



COLEGIO DE POSGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

**Etiología del “Pinto” del Nopal en el Oriente del Estado
de México.**

Fidel Olmos Vilchis

T E S I S

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO.

2014

La presente tesis titulada “Etiología del Pinto del Nopal en el Oriente del Estado de México”. fue realizada por Fidel Olmos Vilchis bajo la dirección del consejo particular abajo indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CONSEJERO:

DR. DANIEL L. OCHOA MARTÍNEZ

ASESORA:

DRA. REYNA I. ROJAS MARTÍNEZ

ASESOR:

DR. SERGIO RAMÍREZ ROJAS

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Octubre de 2014.

DEDICATORIA

A mis padres **Manuel y Lorenza** por el apoyo incondicional, emocional y económico que siempre me brindaron durante el tiempo en mi estancia de la maestría, por su comprensión, gracias.

A mis hermanos que siempre creyeron en mí; **Jorge, Mari, Toño y Juan**

A mi esposa **Fabiola** que siempre ha estado conmigo en los momentos difíciles, gracias por contar contigo.

A mi hijo **Fidel Alexis** por ser una bendición del cielo en el momento que más lo necesitaba y llenar de alegría nuestras vidas.

Al Dr. Carlos Ortega Obregón (†) quien fue fundamental para que se llevara a cabo la investigación en la zona productora de nopal verdura de San Martín de las Pirámides.

A todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron para ser parte esencial de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

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

Al **Colegio de Postgraduados**, particularmente al programa de Fitosanidad-Fitopatología por complementar y fomentar mi desarrollo profesional y personal.

Al **Dr. Daniel L. Ochoa Martínez** por apoyarme en la realización de dicha tesis, así como formar parte de mi consejo particular.

A la **Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez** por formar parte de mi consejo, así como por haber revisado mi tesis y mi artículo.

Al **Dr. Carlos Ortega Obregón** por ayudarme a conseguir las muestras de mí trabajo y ser parte de mi consejo particular.

A los compañeros de laboratorio; **Moisés y Abimael**, al señor Ricardo por ayudarme en trabajos de invernadero.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
Índice de figuras.....	viii
Índice de cuadros.....	xi
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. I INTRODUCCIÓN	5
1.1 Engrosamiento de cladodios o chatilla.....	7
1.2 Pudriciones blandas.....	8
1.3 Mancha Negra.....	9
1.4 Mal de Oro.....	9
1.5 FITOPLASMAS	10
1.6 VIROSIS	11
1.7 LITERATURA CONSULTADA.....	16
2. II MATERIALES Y MÉTODOS	21
2.1 localización de la zona de estudio.....	21
2.2 Colecta de material vegetal.....	21

2.3 Colecta de suelo.....	23
2.4 Análisis fitosanitario para hongos y bacterias general.....	23
2.5 Extracción de RNA total.....	24
2.6 Purificación parcial del virus.....	25
2.7 Determinación de Rango de Hospedantes.....	27
2.8 Inoculación en cladodios asintomáticos.....	28
2.9 Inclusiones Virales.....	29
2.10 Microscopía electrónica.....	29
2.11 Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR).....	31
3 RESULTADOS	35
3.1 Análisis de suelo.....	35
3.2 Contenido nutrimental en tejido vegetal.....	38
3.3 Análisis fitosanitario para hongos y bacterias general.....	41
3.4 Extracción de RNA.....	42
3.5 Purificación parcial del virus.....	43
3.6 Determinación de rangos de hospedantes.....	44
3.7 Inoculación en cladodios sanos.....	48

3.8 Inclusiones virales.....	50
3.9 Microscopía electrónica.....	51
3.10 Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR).....	53
4. III DISCUSIÓN.....	56
5 IV. CONCLUSIONES.....	59
6 V. LITERATURA CONSULTADA.....	60
7.VI ANEXOS.....	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colecta de material vegetal y suelo. **A)** Invernadero donde se realizó la colecta de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) variedad “Atlixco”. **B)** Cladodio madre con brotes sintomáticos del “Pinto”. **C)** cladodio con halos cloróticos alrededor de las espinas. **D)** Bolsa con suelo colectado (mezcla compuesta) de la parcela comercial de cladodios con síntomas de “Pinto” y asintomáticos..... 22

Figura 2. Procesamiento de las muestras colectadas en campo; **A)** Corte de las muestras procesadas de cladodios sintomáticos y asintomáticos aproximadamente de 1 cm²; **B)** Etiquetado de las muestras sintomáticas y asintomáticas de nopal colectadas en campo. **C)** Desinfestación de cladodios sumergidas en hipoclorito de sodio al 1%. **D)** Siembra de las muestras procesadas en cajas Petri con PDA; **E)** Purificado parcial del virus obtenido de los cladodios colectados en campo..... 26

Figura 3. Pruebas de patogenicidad, inclusiones virales y microscopía electrónica. **A)** Plantas indicadoras inoculadas con el purificado parcial obtenido de cladodios enfermos con el “Pinto”; **B)** Cladodios asintomáticos sembrados en suelo estéril en macetas de 6 pulgadas; **C)** Cladodio joven

inoculado mecánicamente con el PPV; **D)** Inoculación mediante inyección; **E)** cladodio con dos pinchaduras en la cara frontal mediante la inoculación por inyección; **F)** Preparaciones de epidermis de *Chenopodium quinoa* para la observación de inclusiones virales; G) Rejillas preparadas para la observación del microscopio electrónico (DCBI-UAM-A. ZEIZZ)..... 30

Figura 4. Cajas Petri con medio de cultivo PDA. A) Cajas con muestras de síntomas del “Pinto” (15 dds); **B)** Caja con muestras de cladodios asintomáticos (15 dds). **C)** cajas de ambas muestras contaminadas con hongos saprofitos (25 dds)..... 42

Figura 5. Síntomas observados en plantas indicadoras inoculadas con el purificado parcial de virus obtenido de cladodios de nopal con síntomas de “Pinto”. Lesiones locales necróticas en **A)** *Nicotianaglutinosa*, **B)** *N. tabacum* var. Xanthi y **C)** *N. clevelandii*. **D)** *Chenopodium amaranticolor* y E) *C. quinoa* mostrando lesiones locales cloróticas.....46

Figura 6. Pruebas de patogenicidad en cladodios sanos a partir de cladodios sintomáticos. **A)** Cladodio con halos cloróticos alrededor de las espinas (Pinto del nopal) colectado bajo invernadero. **B)** Cladodio inoculado con el PPV mostrando síntomas de halos cloróticos a los 20 ddi. **C)**

Cladodio de nopal inoculado con el PPV mostrando síntomas de clorosis parcial a los 30 ddi. **D)** cladodio de nopal inoculado con el PPV con síntomas de clorosis total a los 50 ddi. **E)** Testigo inoculado solo con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0 sin presencia de síntomas visibles..... 49

Figura 7. Partículas virales observadas en el **A)** purificado parcial de virus (PPV) obtenido de cladodios con síntomas de “Pinto” colectados en campo y **B)** en el PPV obtenido de cladodios inoculados con PPV obtenido inicialmente. Epidermis de hojas de *Chenopodium amaranticolor* inoculadas con el purificado parcial de virus obtenido de cladodios con síntomas de “Pinto” mostrando una inclusión viral **C)** paracristalina (E=Estoma, N=núcleo, I= Inclusión viral) y **D)** amorfa (N=núcleo, I=inclusión viral)..... 53

Figura 8. Productos obtenidos de RT PCR a partir de RNA total de cladodios con síntomas de “Pinto” utilizando los siguientes primers: **A)** específicos para el gen 18S (300 pb aproximadamente); **B)** primers universales para Potexvirus, M; marcador molecular 1kb (PROMEGA®); carriles 2-5 muestras de nopal con síntomas de “Pinto”; carril 6; RNA de papa infectada con *Potato virus X*. **C)** primers universales para Allexivirus, M; marcador molecular; 1kb (PROMEGA®); carriles M1-M6: muestras de cladodios con síntomas de “Pinto”; carril TN: testigo negativo (agua). **D)**

primers universales para Tobamovirus, M; marcador molecular 1kb (PROMEGA®), carriles M-3 y M7: RNA de cladodios con síntomas de “Pinto”; TMV RNA de planta de jitomate infectada con *Tobacco mosaic virus*..... 55

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Virus reportados en cactáceas.....	15
Cuadro 2: Condiciones del termociclador para la rt-PCR anidada de <i>tobamovirus</i>	32
Cuadro 3: Condiciones del termociclador para la rt-PCR anidada de <i>tobamovirus</i>	33
Cuadro 4: Porcentaje de arena, limo, arcilla y textura de suelo donde crecen plantas de nopal con síntomas de “Pinto” y plantas asintomáticas.....	36
Cuadro 5: Materia orgánica oxidable (%) según Rioja-Molina (2002).....	37
Cuadro 6: Valores de pH, materia orgánica (MO), contenido de macro y micronutrientes (mg Kg ⁻¹) de suelo donde crecen plantas de nopal con síntomas de “Pinto” y plantas asintomáticas.....	37
Cuadro 7: Contenido de macro y micro nutrientes en cladodios de nopal con síntomas de “Pinto” y cladodios asintomáticos.....	40
Cuadro 8: Muestra procesadas de nopal con síntomas visibles del “Pinto”. Concentración, grado de contaminantes y pureza del RNA.....	43
Cuadro 9: Síntomas en plantas indicadoras de virus reportados en cactáceas y el virus asociado al “Pinto del Nopal”.....	47

ETIOLOGÍA DEL “PINTO” DEL NOPAL EN EL ORIENTE DEL ESTADO DE
MÉXICO.

Fidel Olmos Vilchis¹, Daniel L. Ochoa Martínez^{1*}, Reyna I. Rojas Martínez¹ y Carlos A. Ortega Obregón^{2†}. ¹Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo, Km. 36.5 Carretera Federal México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México. Asesor técnico privado. *Autor para correspondencia (ldaniel@colpos.mx).

RESUMEN

En 2012 se observaron en la zona productora de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) de San Martín de las Pirámides, Estado de México, cladodios de la variedad “Atlixco” con halos cloróticos irregulares de diferente tamaño alrededor de las espinas, alteración denominada localmente como “Pinto” del nopal. Los cladodios que muestran estos síntomas adquieren una coloración cobriza en 24 ó 48 h después de cortados lo cual impide su venta generando importantes pérdidas económicas para el productor. Debido al desconocimiento de la causa de este problema, el objetivo de la presente investigación fue conocer al agente asociado al “Pinto”. No se detectaron deficiencias nutrimentales en tejido de plantas con síntomas y asintomáticas así como en el suelo donde éstas crecen. En trozos de tejido de cladodios con síntomas y asintomáticos no se tuvo crecimiento de

bacterias y hongos. Se obtuvo un purificado parcial de virus (PPV) a partir de cladodios con síntomas de “Pinto” con el cual se inocularon mecánicamente diez plantas indicadoras; solamente en el caso de *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa* se observaron lesiones locales cloróticas mientras que en *Nicotiana clevelandii*, *N. glutinosay* *N. tabacum* var. Xanthi se tuvieron lesiones locales necróticas. Por otro lado, se inocularon mecánicamente 21 cladodios sanos con el PPV, los cuales presentaron lesiones cloróticas a los 30 días después de la inoculación. En rejillas preparadas con el PPV se observaron a microscopio electrónico partículas virales con forma de varilla rígida con una longitud de 335 ± 5 nm X 14 ± 2 nm de diámetro. Se observaron inclusiones amorfas y paracristalinas citoplásmicas en células de *C. quinoa* inoculadas con el PPV que mostraron lesiones locales cloróticas. Se extrajo RNA total de cladodios con síntomas de “Pinto” y se realizó RT-PCR con iniciadores universales para *potexvirus*, *alexivirus* y *tobamovirus*, obteniendo solamente el fragmento esperado para el último caso.

