Línea 1) *Chenopodium quinoa*; 2) *C. amaranticolor*; 3) *Nicotiana benthamiana*.



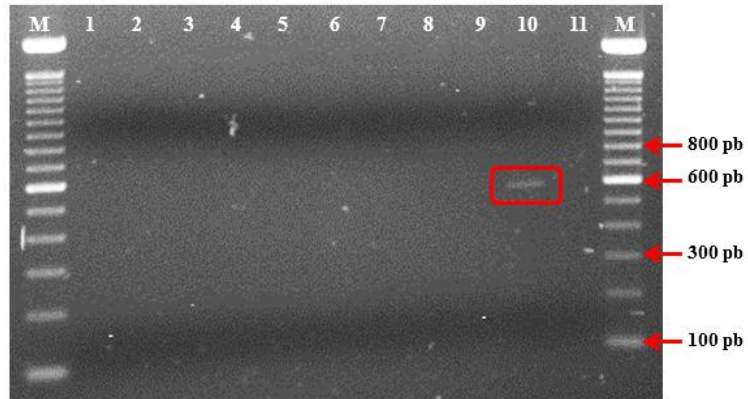
**Figura 8.** Electroforesis del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos para GAPDH.



**Figura 9.** Electroforesis del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos específicos para tobamovirus. Línea M) Marcador molecular de 100 pb; 1-7) plantas diferenciales con síntomas a partir de tejidos de nopal de la muestra Np16; 9-15) plantas diferenciales con síntomas separadas a partir de tejidos de nopal de la muestra Np26; 8 y 16) Control positivo *Tobacco mosaic virus*.