Palabras clave: *Opuntia ficus-indica*, plantas indicadoras, partículas virales, inclusiones virales.

ABSTRACT

In 2012 were observed in the production area nopal (*Opuntia ficus-indica*) of San Martin de las Piramides, State of Mexico, cladodes of "Atlixco" variety with irregular chlorotic halos around different sized spines, known locally altered as "Pinto" cactus. Cladodes showing these symptoms take on a coppery color in 24 or 48 h after cutting which prevents the sale of generating significant economic losses for the producer. Due to ignorance of the cause of this problem, the objective of this investigation was to determine the agent associated with the "Pinto". No tissue nutrient deficiencies in plants with symptoms and asymptomatic and on the ground where they grow were detected. In tissue pieces of pads with no symptoms and asymptomatic growth of bacteria and fungi were reported. Partially purified virus (PPV) was obtained from cladodes with symptoms of "Pinto" in which ten mechanically inoculated indicator plants; only in the case of *Chenopodium amaranticolor* and *C. quinoa chlorotic* local lesions were observed in *Nicotiana clevelandii* while, *N. glutinosa* and *N. tabacum* var. Xanthi necrotic local lesions were taken. Furthermore, mechanically inoculated with 21 healthy cladodes PPV, which showed chlorotic lesions at 30 days post inoculation. In grids prepared PPV were observed with electron microscope viral particles to form rigid rod with a length of $335 + 5$ nm X $14 + 2$ nm in diameter. Amorphous and paracrystalline cytoplasmic inclusions were observed in cells of *C. quinoa* inoculated with PPV showed chlorotic local lesions. Cladodes total RNA with symptoms of

"Pinto" extracted and RT-PCR was performed with universal primers for potexviruses, tobamoviruses and allexivirus and obtaining only the fragment expected for the latter case.

Keywords: *Opuntia ficus-indica*, indicator plants, viral particles, viral inclusions.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Las cactáceas son nativas del continente americano, particularmente de américa tropical, en su mayoría son plantas suculentas y espinosas con tallos fotosintéticamente activos, comprenden 200 géneros y más de 2,000 especies. La familia *Cactaceae* presenta un alto grado de endemismos, en ella se encuentran un gran número de especies de importancia económica (INE, 2007). *Cactus* es un término latín que deriva del vocablo griego "káctos", utilizado inicialmente para nombrar a un cardo espinoso, posiblemente *Cynara cardunculus (Asteraceae)* (INEGI, 2007). La palabra nopal deriva del náhuatl “nochtli” o “nopalli” que significa fruta de piedra (Tetl = piedra; Nochtli = fruta) (Monroy, 2010). Esta planta se desarrolla especialmente en climas desérticos y semidesérticos dominantes en México (60% del territorio nacional), creciendo en forma natural en 3 millones de hectáreas, aunque también se presentan en climas tropicales, subtropicales y templados (SEMARNAT-CP, 2007). Es una planta endémica de América con aproximadamente 258 especies, 100 de ellas se encuentran en México, donde se tienen más de 10,000 hectáreas de plantaciones especializadas en su producción para consumo humano. La venta de nopal verdura se ha incrementado en los últimos años, pasando de ser un alimento de consumo estacional a tener un consumo constante durante todo el año (INIFAP, 2007). La planta requiere poca agua en comparación con los cultivos básicos y eso lo hace sustentable además de

ser la principal fuente de ingresos de muchas familias al generar más de 65,000 mil empleos directos en todo su proceso productivo (SAGARPA, 2012).

Tradicionalmente, el nopal ha sido de los alimentos de mayor consumo en zonas rurales del pueblo mexicano, y en los últimos años se ha incrementado su demanda, principalmente en las áreas urbanas, donde se consume las pencas jóvenes, las tunas y el xoconostle. Se utilizan además las raíces, flores y pétalos para productos elaborados (Hoffmann, 1999). *Opuntia ficus-indica* es la especie de mayor importancia económica en el mundo. Se cultiva para fruta, forraje o como hospedante de la grana cochinilla, y sólo en nuestro país se consumen sus cladodios tiernos como verdura (Reyes *et al.*, 2005).

El género *Opuntia* se encuentra distribuido desde la provincia de Alberta, en Canadá, hasta la Patagonia en Argentina; se le encuentra principalmente en las zonas desérticas del sur de Estados Unidos, México y América del sur (García y Javier, 2003). México es el país donde existe la más amplia diversidad de nopales, tanto silvestres como cultivados con 15 especies usadas para forraje, seis para producción de tuna y tres para nopal verdura. Entre las variedades utilizadas para verdura se tienen la criolla tipo Italiana, Criolla, Tlaconopal, Copena F1, Atlixco y Milpa Alta.

A nivel internacional, las únicas plantaciones comerciales significativas están en México, Italia, España, Chile, Israel y Sudáfrica. (Tous y

Ferguson, 1996). Existen otras áreas de producción en Brasil (Karlin *et al.*, 1997) y Perú. En nuestro país existen alrededor de 2,500 productores de nopal y cerca de 10,000 ha cultivadas principalmente en el Distrito Federal y el estado de Morelos que contribuyen con el 55% de la producción nacional y comprenden el 82% de la superficie que se destina a este cultivo (Téran y Alcántara, 2008).

Debido al auge que está teniendo el nopal en la agricultura, es necesario estudiar todos los factores que puedan ser perjudiciales para su producción entre los que se encuentran las plagas y las enfermedades.

Las principales causas por las que las enfermedades han prosperado en el nopal son principalmente la poca diversidad genética derivada de la reproducción asexual para el establecimiento de nuevas plantaciones; así como el deficiente manejo agronómico de las plantaciones.

Se han reportado en el nopal poco más de 22 enfermedades de tipo fungoso, bacteriano y viral (Monroy, 2010). Entre las principales se encuentran las siguientes:

Engrosamiento de cladodios o chatilla

En la zona de San Martín de las pirámides, se ha reportado deformación y proliferación de brotes, engrosamiento y desarrollo cordiforme del cladodio y detención del crecimiento del nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*). En Nopaltepec, estado de México, en esta misma especie se ha observado engrosamiento de cladodios, mosaico y amarillamiento, manchas anulares,

proliferación y deformación de frutos, síntomas que se encontraron asociados a virus y fitoplasmas (Suaste *et al.*, 2011).

Pudriciones blandas

Los agentes causales pueden ser hongos y bacterias pectinolíticas, siendo estas últimas las más comunes. Las especies bacterianas encontradas son *Erwinia carnegiana*, *E. caratovora*, *E. atroseptica*, *E. chrysanthemi*, *E. betavascularum*, *E. cacticida* y *Pseudomas viridiflava*. Inicialmente el tejido afectado consiste de manchas circulares blandas y acuosas, tornándose posteriormente de color café con un margen húmedo y negro. En un estado avanzado de daño se presentan exudados amarillo-rojizos; la pudrición afecta la cutícula y el parénquima, pero los haces vasculares permanecen intactos. Una característica distintiva de esta enfermedad es la emisión de olores desagradables de las plantas afectadas. En algunas regiones nopaleras del país se han reportado incidencias de hasta el 70%. El patógeno puede permanecer en estado latente en los tallos, residuos de la misma planta y en las pupas de varios insectos barrenadores. Su penetración puede llevarse a cabo a través de aberturas o heridas naturales, insectos y probablemente por contacto entre raíces. Otra forma de transmisión puede ser por los exudados de la lesión que, mediante la acción del viento, roedores, aves e insectos pueden introducir este inóculo a tejidos sanos (Méndez *et al.*, 2007).

Mancha negra

El síntoma típico que caracteriza a esta enfermedad consiste en una mancha negra circular que predomina en plantas cultivadas en terrenos planos y en terrazas con baja humedad relativa. Esta alteración se inicia con una decoloración del tejido con puntos pequeños de color olivo; la zona afectada se torna de color café oscuro y aumentan su tamaño ocho días después. Las manchas atraviesan el cladodio y cuando alcanzan un diámetro de 3 a 4 cm presentan un margen amarillo y se hunden. A los 20 días se observan acérvulos y en los siguientes 5 a 20 días la parte afectada se deseca y a veces se desprende dejando agujeros en los cladodios. El tiempo desde la aparición de los primeros síntomas hasta que las lesiones se secan varía de 25 a 40 días, dependiendo del grosor y la edad del cladodio. Cuando las plantas crecen en lomeríos con temperaturas frescas y humedad relativa alta es común observar en la totalidad o parte del cladodio una mancha negra en forma de mapa. No obstante, los dos tipos de síntomas antes descritos se presentan con mayor incidencia en zonas con alta humedad relativa y baja temperatura sobre todo si las plantas están sombreadas (Quezada *et al.*, 2006).

Mal de oro.

Se caracteriza por un cambio de coloración de los cladodios, de verde oscuro a amarillo-oro. Las lesiones generalmente inician en la base de las espinas pero también pueden originarse en las heridas de los cladodios; al

principio se presentan manchas curvas, circulares o irregulares; el tejido adyacente se observa ligeramente gris y con el tiempo se torna de color dorado con presencia de costras amarillas con centro oscuro. Esta enfermedad se ha asociado con hongos de los géneros *Alternaria*, *Hansfordia* y *Ascochyta* (CESAVE, 2004).

No existen productos químicos específicos para el control de estas enfermedades y sólo se recomienda el manejo adecuado de la plantación, podas sanitarias y eliminación de plantas enfermas (Méndez *et al.*, 2007). Las enfermedades que se presentan en las huertas de nopal verdura, por lo general se ven favorecidas por un mal manejo en el corte y traslado de la penca a plantar; la falta de eliminación de la maleza y encharcamientos favorecen una alta humedad (Gutiérrez, 2000).

FITOPLASMAS

En diferentes partes del mundo como Estados Unidos, Italia, China y Líbano se han 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. En la zona de San Martín de las Pirámides, se ha reportado la enfermedad conocida como planta macho atribuida a fitoplasma (Hernández-Pérez *et al.*, 2009) la cual consiste en deformaciones,

proliferación de brotes, engrosamiento y desarrollo de cordiforme del cladodio y detención del crecimiento (Suaste-Dzul *et al.*, 2012).

VIROSIS

Poco se sabe acerca de los virus de cactáceas en su hábitat natural y muchos de los estudios relacionados con estos patógenos se han realizado en individuos localizados en diferentes colecciones de cactus en Europa. En agroecosistemas, los virus pueden diseminarse fácilmente de manera mecánica debido al uso de instrumentos contaminados utilizados para el corte o injerto de las plantas (Min *et al.*, 2006).

Las enfermedades virales de *Opuntia sp.* han sido reportados en diversos lugares de los Estados Unidos. El primer informe de virus en cactáceas silvestres fue hecho en Arizona (Chessin, 1963); posteriormente se realizó un estudio de distribución de estos virus en Arizona, Nevada y Utah (Chessin y Lesemann, 1971). De interés particular fue el estudio de los virus asociados al saguaro (*Carnegiea gigantea* Britt & Rose), una especie muy abundante y característica del desierto del sur de Arizona y norte de Sonora, México (Milbrath y Nelson, 1972). Los virus son de gran importancia ya que la mayoría se presenta en estado latente lo cual facilita su transmisión a plantas sanas al momento de su propagación. Diferentes virus asociados a cactáceas han sido reportados en el mundo: *Cactus virus X* (género *Potexvirus*, CVX) (Lastra *et al.*, 1976), *Saguaro cactus virus* (género *Carmovirus*, SgCV) (Nelson y Tremaine, 1975) *Sammons’ Opuntia*

Virus (género *Tobamovirus*, SOV) (Milbrath y Nelson, 1972), *Tobacco mosaic virus* (género *Tobamovirus*, TMV) (Giri y Chessin, 1975), *Cactus mild mottle virus* (género *Tobamovirus*, CMMoV) (Min *et al.*, 2006) y un nuevo virus reportado en Corea (género *Tobamovirus*) el cual infecta a *Aporcactus flagelliformis* (JF729471; Kim *et al.*, 2012). A demás del *Cactus virus 2* (género *Carlavirus*, CV2) (ICVT, 2005).

En plantaciones comerciales de nopal tunero localizadas en el estado de Hidalgo se tuvieron plantas con manchas cloróticas irregulares o circulares alrededor de las areolas o entre ellas, de color amarillo claro en cladodios pequeños y amarillo intenso en cladodios maduros llegando en algunos casos a cubrir toda la superficie. Se logró transmisión mecánica a algunas plantas indicadoras con savia obtenida de cladodios con síntomas y en preparaciones para microscopía electrónica se observaron partículas virales en forma de varilla flexible (Alonso *et al.*, 2011).

Opuntia Sammons' virus se transmite de forma mecánica y fue encontrado en varias especies del género *Opuntia* que presentaban manchas anulares necróticas o mosaico; así como en plantas asintomáticas (Chessin y Solberg, 1963). *Tobacco mosaic virus* produce lesiones locales en *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* "Xanthi-nc" y *Datura stramonium*. El tabaco turco, se produjeron dos lesiones necróticas locales en las hojas inoculadas y moteado sistémico, algunos necrosis y grave distorsión de las hojas. Síntomas en *N. sylvestris* fueron extremas, con lesiones acuosas primarias en las hojas inoculadas de 3-4 días después de inoculación,

formación de ampollas, y pelos glandulares masivas en las hojas no inoculadas más jóvenes, con la muerte prematura de las plantas inoculadas (Giri y Chessin, 1975).

Cactus mild mottle virus se ha reportado en *Hylocerus trigonus* causando moteado suave en forma de anillos a lo largo del tallo y anillos cloróticos en los rizomas. En *Gymnocalycium mihanovichii* provoca mosaico y muerte de la planta. El virus se transmite mecánicamente y por injerto (Min *et al.*, 2006).

Rattail necrosis-associated virus (RCNaV) fue originalmente aislado de plantas de *Aporcactus flagelliformis* (Corea) que mostraban síntomas de necrosis. Produce mosaico sistémico y un arrugamiento en *N. benthamiana* mientras que en *N. tabacum* cv. Samsun, y *N. tabacum* cv. Xanthi-nc produce lesiones locales necróticas (Kim *et al.*, 2012).

Un virus comúnmente encontrado en cactáceas es *Virus cactus X*. En *Chenopodium quinoa* y *C. amaranthicolor* provoca lesiones locales cloróticas 10 días después de la inoculación. En *Gomphrena globosa* se observan lesiones necróticas con el centro blanco y una coloración rojiza en el borde de las hojas. No se conoce su transmisión por semilla. Es un virus en forma de varilla flexible con una longitud promedio de 520 nm y genoma RNA monocatenario de sentido positivo (Lastra *et al.*, 1976).

El *Virus cactus 2* se ha detectado en plantas de *Mammillaria centricirra*, *Trichocereus bridgesii* y *Ritterocereus purinosus* que mostraban manchas

cloróticas y deformación de vástagos. En *Nicotiana tabacum* cv. *Samsun* el virus ocasiona mosaico mientras que en *Gomphrena globosa* y *Datura stramonium* induce la formación de lesiones locales necróticas, las cuales se parecen mucho a las provocadas por el *Cactus virus X* (Mudrak *et al.*, 2008). El *Cactus virus 2* tiene partículas flexibles de 470 a 1000 nm o más de longitud y 12 a 13 nm de diámetro. Su genoma es RNA monocatenario de sentido positivo que codifica de 3 a 6 proteínas (Viralzone, 2014).

En México se tienen pocos estudios de enfermedades causadas por virus en cactáceas, particularmente en nopal verdura y tunero (Cuadro 1).

Cuadro 1: Virus reportados en cactáceas

Virus	Género	Partícula viral	Longitud (nm)	Hospedante	Transmisión	Referencias
No determinado	<i>Potexvirus</i> ¿?	Flexible	112 X 24	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Mecánica	Alonso, 2011.
Asociado al engrosamiento del cladodio	Desconocido	Flexible	950-1700	<i>Opuntia ficus-indica</i>	Mecánica	Suaste <i>et al.</i> , 2011.
<i>Zygocactus virus</i>	<i>Potexvirus</i>	Flexible	519	<i>Zygocactus truncatus</i>	Mecánica	Lastra <i>et al.</i> , 1976
<i>Opuntia Sammons' virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	Rígida	300-350	<i>Opuntia amyclaea</i>	Mecánica	Chessin y Solberg, 1963
<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	Rígida	302 \pm 5	<i>Opuntia basilaris</i>	Mecánica	Giri y Chessin, 1975
<i>Cactus mild mottle virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	Rígida	320 X18	<i>Gymnocalycium mihanovichii</i> var. <i>Friedrichii</i>	Mecánica	Min <i>et al.</i> , 2006
<i>Rattail cactus necrosis-associated virus (RCNaV)</i>	<i>Tobamovirus</i>	Rígida	¿?	<i>Aporcactus flagelliformis</i>	Mecánica	JF729471; Kim <i>et al.</i> , 2012
<i>Virus cactus X</i>	<i>Potexvirus</i>	Flexible	520	<i>Nopalea cochinifera</i>	Mecánica	Lastra <i>et al.</i> , 1976
<i>Virus cactus 2</i>	<i>Carlavirus</i>	Flexible	650	<i>Cactaceas</i>	Mecánica	ICVT
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Tospovirus</i>	Isométrica	80-120	<i>Cactáceas</i>	Trips	
<i>Saguaro cactus virus</i>	<i>Carmovirus</i>	Isométrica	32	<i>Carnegiea gigantea</i>	Mecánica	Nelson y Tremaine, 1975

Literatura consultada

Alonso BB, Mora AG, Tlapal BB, Valdovinos PG y Rodríguez LE. (2011).

Etiología del Síndrome Fungoso y Viral en Cladodios de nopal Verdura (*Opuntia ficus-indica*). Tesis de Maestría, Colegio de Posgraduados, Campus Montecillo. 3-14.

CESAVE. (2004). Las Principales Plagas Y Enfermedades en la Región De

Milpa alta, Distrito Federal. Caracterización Y Manejo Fitosanitario Del Cultivo De Nopal: 25-27.

Chessin M. and Lesemann D. (1971). Distribution of cactus Viruses in

Wild Plants. *Phytopathology* 62: 97 – 99.

Chessin M, Solberg RA and Fischer PC. (1963). External symptoms and

Giemsa-stainable cell inclusions associated with virus infection in cacti. *Phytopathology* 53: 988 – 989.

García HE y Javier E. (2003). Programa Estratégico de Investigación y

Transferencia de Tecnología en el estado de San Luís potosí, Etapa III, estudio de la Trayectoria y prospectiva de los mercados del nopal tunero. Colegio de postgraduados, Campus San Luís potosí, Fundación Produce San Luís potosí. Salinas Hidalgo, San Luís potosí, México. 4 – 6.

Giri L and Chessin M. (1975). A Severe Strain of Tobacco Mosaic Virus

from Factus. *Phytopathology* 65: 824 -825.

Gutiérrez AF. (2000). Tecnología de la Producción del Nopal Tunero en Aguascalientes. CIRNOC – INIFAP. 14 p.

Hoffmann W. (1999). Etnobotánica en Agroecología, cultivo y usos del nopal, Estudio FAO, Producción y Protección Vegetal N° 132: 250.

INEGI. (2007). Características principales del cultivo de nopal en el Distrito Federal Caso Milpa Alta. Censo Agropecuaria. 3 – 9.

International Committee on Taxonomy of viruses (ICTV). (2005). Virus Taxonomy. C.M. Fauquet, M., A; Mayo, J; Maniloff, U; Desselberger, L., A. Ball (eds). 821 y 1091.

INIFAP. (2007). Producción invernal de nopal verdura. Centro de Investigación Regional del Noreste, Campo Experimental San Luis. San Luis Potosí, S.L.P. Folleto para Productores N° 52: 35-36.

Instituto Nacional de Ecología (INE) – SEMARNAT. (2007). URL: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/71/nverdura.html>.

Karlin UO, Rubén O, Coirini L, Catalán RZ. (1997). Informe de Argentina sobre *Opuntia ficus-indica*. Especies arbóreas y arbustivas para las zonas áridas y semiáridas de América Latina, Serie: Zonas Áridas y Semiáridas N° 12.

Kim NR, Hong JS, Song BN, Chung BN, Park JW and Ryu KH. (2012). The complete genome sequence of a member of a new species of

tobamovirus (rattail cactus necrosis-associated virus) isolated from *aporcactus flegelliformis*). Archives of Virology 257:185-187.

Lastra JR, Gaskin D y De Olcategui RC. (1976). Virus X del Cactus en Venezuela. Agronomía Tropical. 26: 303-310.

Méndez GS de J, Talavera MD, García HEJ. (2007). Revista Salud Pública y Nutrición. Identificación Y Control De Las Enfermedades Más Comunes En El Nopal. 106 – 110.

Min EB, Chung BN, Kim MJ, Ha JH, Lee B and Ryu KH. (2006). Cactus mild mottle virus is a new cactus-infecting tobamovirus. Archives of Virology 151: 13-21.

Milbrath MG y Nelson RM. (1972). Isolation and Characterization of a Virus from Saguaro Cactus. Phytopathology 62: 739 – 742.

Monroy LM. (2010). Tecno-Agro. Plagas Y Enfermedades Del Nopal (*Opuntia ficus-indica* Berg) – Tecno-Agro. Avances Tecnológicos y Agrícolas 52: 2-5.

Mudrak TP, Bysov AS, Kompanec TA y Korotyeyeva GV. (2008). Incidence of Cactus Virus 2 In Collection of Ukrainian Botanical Gardens. 29-31.

Nelson MR. and Tremaine JH. (1975). Physicochemical and serological properties of a virus from Saguaro cactus. Phytopathology 65: 309 – 319.

- Quezada SA**, Sandoval IJS, Alvarado RD y Cárdenas SE. (2006). Etiología de la Mancha Negra del Nopal (*Opuntia ficus – indica* Mill) En Tlalnepantla, Morelos, México. *Agrociencia* 40: 641-653.
- Reyes AJA**, Aguirre RJR y Hernández MH. (2005). Systematic Notes and a Detailed Description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae) 395-408.
- SAGARPA**. (2012). Delegación En El Estado De México Comunicación Social, Predomina cultivo de nopal, tuna y xoconostle en la región noreste del Estado de México, Zinacantepec, Estado de México. 1 p.
- SEMARNAT-CP**. (2007). Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana: Memoria Nacional. Motecillo, México. 68 p.
- Suaste DA**, Rojas MR, Ochoa MD, Zavaleta ME y Pérez BD. (2011). Virus associated with thickening of the cladodes of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* Mill). 4: 100 -107.
- Terán VOE** and Alcántara HBL. (2008). Estrategia Organizacional y Factores Competitivos. Escuela Superior de Comercio y Administración Unidad Tepepan. Instituto Politécnico Nacional. Centro Universitario UAEM Amecameca.
- Tous J** and Ferguson L. (1996). Mediterranean fruits. In: J. Janick (ed.), *Progress in new crops*: 416 – 430.

VIRALZONE. (2014). Bioinformatics Resource Portal. URL:
http://viralzone.expasy.org/viralzone/all_by_species/268.html

Fecha de consulta marzo 2014.