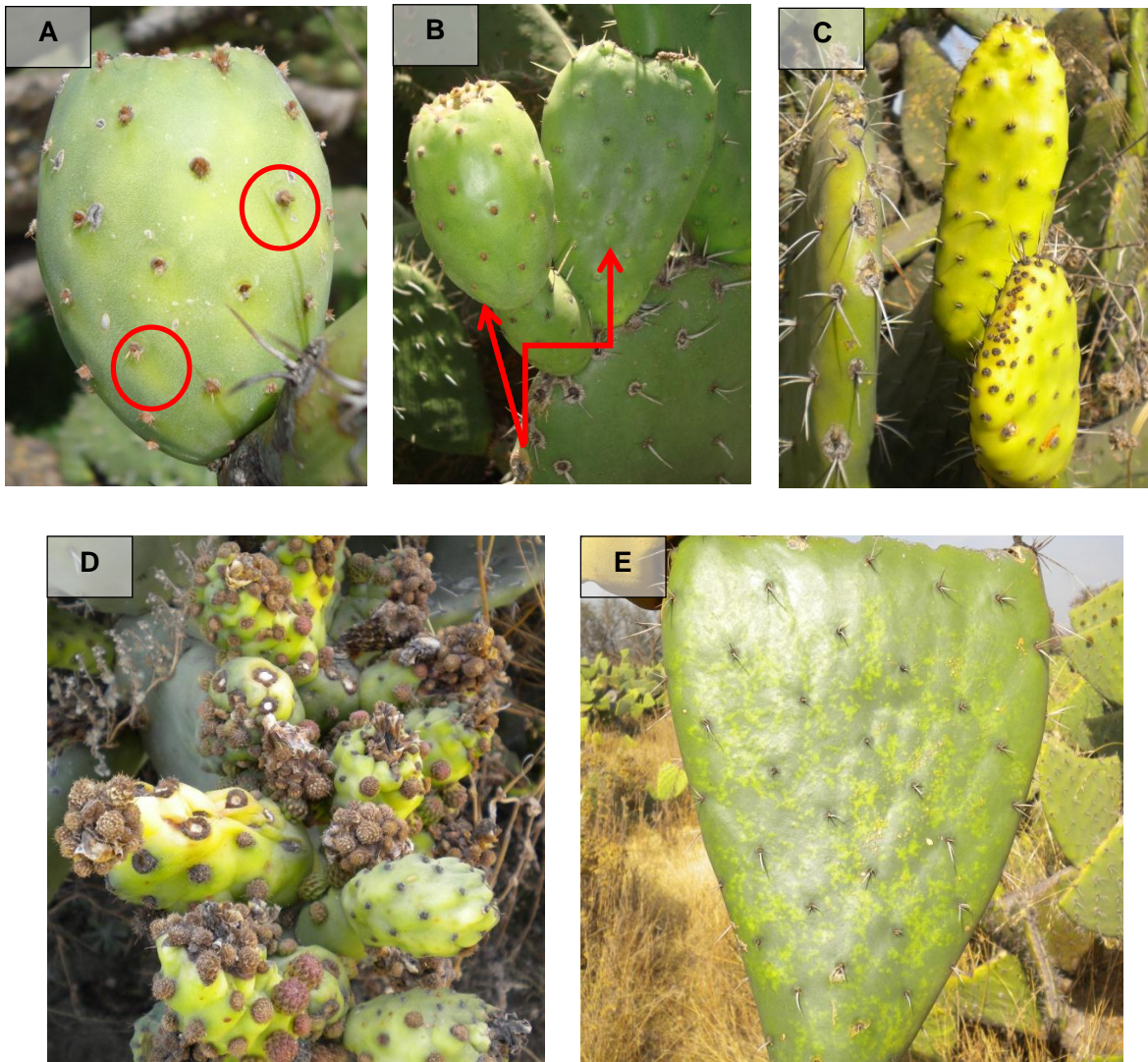


**Figura 10.** Electroforesis del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos universales para miembros de la familia *Potyviridae*. Línea M) Marcador molecular de 100 pb; 1-7) plantas indicadoras con síntomas a partir de tejidos de nopal de la muestra Np16; 8) control positivo *Potato virus Y*; 9) control negativo.

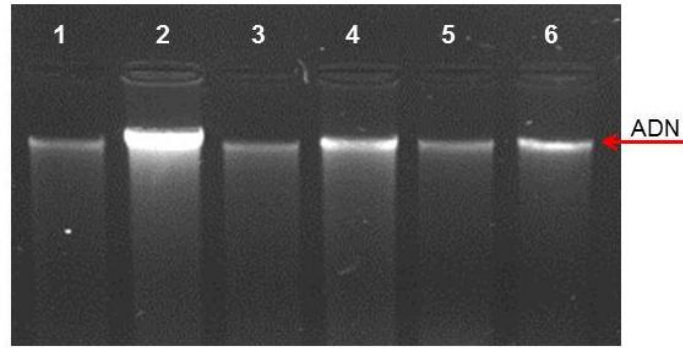


**Figura 11.** Electroforesis del producto de PCR obtenido con oligonucleótidos para *Potexvirus*. Línea M) Marcador molecular de 100 pb; 1-9) plantas indicadoras con síntomas a partir de tejidos de nopal de la muestra Np16 y Np26; 10) control positivo *Papaya Mosaic Virus*; 11) control negativo.