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la zona de estudio

El presente estudio se realizó en la localidad de **San Pablo Ixquitlán** situado en el municipio de San Martín de las Pirámides situado a 2340 metros de altitud, al noreste del Estado de México, entre las coordenadas **19°42'39“latitud N; 98°47'17“longitud O** a una distancia de 40 kilómetros al Distrito Federal próximo al municipio de Tecamac (INAFED, 2014).

Colecta de material vegetal

En la localidad de San Pablo Ixquitlán, municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México, en Febrero de 2012, se realizó un recorrido de campo en parcelas comerciales de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) variedad Atlixco, con la finalidad de analizar la problemática del “Pinto” del nopal, el cual consistía en la presencia de halos cloróticos irregulares parciales y totales alrededor de las espinas (Figura 1C). En ciertos casos se observó que en cladodios maduros alrededor de 2 o 3 años, los síntomas son difícil de observar, mientras que en pencas jóvenes los estos son más notables (Figura 1B).

Se colectaron 10 cladodios con síntomas de “Pinto” y 10 cladodios asintomáticos, las plantas colectadas tenían una edad aproximada de 1.5

a 2 años. En ambos casos los cladodios se tomaron de una plantación establecida bajo cubierta (Figura 1A). Las muestras de tejido vegetal se cortaron con una navaja de uso agrícola para después ser colocadas en bolsas de plástico previamente etiquetadas. Dicho material se trasladó al invernadero de Virus fitopatógenos ubicado en el Colegio de Posgraduados-Campus Montecillo, donde se sembraron en macetas de 12 pulgadas de diámetro con suelo estéril sin ningún tipo de promotor radicular. Se tomaron cinco cladodios con “Pinto” y cinco asintomáticos, las cuales se etiquetaron y se enviaron al Laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma Chapingo para determinar el contenido de macro y micronutrientes.

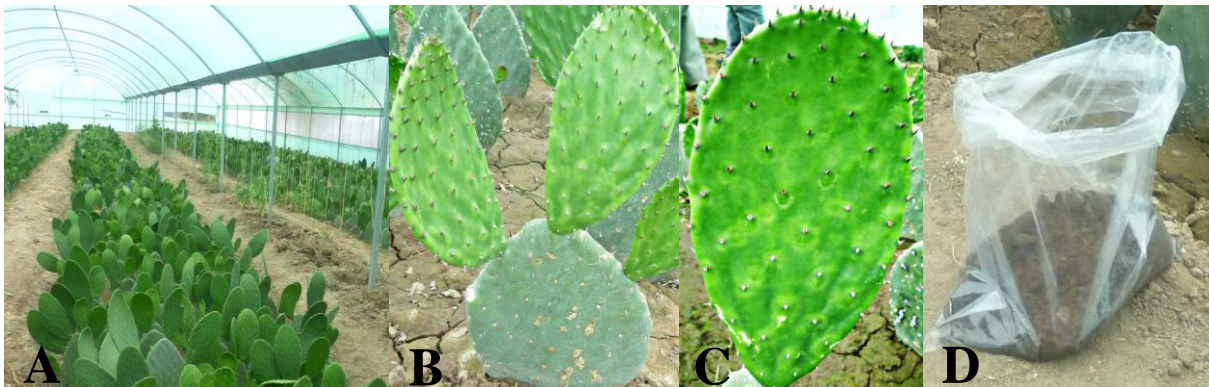


Figura 1: Colecta de material vegetal y suelo. **A)** Invernadero donde se realizó la colecta de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) variedad “Atlixco”. **B)** Cladodio madre con brotes sintomáticos del “Pinto”. **C)** cladodio con halos cloróticos alrededor de las espinas. **D)** Bolsa con suelo colectado (mezcla compuesta) de la parcela comercial de cladodios con síntomas de “Pinto” y asintomáticos.

Colecta de suelo

En la parcela donde se realizó la colecta de material vegetal, se colectó suelo aproximadamente a 30 cm de profundidad de cinco plantas que presentaban síntomas de “Pinto” y de cinco asintomáticas; las muestras de suelo de las cinco plantas asintomáticas se mezclaron para obtener una mezcla compuesta (Figura 1D), el mismo procedimiento se realizó con el suelo de las cinco plantas asintomáticas. Ambas muestras se etiquetaron y se enviaron al Laboratorio Central Universitario de la Universidad Autónoma Chapingo para determinar sus propiedades físicas y químicas que lo constituyen.

Análisis fitosanitario para hongos y bacterias general

Para saber si los síntomas de clorosis alrededor de las areolas donde se encuentran las espinas se encontraban asociados a hongos o bacterias, de cladodios sintomáticos se cortaron trozos de 1 cm² de la periferia de las espinas que presentaban la clorosis, las cuales se desinfestaron en hipoclorito de sodio al 1% durante 90 segundos (Figura 2C) y se dejaron secar sobre toallas de papel secante durante 14 horas (Figura 2B). Posteriormente los trozos de tejido desinfestado se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo PDA (5 trozos/caja) (Figura 2D), las cuales se sellaron cuidadosamente y se mantuvieron en laboratorio a temperatura ambiente. Como referencia se sembraron trozos de cladodios de plantas

asintomáticas desinfestadas y mantenidas en las condiciones antes descritas.

Con el propósito de observar algún crecimiento de hongos o bacterias de las cajas sembradas se mantuvieron en observación durante 25 días.

Extracción de RNA Total

Se cortó epidermis de los cladodios con síntomas del “Pinto” (Figura 2A) tratando de no extraer material mucilaginoso, ya que esto complica la extracción de RNA. Se pesó 3.0 g de epidermis y se colocaron en morteros posteriormente se agregó nitrógeno líquido y se procedió a macerarlos; con ayuda de una espátula estéril el tejido macerado se colocó en tubos de 1.5 ml que contenían 700 µl Trizol®; los tubos se agitaron con vórtex (Labnet VX100) y se incubaron durante 10 min en hielo; posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo y los se agitaron vigorosamente para centrifugarlos a 12, 000 g por 15 min a 10°C; se colectó cuidadosamente la fase acuosa y se transfirió a un tubo de 1.5 ml, se adicionaron 500 µl de isopropanol, se mezcló por inversión y se incubaron en hielo durante 10 min; los tubos se centrifugaron a 12, 000 g durante 10 min a 10 °C, se desechó el sobrenadante, se agregó 1 ml de etanol al 75% y se disolvió cuidadosamente la pastilla. Los tubos se centrifugaron a 14, 000 rpm durante 10 min. A 10°C, se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se colocó el tubo abierto hacia abajo para su secado sobre el papel

absorbente estéril; seco el tubo, se procedió a disolver la pastilla en 50 μ l de agua de ampolleta y los tubos se almacenaron a -20 °C (Refrigerador Lab-Line INSTRUMENTS. USA). Posteriormente se realizó la cuantificación del RNA en el Nanodrop (ND – 1000 spectrophotometer) para saber si la cantidad de ácido nucleico era la adecuada.

El RNA del virus fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) en TBE 1X (Tris–borato–EDTA), se corrió en amortiguador TBE 1X (Tris–borato–EDTA) previamente teñido con bromuro de etidio, durante 40 minutos a 90 V, con un marcador molecular 1 Kb (invitrogen®).

Purificación parcial del virus

Con el objetivo de conocer la presencia de algún posible virus involucrado en las muestras del “Pinto”, se procedió a realizar la purificación parcial del virus (PPV) propuesta por Lastra *et al.*, 1976 con algunas modificaciones: Se pesaron 10 gr de cladodios con síntomas del “Pinto” los cuales se colocaron en un vaso de licuadora para tritularlo en 20 ml de buffer Tris-HCL 0.05 M pH 7.8 + DIECA (Disodio dietil ditiocarbamato) 0.001 M durante un minuto; el macerado se pasó a través de una gasa y se colectó en un vaso de precipitado y se colocó en tubos de poliestireno de 30 ml para su centrifugación durante 15 min a 15, 000 rpm. Después de ese tiempo se colectó el sobrenadante y se le añadió 4% de

polietilenglicol (PEG) 6000 y 0.1 de NaCl, se agitó durante media hora en frío y nuevamente se centrifugó durante 15 min a 8,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se re-suspendió la pastilla en 15 ml de buffer acetato de amonio-bicarbonato 0.01M pH 7.1, y se centrifugó durante 15 min a 5,000 rpm. Se colectó el sobrenadante y se conservó en refrigeración a -20°C (Figura 2E) (Refrigerador Lab-Line INSTRUMENTS. USA).

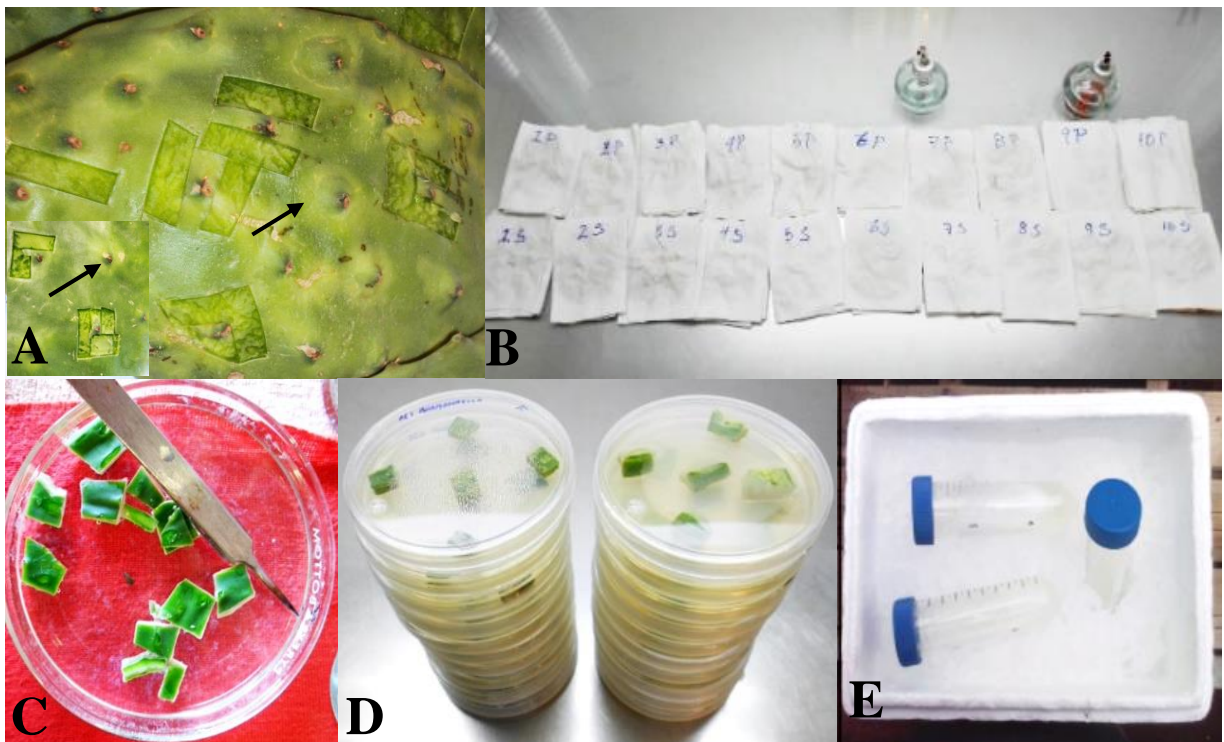


Figura 2; Procesamiento de las muestras colectadas en campo; **A)** Corte de las muestras procesadas de cladodios sintomáticos y asintomáticos aproximadamente de 1 cm^2 ; **B)** Etiquetado de las muestras sintomáticas y asintomáticas de nopal colectadas en campo. **C)** Desinfestación de cladodios sumergidas en hipoclorito de sodio al 1%. **D)** Siembra de las muestras procesadas en cajas Petri con PDA; **E)** Purificado parcial del virus obtenido de los cladodios colectados en campo.

Determinación de Rango de Hospedantes

Se inocularon mecánicamente un conjunto de plantas indicadoras, utilizando como fuente de inóculo el purificado parcial obtenido de cladodios con “Pinto” procedentes de San Pablo Ixquiltlán, San Martín de las Pirámides Estado de México. Se espolvoreo carborundum 600 mallas sobre las hojas de las siguientes plantas: *Nicotiana glutinosa* L., *N. rustica* L., *N. benthamiana* L., *N. tabacum var. xanthi* L., *N. clevelandii* Gray, *N. tabacum var. samsun*, *Datura stramonium* L., *D. Metel*, *Chenopodium quinoa* Willd. Y *C. amaranticolor* Coste & Reyn (Figura 3A). Para finalmente con un hisopo impregnado con el PPV, se froto sobre la superficie foliar.

Las plantas inoculadas se tuvieron en invernadero durante 30 días, registrando datos cada 72 horas como; presencia de manchas necróticas, anulares, clorosis, mosaicos, deformaciones o cualquier síntoma que se presentara después de haber inoculado. La inoculación de las plantas diferenciales se repitió dos veces, la primera se realizó con plantas que tenían 45 días después del trasplante (ddt), mientras que en la segunda fueron con plantas de 15 ddt.

Inoculación en cladodios asintomáticos

Se seleccionaron 21 cladodios asintomáticos de la variedad Atlixco (Figura 3B) en la localidad de San Pablo Ixquitlán, municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México y se plantaron en macetas de 6 pulgadas con suelo estéril, las macetas se mantuvieron en condiciones de invernadero. A los 15 días después de plantación se inocularon mecánicamente, para lo cual se espolvoreo carborundum 600 mallas sobre ocho cladodios sanos y se frotaron con un hisopo impregnado solamente con el PPV sin el buffer de fosfatos (Figura 3E), utilizando un volumen de 8 ml del purificado para los 8 cladodios inoculados. Como testigos negativos se tuvieron ocho cladodios espolvoreados con carborundum 600 mallas y frotados con un hisopo impregnado solamente con el buffer de fosfatos 0.1 M. El resto de los cladodios (5) se inocularon con una solución de 5 ml del purificado parcial + 5 ml buffer de fosfatos 0.1 pH 7.0 (volumen final 10 ml), se utilizó un jeringa de 10 ml previamente esterilizada, para esto, se tomaron 2 ml/cladodio de la solución y se inyectó de manera directa sobre cada cladodio (Figura 3C), se realizaron cuatro pinchadura/cladodio (2 de cada cara), las regiones donde se inoculo el virus fueron en la parte apical y media (Figura 3D).

Con el fin de observar la rapidez con la que se manifiestan los síntomas una vez que se inoculan con el purificado parcial y sin él, cada cladodio se etiquetó con la fecha de inoculación, número de repetición, inoculación con y sin el purificado. Se estuvieron registrando datos cada 72 horas

como: cambios en la coloración de los cladodios (clorosis), crecimiento de los mismos o en dado caso ausencia de síntomas.

Inclusiones virales

Se inocularon hojas de *Chenopodium amaranticolor* con el PPV, 6 días después de la inoculación, de aquellas regiones donde se presentaron las lesiones locales cloróticas, se tomó epidermis de la parte del envés tratando de tomar de aquellas regiones donde se manifestaban claramente los síntomas. Posteriormente la epidermis fue sumergida en etanol al 75 % durante 3 minutos, enseguida se sumergió en azure-A durante 5 minutos, al término de este paso se procedió a enjuagar con agua estéril para eliminar el exceso de colorante. Una vez tratada la epidermis con el colorante, se colocó una gota de glicerina en un portaobjetos y se colocó la epidermis para después ser cubierta con un cubreobjetos. La preparación fue observada en un microscopio óptico a 100X (American Optical One-Ten) (Figura 3F).

Microscopía electrónica

El purificado parcial obtenido de los cladodios con síntomas de “Pinto” y conservado a - 20°C, se descongeló y se mezcló homogéneamente con vórtex (Labnet VX100), sobre un pedazo de parafilm se colocaron 10 µl del purificado parcial y se mezclaron con 10 µl de ácido fosfotúngstico al 1%, después con unas pinzas antiestáticas se tomaron rejillas de cobre de 300 mallas cubiertas con formvar y se pusieron en contacto con dicha mezcla;

al término, las rejillas se colocaron en papel filtro para dejarlas secar y observarlas posteriormente al microscopio electrónico (DCBI-UAM-A. ZEIZZ) de la Universidad Autónoma Metropolitana (Figura 3G).

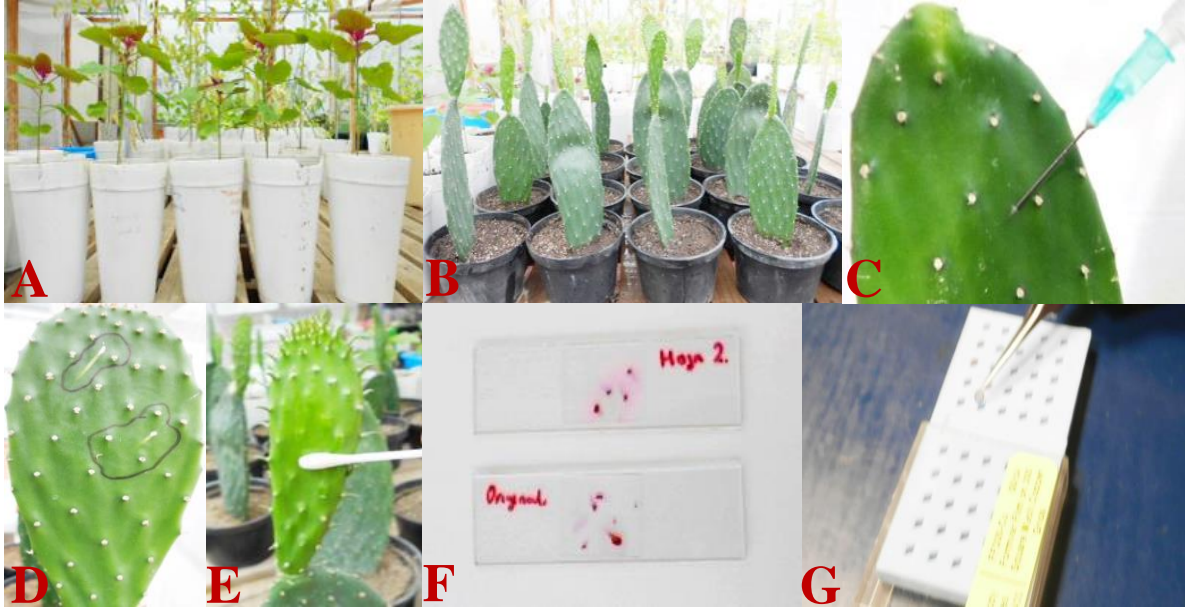


Figura 3: Pruebas de patogenicidad, inclusiones virales y microscopía electrónica. **A)** Plantas indicadoras inoculadas con el purificado parcial obtenido de cladodios enfermos con el “Pinto”; **B)** Cladodios asintomáticos sembrados en suelo estéril en macetas de 6 pulgadas; **C)** Cladodio joven inoculado mecánicamente con el PPV; **D)** Inoculación mediante inyección; **E)** cladodio con dos pinchaduras en la cara frontal mediante la inoculación por inyección; **F)** Preparaciones de epidermis de *Chenopodium quinoa* para la observación de inclusiones virales; G) Rejillas preparadas para la observación del microscopio electrónico (DCBI-UAM-A. ZEIZZ).

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

Se conoce la presencia de algunos virus en cactáceas (*Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Tospovirus*, *Carmovirus* y *Carlavirus*), con la idea de ver si algunos de estos estuviesen relacionados con los síntomas del “Pinto”, se utilizaron primers universales para los géneros de *Potexvirus*, *Allexivirus* y *Tobamovirus*. En el caso de *Potexvirus* (Van der Vlugt *et al.*, 2000) se utilizaron los primers POTEX 1RC (5'- TCAGTRTTDGCRTCRAARGT - 3'), POTEX 2RC (5'- AGCATRGCNSCRTCYTG - 3') y POTEX 5RC (3'- CAYCARCARGCMAARGAYGA - 5'), donde R = A+G, D = G+A+T, Y = C+T, S = G+C, N = A+C+G+T, que amplifican un fragmento de 735 y 584 pb.

La amplificación se inició con una desnaturalización de 94°C por 1 min, seguida de 30 ciclos de 94°C por 1 min, 54°C a 1 min y 72°C por 1 min, y un paso final de 5 min a 72°C. En el caso de *Allexivirus* (Chen *et al.*, 2003), se utilizaron los primers degenerados; Allex-CP (+) (5' - TGGRCTGCTACCACAAYGG - 3') y NABP (-) (5' - CCYTTTCAGCATATAGCTT AGC - 3'), donde X = A, T, C, G; Y = T, C; R = A, G. estos primers amplifican para un fragmento de 750 pb. Las condiciones del termociclador para la RT fueron:

Para el caso de Allexivirus, las condiciones del termociclador se inició con una desnaturalización de 94°C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min y 72°C, y un paso final de 72°C por 7 min.

Para Tobamovirus la RT-PCR se realizó según el protocolo propuesto por Dovas *et al.* (2004), con algunas modificaciones. La retrotranscripción del RNA, se utilizó una mezcla de reacción de 25 µl con 2.5 µl de Tris HCl pH 8.8 100 mM, 1.25 µl de KCl 1 M, 1.5 µl de MgCl₂ 25 mM, 2.5 µl de Triton X – 100 al 1%, 0.6 µl de dNTP's 10 mM, 1.25 µl de DDT 100 mM, 1.25 µl de DMSO al 100%, 0.3 µl de inhibidor de RNasa 40 U/ µl (Roche®), 0.025 µl de Superscript II ARNsa H transcriptasa M-MLV 40 U (Promega®), 2 µg de ARN de la muestra problema, y 2.5 µl de los iniciadores Tob RT up 1 y Tob RT do 2 10 µM.

La RT se realizó bajo las siguientes condiciones (Cuadro 2).

Cuadro 2: Condiciones del termociclador para la rt-PCR anidada de *tobamovirus*.

Etapa	Número de ciclos	Duración	Temperatura
Retrotranscripción	1	60 min	43 °C
Retrotranscripción	1	2 min	50 °C
Desnaturalización	5	30 seg	94°C
Alineamiento		30 seg	43 °C
Extensión		15 seg	72 °C
Desnaturalización	35	30 seg	94°C
Alineamiento		30 seg	46 °C
Extensión		15 seg	72 °C
Extensión final	1	2 min	72 °C

La PCR se realizó con 5 µl de DNA complementario, 2 µl de Tris HCl pH 8.8 100 mM, 1 µl de KCl 1 M, 1.2 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de Triton X – 100 al 1%, 0.5 µl de dNTP´s 10 mM, 0.16 µl de Taq ADN polimerasa 5 U (Promega®) y 2 µl de cada uno de los primers TobN up3, TobN do4 y TobN do4G 10 µl en un volumen final de 20 µl, que amplifica para un fragmento de 400 pb.

Las condiciones del termociclador para la amplificación del virus se muestran en la siguiente cuadro.

Cuadro 3: Condiciones del termociclador para la rt-PCR anidada de *tobamovirus*.