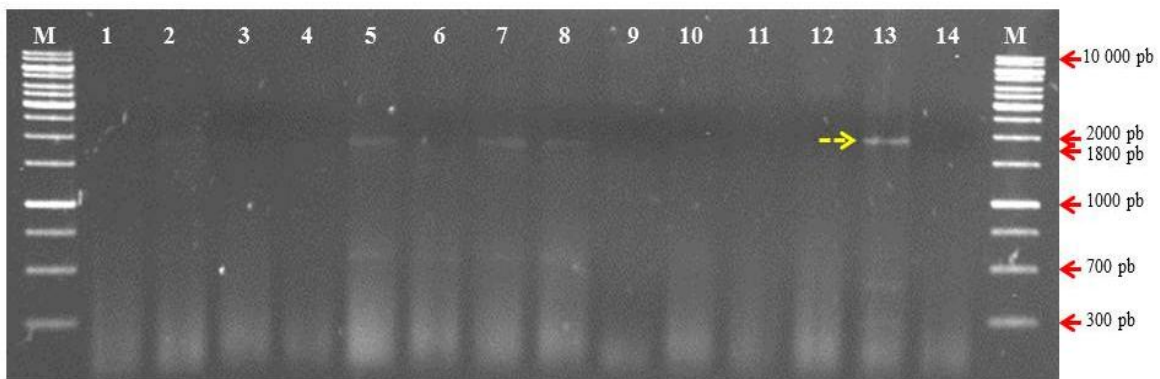




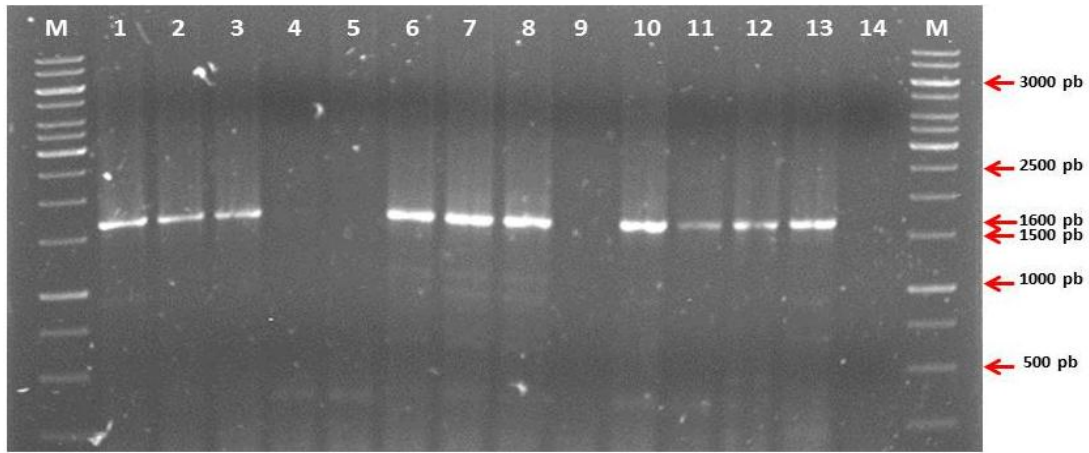
**Figura 12.** A) Síntomas de amarillamiento en fruto. B) Deformación del fruto y engrosamiento del cladodio. C) Amarillamiento del cladodio. D) Proliferación. E. Mosaico en cladodio de nopal tunero.



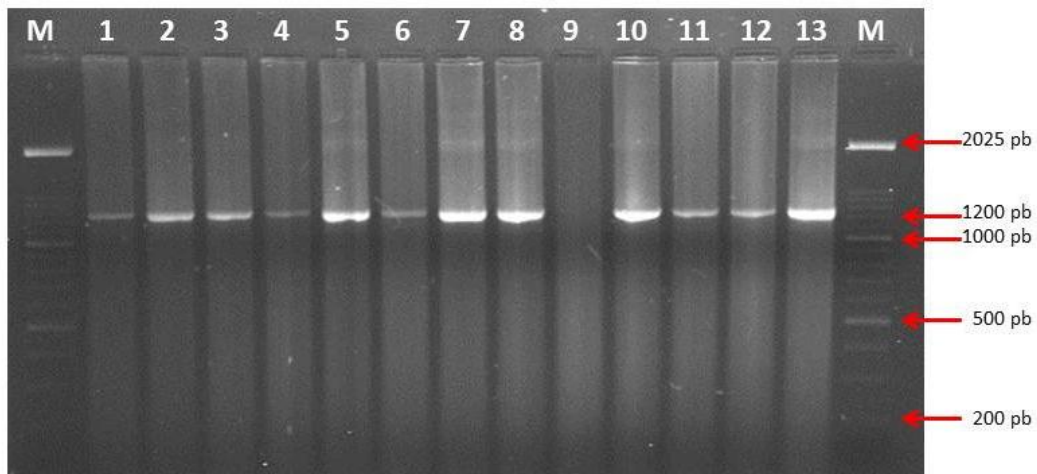
**Figura 13.** Extracción del ADN total visualizado en un gel al 0.8% de concentración de agarosa. Línea 1) Np01; 2) Np02; 3) 03; 4) Np04; 5) Np 05; 6) Np06.