Etapa	Número de ciclos	Duración	Temperatura
Desnaturalización inicial	1	3 min	94 °C
Desnaturalización	2	20 seg	95 °C
Alineamiento	2	15 seg	51 °C
Extensión	2	15 seg	72 °C
Desnaturalización	26	20 seg	95 °C
Alineamiento	26	26 seg	61 °C
Extensión	26	15 seg	72 °C
Extensión final	1	2 min	72 °C

Como testigo positivo se utilizó RNA total de TMV obtenido de hojas de jitomate (*Solanum lycopersicum*).

En todas las RT – PCR se incluyó un control negativo consistente en una mezcla de reacción sin el templado de DNA complementario.

La electroforesis de todos los productos de RT – PCR (Potexvirus, Allexivirus y Tobamovirus) se realizó en un gel de agarosa al 1% (p/v) disuelto en amortiguador TBE 1X a 90 V durante 45 minutos. Los amplicones se observaron en un fotodocumentador (Gene Wizard, Syngene Bio Imaging) y se purificaron con el Wizard SV Gel y Sistema de limpieza de PCR (Promega®) siguiendo el protocolo de la empresa.

RESULTADOS

Análisis de suelo

Análisis de suelo. La textura del suelo donde crecen las plantas de nopal con síntomas de “Pinto” y plantas asintomáticas es franca (Cuadro 4). Asimismo, el pH para ambos tipos de suelo se ubicó ligeramente alcalino (Cuadro 6), este resultado es un buen indicador debido a que esta planta se desarrolla en un rango de 6.8 a 8.2 con un óptimo de 7.5, los mejores suelos para las plantaciones de nopal son los de origen ígneo o calcáreo con textura arenosas, profundidad media y con pH neutro o de preferencia alcalino (FAO, 1994). Se sabe que prefiere suelos calcáreos con pH alcalino. Sin embargo, se obtiene altos rendimientos también en suelos ligeramente ácidos. El pH del suelo suele influir en el color de las flores; en suelos alcalinos se obtienen coloraciones rojizas y en suelos ácidos coloraciones azules (Granados y Castañeda, 1996). El contenido de materia orgánica del suelo donde crecen las plantas de nopal con síntomas de “Pinto” es menor comparado con el del suelo donde crecen las plantas asintomáticas.

La materia orgánica, al igual que el pH, determinan la disponibilidad de nutrientes en el suelo. En el caso particular del suelo donde crecen los nopales con síntomas de “Pinto” y asintomáticos, los valores de los dos primeros se consideran adecuados para el nopal (Sainz *et al.*, 2011). Se puede observar que la concentración en el suelo de Fe^{++} (Cuadro 6) no es

muy marcada con respecto a las del tejido (Cuadro 7), por lo cual se descarta la posibilidad de que exista una deficiencia de este elemento, la sintomatología de aquellos cladodios con halos cloróticos no se debe precisamente a la falta de Fe^{++} en el suelo ya que es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre (Lindsay, 1979; Benavides, 2000).

Cuadro 4. Porcentaje de arena, limo, arcilla y textura de suelo donde crecen plantas de nopal con síntomas de “Pinto” y plantas asintomáticas.

N° CONTROL	ARENA %	LIMO %	ARCILLA %	TEXTURA
Sintomático	25.6	47.7	26.7	FRANCO
Asintomático	25.6	49.0	25.4	FRANCO

Debido a la poca información que existe respecto a los requerimientos básicos en cuanto a calidad del suelo se necesita para establecer *Opuntia ficus-indica*, tomamos como referencia de manera general, información de algunos autores que muestran tablas y contenidos de los rangos óptimos de los requerimientos esenciales para hortalizas.

El contenido de materia orgánica que presenta los suelos de donde se tomaron cladodios con síntomas de “Pinto”, es bajo (tabla 3), en comparación con aquellos de donde se tomaron los asintomáticos ya que en el porcentaje es relativamente alto (Rioja-Molina, 2002).

Cuadro 5: Materia orgánica oxidable (%) según Rioja-Molina, 2002.

<0.9	Muy bajo
1.0 – 1.9	Bajo
2.0 – 2.5	Normal
2.6 – 3.5	Alto
>3.6	Muy alto

Esta variación considerable del contenido de MO en ambos suelos, puede contrastar con la disponibilidad de nutrientes en el suelo, ya que algunos elementos pueden ser fácilmente absorbidos por la planta, mientras que otros la disponibilidad es baja, o en su caso, los elementos pueden ser fuertemente atrapados por otras moléculas de mayor peso, los cuales le impidan estar disponibles para las raíces. El contenido de MO en general, al igual que el pH, pueden determinar la disponibilidad de los nutrientes en el suelo, por lo tanto, los contenidos de nutrimentos en el suelo, desde un punto de vista general, se encuentran dentro del rango óptimo para nopal (cuadro 6) (Sainz *et al.*, 2011).

Cuadro 6: Valores de pH, materia orgánica (MO), contenido de macro y micronutrientes (mg Kg^{-1}) de suelo donde crecen plantas de nopal con síntomas de “Pinto” y plantas asintomáticas.

N° CONTROL	pH	MO	N mg Kg^{-1}	P mg Kg^{-1}	K mg Kg^{-1}	Ca mg Kg^{-1}
Sintomática	7.6	1.88	9.3	62.66	732	3490
Asintomática	7.99	2.96	11.6	86.09	922	3268

N° CONTROL	Mg mg Kg⁻¹	Fe mg Kg⁻¹	Cu mg Kg⁻¹	Zn mg Kg⁻¹	Mn mg Kg⁻¹	B mg Kg⁻¹
Sintomática	1109	6.12	2.95	3.1	2.86	0.98
Asintomática	1092	6.28	3.24	3.21	2.46	1.16

Contenido nutrimental en tejido vegetal

De acuerdo con Blanco – Macías (2009) los rangos de algunos elementos esenciales para *Opuntia ficus-indica* son de; N = 0.82 – 1.76, P = 0.20 – 0.44, K = 3.36 – 5.12, Ca = 3.23 – 6.69, Mg = 1.34 -1.88. Si comparamos estos datos con los obtenidos del análisis, podemos observar que los datos se encuentran dentro del rango óptimo (cuadro 7), excepto en el Ca y Mg, los cuales se encuentran en concentraciones bajas dentro de los tejidos del nopal. Con respecto a los demás microelementos, la información con la que se cuenta es nula para este cultivo, adicionalmente se encontró que la concentración de Fe en cladodios con síntomas es muy alta con respecto de la de cladodios asintomáticos. Sin embargo, no puede decirse si estos valores son normales ya que no se encontraron datos específicos de este elemento para *O. ficus-indica*.

El hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre (Lindsay, 1979; Benavides, 2000), es un micronutriente esencial para las plantas ya que juega un papel muy importante en la fotosíntesis (Miller *et al.*, 1984; Marchner, 1995), es responsable de la morfología, estructura y mantenimiento de los cloroplastos (Terry y Abadía, 1986; Abadía, 1992; Marschner, 1995). La deficiencia provoca una reducción en la síntesis de

pigmentos (clorofilas), por eso, los pigmentos amarillos (xantofilas y carotenos) predominan y son responsables del amarillamiento foliar (Seibert, 1993). El aumento del pH en una sola unidad puede disminuir la solubilidad de este elemento hasta 1000 veces (pH 7.5) (Lindsay, 1995). Las concentraciones elevadas de Zn^{2+} y Mn^{2+} en el medio interfiere en en la absorción de Fe^{2+} en la raíz (Cohen *et al.*, 1998; Foy *et al.*, 1998; Izaguirre-Mayoral; Adiloglu, 2006; Aref, 2011; Shanmugam *et al.*, 2011).

El principal efecto de la deficiencia de hierro en las plantas se produce en los cloroplastos que ven alterada su estructura y funciones. El característico color amarillo de las plantas (clorosis) es una consecuencia del desequilibrio entre los contenidos de clorofila y carotenos (Abadía, 1992; Terry y Zayed, 1995). También se ve reducido el transporte fotosintético de electrones; el hierro es uno de los constituyentes de muchos transportadores de electrones (Terry y abadía, 1986; Abadía, 1992; Terry y Zayed, 1995; Soldatini *et al.*, 2000; Donnini *et al.*, 2003). Esto hechos conducen a una reducción en la capacidad fotosintética de la planta que se traduce en una disminución de azúcares, almidón, algunos aminoácidos y acumulación de otros (Terry y Abadía, 1986; Abadía, 1992; Terry y Zayed, 1995).

En la actualidad se desconocen las concentraciones óptimas de Fe^{++} en tejido de nopal, sin embargo, en el cuadro 1 las concentraciones elevadas de Fe^{++} en aquellas plantas sintomáticas con respecto a las asintomáticas es muy marcada, el aparente exceso de este elemento de aquellas plantas

con halos cloróticos puede deberse a la acumulación excesiva de este en la planta, ya que como se sabe es fundamental en la fotosíntesis (Miller *et al.*, 1984; Marchner, 1995) y es responsable de la morfología, estructura y mantenimiento de los cloroplastos (Terry y Abadía, 1986; Abadía, 1992; Marschner, 1995), la planta en respuesta a este problema absorbe grandes cantidades para corregir esta clorosis ya que las xantofilas y carotenos predominan y son responsables del amarillamiento (Seibert, 1993). Asimismo, no hay información disponible de los contenidos óptimos de Cu, Zn, Mn y B para nopal por lo que no puede establecerse si hay suficiencia o deficiencia de los mismos en las muestras analizadas. La deficiencia de hierro (Fe), normalmente, no se produce por que la concentración total de Fe en el suelo sea baja (Lindsay, 1979), si no que existen varios factores como: pH, potencial redox, tipo de mineral al que está asociado el hierro, contenido de materia orgánica, los cuales hacen que la cantidad de hierro sea baja.

Cuadro 7: Contenido de macro y micro nutrimentos en cladodios de nopal con síntomas de “Pinto” y cladodios asintomáticos.

N° CONTROL	N %	P %	K %	Ca %	Mg %	Fe mg Kg⁻¹	Cu mg Kg⁻¹	Zn mg Kg⁻¹	Mn mg Kg⁻¹	B mg Kg⁻¹
Sintomática	1.52	0.38	4.53	2.71	1.32	672.5	48.00	55.00	392.50	135.27
Asintomática	1.83	0.38	4.71	2.76	1.32	237.5	33.00	70.00	192.50	154.12

Análisis fitosanitario para hongos y bacterias general

En aquellas cajas sembradas con trozos de material vegetal con síntomas del “Pinto” y asintomáticos, se realizaron las evaluaciones correspondientes con el propósito de descartar posibles patógenos asociados a estos síntomas.

La primera observación se realizó a los 5 después de la siembra (dds), se muestrearon todas las cajas y se registró el crecimiento de algún agente biótico fue negativo (Figuras 4A y B). La segunda observación de fue a los 15 dds, en este lapso de tiempo se notó presencia de un hongo saprofito creciendo en cajas con tejido sintomático como asintomático solamente en 2 cajas asintomáticas y 1 sintomática permaneciendo el resto libres de contaminación. A los 25 dds, se tuvo un porcentaje de 30% de cajas contaminadas con hongos saprofitos (Figura 4C), solamente se confirmó el crecimiento de hongos saprofitos en ambas muestras, no se observaron crecimiento de bacterias contaminantes, se realizaron dos repeticiones, por lo tanto se puede confirmar que estos síntomas no están relacionadas con alguna bacteria u hongo fitopatógenos.

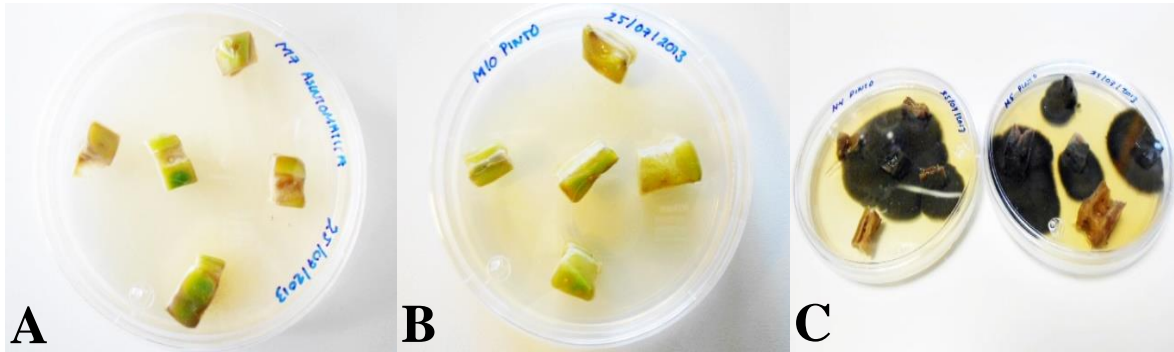


Figura 4: Cajas Petri con medio de cultivo PDA. **A)** Cajas con muestras de síntomas del “Pinto” (15 dds); **B)** Caja con muestras de cladodios asintomáticos (15 dds). **C)** cajas de ambas muestras contaminadas con hongos saprofitos (25 dds).

Extracción de RNA

El RNA genómico total de las muestras procesadas tuvo una concentración que osciló de 116 a 580 ng/ μ l, la cual puede considerarse de buena calidad, si toma en cuenta que la extracción de RNA en nopal es difícil debido a la composición del mucílago que posee (Nobel *et al.*, 1992). Los valores de pureza fueron de 1.90 a 2.05, lo cual nos indica la presencia mínima de contaminantes como fenoles, péptidos, hidratos de carbono y compuestos aromáticos que interfieren en la reacción de PCR (Cuadro 8) (Tapia *et al.*, 2005).

Cuadro 8: Muestra procesadas de nopal con síntomas visibles del “Pinto”.
Concentración, grado de contaminantes y pureza del RNA.

Muestra	ng/μl	260/280	260/230
M1	372.58	1.90	1.79
M3	116.27	1.93	2.00
M5	224.98	2.00	1.89
M7	198.58	2.05	1.93
M10	134.30	2.01	1.99

Purificación parcial del virus

Aun cuando la extracción de partículas virales en tejidos de nopal resulta muy difícil debido al mucílago que este contiene, el método de purificación resultó en la obtención de una gran cantidad de virus. La concentración de las partículas virales en el tejido del nopal enfermo es muy elevada, lo cual hace a este tejido apropiado para la purificación del virus.

El método de extracción (Lastra *et al.*, 1976) es el más adecuado para este virus, ya que se puede conservar por un periodo de hasta un año sin perder la capacidad de infectar a sus hospedantes. En ambas extracciones (2 repeticiones) del virus se tuvo presencia de partículas infectivas que nos ayudaron en las pruebas de patogenicidad.

Determinación de rangos de hospedantes

Plantas de *Datura stramonium*, *D. metel*, *Nicotiana benthamiana* y *N. samsun*, no presentaron síntomas al ser inoculados con el PPV.

Las plantas inoculadas de *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa*, presentaron lesiones locales cloróticas en promedio a los seis días después de la inoculación (ddi) (Figura 5 A y B). *Nicotiana tabacum* var. Xanthi, *N. glutinosa* y *N. tabacum* var. Clevelandii, los síntomas que presentaron fueron lesiones locales necróticas (Figura 5 C, D y E) y en promedio se manifestaron a los 5 ddi, la tipología de los síntomas en las plantas indicadoras indicó de una manera más clara la asociación de un agente de tipo viral. Considerando el número de plantas indicadoras que presentaron síntomas, este tentativo virus no posee un rango amplio de hospedantes. De los hospederos que se ocuparon solamente *C. quinoa*, *N. glutinosa* y *N. tabacum* permiten comparar los virus reportados en cactáceas (De La Torre *et al.*, 2007; Hausbeck y Gildow, 1991; Lastra *et al.*, 1976; Nelson *et al.*, 1975; Casper y Brandes, 1969).

Lesiones locales cloróticas observadas en *C. quinoa* y *C. amaranticolor* (Figura 5 A y B), descartó la presencia de *Opuntia Sammons'virus* (Chessin *et al.*, 1963) y *Tobacco mosaic virus*, las cuales solo inducen lesiones locales en *C. quinoa*, mientras que en *C. amaranticolor* los síntomas se encuentran ausentes. En el caso de *Cactus Virus X* y *Zygocactus Virus*, en *C. quinoa* para ambos casos los síntomas se presentan de manera sistémica, y en *C.*

amaranticolor solamente *Cactus virus X* presenta lesiones locales (Lastra *et al.*, 1976).

Lesiones locales necróticas observadas en *N. glutinosa*, *N. tabacum* var. *Xanthi* y *N. tabacum* var. *clevelandii*, (Figura 5 C, D y E) descartaron la presencia del Potexvirus encontrado en Hidalgo y el Virus mosaico del tabaco, ya que en el primero, para el caso de Potexvirus se producen lesiones locales cloróticas y en el caso del TMV en *N. t.* var. *Clevelandii* se producen síntomas de mosaico (Giri y Chessin, 1975).

Por otro lado se descartó la presencia del *Saguaro cactus virus* (Nelson y Tremaine, 1972) y *Cactus mild mottle virus* ya que solo provoca lesiones locales en *C. quinoa*, *amaranticolor* y en el caso del CMMV también aplica para *Gomphrena gobosa* (Min *et al.*, 2005), pero no manifiesta ningún síntoma en *Nicotiana tabacum*. En contraste con lesiones locales necróticas y deformación que provoca el TSWV en *N. glutinosa* y *N. t.* var. *Clevelandii*, y sin ningún síntoma en *C. quinoa* y *amaranticolor*. De igual manera la ausencia de síntomas en *N. rustica* inoculada con el PPV, descarto la presencia del tobamovirus encontrado en nopal tunero, ya que este presenta lesiones locales cloróticas que posteriormente se tornan necróticas (De la Torre *et al* 2007), además de provocar lesiones locales necróticas y un ligero mosaico en *Capsicum annum* y *Gomphrena globosa*.

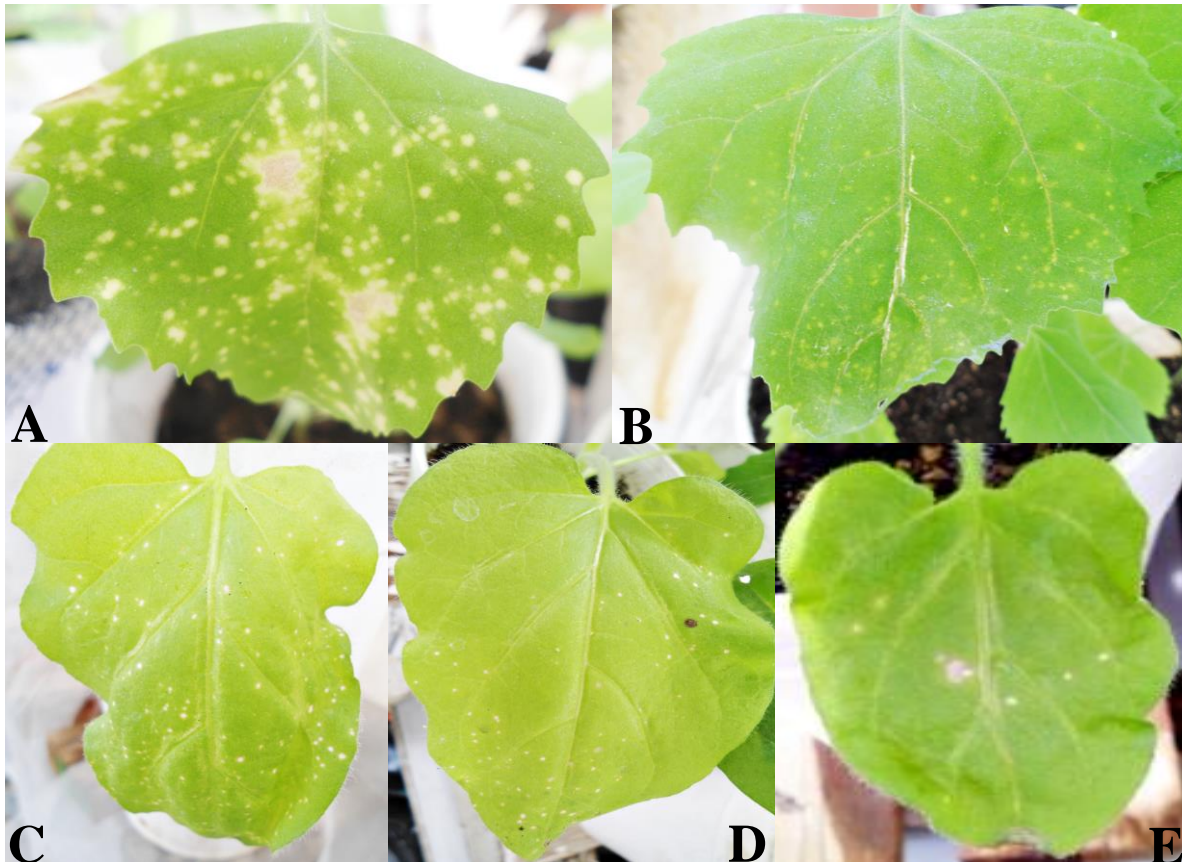


Figura 5: Síntomas observados en plantas indicadoras inoculadas con el purificado parcial de virus obtenido de cladodios de nopal con síntomas de “Pinto”. Lesiones locales necróticas en **A)** *Nicotianaglutinosa*, **B)** *N. tabacumvar. Xanthi* y **C)** *N. clevelandii*. **D)** *Chenopodium amaranticolor* y **E)** *C. quinoa* mostrando lesiones locales cloróticas.

Cuadro 9: Síntomas en plantas indicadoras de virus reportados en cactáceas y el virus asociado al “Pinto del Nopal”.

Hospedante	“Pinto”	Potexvirus?	Ocurrencia de Tobamovirus?	Opuntia Sammons' Virus	Cactus Virus X	Cactus virus 2	Tobacco mosaic virus	Tomato spotted wilt virus	Rattail cactus necrosis-associated virus	Tomato spotted wilt virus	Cactus mild mottle virus	Saguaro Cactus Virus SgCV
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Lln	Llc	Llc/Lln	-----	-----	-----	Ll	Lln/ deformación	-----	-----	-----	-
<i>N. rustica</i> L.	Ss	Ss	Llc/Lln	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
<i>N. benthamiana</i> L.	Ss	Ss	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Mosaico y arrugamiento foliar	-----	-----	-
<i>N. tabacum</i> var. <i>xanthi</i> L.	Lln	Lln	Llc/Lln	-----	-----	-----	Ll	-----	Lln	-----	-----	-
<i>N. tabacum</i> var. <i>clevelandi</i>	Lln	Lln	-----	-----	-----	-----	MS	Lln/ deformación	-----	-----	-----	-
<i>N. tabacum</i> var. <i>occidentalis</i>	-----	Ss	-----	-----	-----	Ss	-----	Lln/ deformación	-----	-----	-----	-
<i>N. samsun</i>	Ss	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Lln	-----	-----	-
<i>Datura stramonium</i> L.	Ss	Lln	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
<i>D. metel</i>	Ss	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Llc	IS/MAIV	Llc/lln	Ll	LLc	-----	Ll	-----	-----	-----	Ll *	Lln/AV
<i>C. amaranticolor</i> Coste & Reyn	Llc	Llc	Llc/Lln	-----	Llc	-----	-----	-----	-----	-----	Ll *	Lln
<i>Capsicum annum</i> L. Ancho L.	-----	Ss	Lln/mosaico leve	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Lln/ deformación	-----	-
<i>L. esculentum</i>	-----	Ss	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	Lln/ deformación	-----	-
	-----	-----	Lln/ mosaico leve	-----	Ln	-----	-----	-----	-----	-----	Ll*	Ll/infección sistémica
<i>Gomphrena globosa</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-

Lln = Lesiones locales necróticas, **Llc** = Lesiones locales cloróticas, **Ss** = Sin síntomas, **IS/MAIV** = Infección Sistémica Manchas Amarillas Inter-venales, **Ll** = lesiones locales, **IS** = Infección sistémica, **MS** = Mosaico Sistémico, **S/MV** = Sistémico/manchas Verdes. **Ll*** (Incluye manchas necróticas y cloróticas). EF = enrollamiento foliar. AV = aclaramiento de venas.