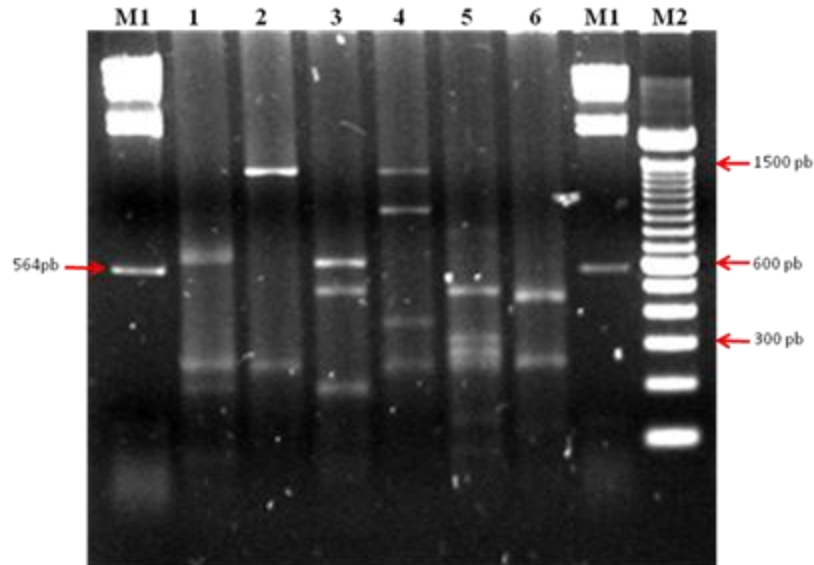
**Figura 14.** Productos de amplificación 1 800 pb, con los iniciadores P1/P7 para muestras de Nopaltepec, Edo. de México. Línea M) Marcador molecular 1 Kb; 1) Np01; 2) Np02; 3) Np03; 4) Np04; 5) Np05; 6) Np06; 7) Np07; 8) Np08; 9) Np09; 10) Np16; 11) Np17; 12) Np26; 13) control positivo ALC; 14) control negativo.



**Figura 15.** Productos de amplificación 1 600 pb, con los iniciadores P1/Tint para muestras de Nopaltepec, Edo. de México. Línea M) Marcador molecular 1 Kb; 1) Np01; 2) Np02;3) Np03; 4) Np04; 5) Np05; 6) Np06; 7) Np07; 8) Np08; 9) Np09; 10) Np16; 11) Np17; 12) Np26; 13) control positivo ALC; 14) control negativo.



**Figura 16.** Productos de amplificación de la PCR anidada con los iniciadores generales R16F2/R16R2, para algunas muestras de Nopaltepec, México. Línea M) Marcador molecular 100 pb; 1) Np01; 2)Np02;3)Np03; 4)Np04; 5)Np05; 6)Np06; 7) Np08; 8) Np09; 9) Np07; 10) Np16; 11) Np17; 12) Np26; 13) control positivo ALC.



**Figura 17.** Análisis de los patrones de restricción (RFLP-PCR) a partir de los productos de amplificación de la PCR anidada (R16F2/R16R2) para muestras de nopal tunero con síntomas de engrosamiento, mosaico, amarillamiento, proliferación y deformación de frutos del cladodio procedentes de Nopaltepec, Edo. de México. Los productos de PCR fueron digeridos con *AluI* (línea 1), *HaeII* (2), *HaeIII* (3), *KpnI* (4), *TrU91* (5), *Tps5091* (6). Línea M1: Marcador molecular Lambda DNA digerido con *HindIII*; M2) Marcador molecular 100 pb.