Inoculación en cladodios sanos

La inoculación mecánica en cladodios asintomáticos fue excelente (60% resultaron con síntomas característicos del “pinto”). Estos se pudieron apreciar con claridad en ambas caras de la penca a los 20 ddi, que consistían en halos y anillos cloróticos. En primera instancia se presentó una coloración tenue localizado principalmente alrededor de las espinas de los cladodios jóvenes (Figura 6B), los cuales tenían un diámetro de medio centímetro. Posteriormente a los 30 ddi el tamaño de los halos cloróticos aumentaron de tamaño (1 – 2cm) y cuando se encontraban cerca uno del otro podían llegar a juntarse creando un halo mucho más grande (Figura 6C).

A los 30 ddi las manchas al juntarse unas con otras llegaban a ser de gran tamaño alcanzando a cubrir en ciertas ocasiones a las pencas en su totalidad. Por ultimo a los 50 ddi se presentaba una clorosis casi total el cual iba desapareciendo conforme el cladodio llegaba a su madurez (Figura 6D).

Este tipo de síntomas encontrado en cladodios de nopal verdura “Pinto” (Figura 6A), son muy diferentes a los reportados por De la Torre *et al.*, 2007, ya que reporta la presencia de pequeñas y numerosas manchas o moteados en forma de anillos, de color amarillo intenso a blanquecino. Por otro lado tampoco se asocia al *Virus X del cactus*, ya que este manifiesta areolas y espinas deformes, además de un mosaico típico el cual tiende a

enmascararse a medida que color de la penca va haciéndose más oscura (Lastra *et al.*, 1976). Con respecto a *Opuntia Sammons' virus*, los síntomas en los cladodios van desde marcas cloróticas tenues a grandes anillos concéntricos entrelazados que a veces causan depresiones en la almohadilla de cactus, los cuales no corresponden a los descritos por el “Pinto” (Chessin y Solberg, 1963). Síntomas de moteado suave en forma de anillos, junto al tallo (Min *et al.*, 2005) característicos del cactus *Cactus mild mottle virus*, no tienen similitud con los halos cloróticos del “Pinto”. En el cladodio que se inoculó solamente con el buffer de fosfatos, no se mostraron síntomas después de 50 ddi (Figura 6E), es importante mencionar que todos los cladodios se mantuvieron en las mismas condiciones de invernadero.



Figura 6. Pruebas de patogenicidad en cladodios sanos a partir de cladodios sintomáticos. **A)** Cladodio con halos cloróticos alrededor de las espinas (Pinto del nopal) colectado bajo invernadero. **B)** Cladodio inoculado con el PPV mostrando síntomas de halos cloróticos a los 20 ddi. **C)** Cladodio de nopal inoculado con el PPV mostrando síntomas de clorosis parcial a los 30 ddi. **D)** cladodio de nopal inoculado con el PPV con

síntomas de clorosis total a los 50 ddi. **E)** Testigo inoculado solo con buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.0 sin presencia de síntomas visibles.

Inclusiones virales

En tejido de *Chenopodium amaranticolor* inoculado con el purificado parcial del virus y teñido con azure-A, se observaron cuerpos alargados citoplasmáticos en forma de cigarrillo (Figura 7A), los cuales se presentaban solo en aquellas células infectadas con el virus y ausentes en células de tejido sanos; estos cuerpos citoplasmáticos son muy similares a los encontrados por Min *et al.*, 2006 en tejido de una cactácea *Gymnocalycium mihanovichii*, el cual presentaba síntomas de clorosis. Al realizar preparaciones de este tejido y al ser teñidos con el mismo colorante (Azure-A) presentan la misma forma dentro de este hospedante, este autor reporta la presencia de *Tobamovirus* en esta cactácea.

Además se encontró otro tipo de inclusión viral cuando el tejido de *Chenopodium amaranticolor* inoculado con el PPV era teñido con rodamina verde de metilo. Este tipo citoplasmática amorfa (Figura 7D), posiblemente este virus sea capaz de generar más de un tipo de inclusión.

Las inclusiones virales se forman en aquellas células de las plantas, como resultado de las infecciones producidas por los virus; se ha demostrado que la mayoría de los virus conocidos hasta la fecha forman inclusiones (Cárdenas, 1999). Se conoce bien que los tobamovirus pueden generar diferentes tipos de inclusiones de virales en diferentes hospedantes. Las

encontradas en *C. amaranticolor* corresponden a las del tipo paracristalinas y amorfas esto por la forma que presentan dentro del citoplasma de la célula.

Microscopía electrónica

A partir del purificado parcial, se encontraron una gran cantidad de partículas virales fragmentadas en forma de varilla rígidas. En la primera microscopía electrónica realizada por parte de la Universidad Autónoma Metropolitana, los resultados obtenidos fueron partículas virales en forma de varillas rígidas obtenidas a partir de los cladodios colectados en la región de San Martín de las Pirámides, los cuales tenían un tamaño que oscilaban entre 320-350 nm de largo X 12.8 -14nm de ancho (Figura 7A). De aquellos cladodios que se inocularon con el purificado parcial y que presentaron síntomas, se obtuvieron partículas fragmentadas en forma de varillas rígidas, las cuales presentaban un tamaño entre 320 – 360 nm de longitud X 13 -16 nm de ancho (Figura 7B), estos resultados fueron reportados por Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Los resultados obtenidos por ambos laboratorios se compararon y se analizaron para determinar las características de las partículas virales, las cuales fueron partículas virales en forma de varillas rígidas de 335 ± 5 nm de longitud X 14 ± 2 nm de ancho. Teniendo como antecedente el reporte de *Opuntia Sammons'virus* (*Tobamovirus*), el cual

posee partículas rígidas de 300-350 nm de longitud (Chessin y Solberg, 1963), este virus podría encajar dentro de las características descritas por estos autores, sin embargo en la prueba de rangos de hospedantes, OSV solo se limita a infectar a *Chenopodium quinoa*. El reporte del *tobamovirus* descrito por De La Torre *et al.*, 2007 menciona una partícula viral de 325 nm, de igual manera este virus es muy semejante a la del “Pinto”, sin embargo este se diferencia del “Pinto” por inducir infección sistémica con manchas inter-venales amarillas en *Chenopodium quinoa*, mientras que el “Pinto” provoca lesiones locales cloróticas (De La Torre, 2007). Se descartó el posible parentesco con el *Cactus mild mottle virus (Tobamovirus)* ya que este posee una partícula viral 320 X18 nm, además de limitarse a infectar solamente a *Chenopodium quinoa* y *amaranticolor* (Min *et al.*, 2006); y el “Pinto” aparte de infectar está dos especies, también tiene la capacidad de infectar variedades y especies de tabaco.

Con respecto a los otros virus reportados en cactáceas; Cactus virus X, *Zygocactus virus* pertenecen a la familia Alphaflexiviridae, mientras que el Virus cactus 2 pertenece a la familia Betaflexiviradae además de poseer partículas virales de varilla flexible (ICVT, 2005)

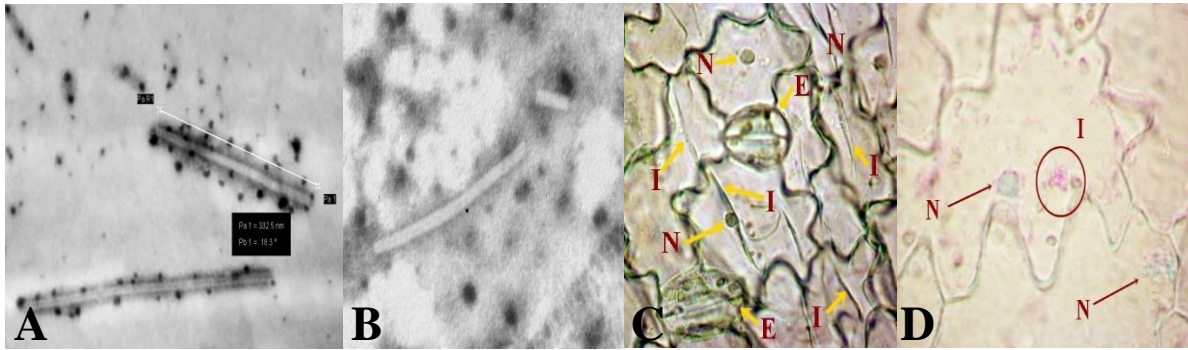


Figura 7. Partículas virales observadas en el **A)** purificado parcial de virus (PPV) obtenido de cladodios con síntomas de “Pinto” colectados en campo y **B)** en el PPV obtenido de cladodios inoculados con PPV obtenido inicialmente. Epidermis de hojas de *Chenopodium amaranticolor* inoculadas con el purificado parcial de virus obtenido de cladodios con síntomas de “Pinto” mostrando una inclusión viral **C)** paracristalina (E=Estoma, N=núcleo, I= Inclusión viral) y **D)** amorfa (N=núcleo, I=inclusión viral).

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

El ensayo de la rt-PCR fue negativo para el género Potexvirus (Figura 8 A) a partir de RNA extraído de aquellos nopales colectados en campo que presentaban halos y anillos cloróticos alrededor de las espinas. El ensayo donde se utilizaron los primers universales Allex-CP (+) y NABP (-) (Chen *et al.*, 2004) para *Allexivirus* se observó un amplicón de 750-800 pb en la muestra 3 (Figura 8 C). Y para aquellos primers universales TobN up3, TobN do4 y TobN do4G que amplifican para un fragmento de 400 pb, se

tuvo un amplicón del mismo tamaño (400 pb) en la muestra 3 (Figura 8 D). El resultado obtenido corresponde con los observados en microscopía electrónica donde se apreciaron partículas virales en forma de varillas rígidas, por lo que la sintomatología del “Pinto” asociado a los cladodios de nopal verdura (Atlixco) pueden corresponder a una nueva especie del genero Tobamovirus. *Opuntia Sammons’virus* (Chessin y Solberg, 1963), *Tobacco mosaic virus* (Giri y Chessin, 1975), la Ocurriencia de un *Tobamovirus* asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero (De La Torre, 2007) y el *Cactus mild mottle virus* nuevo virus reportado en *Gymnocalycium mihanovichii* var. *Friedrichii* (Min *et al.*, 2006), son especies de este género previamente reportadas en cactáceas. Sin embargo, tomando en cuenta el rango de hospedantes que infecta el “Pinto” con los demás tobamovirus reportados, este tiene la capacidad de producir síntomas en más plantas indicadoras. En México solamente se tiene reporte de un tobamovirus afectando nopal tunero (De La Torre, 2007) en la región de San Martín de las Pirámides, Estado de México, sin embargo la sintomatología de este virus no corresponde a la presentada por la del “Pinto”, por lo tanto podemos decir que este nuevo tobamovirus corresponde a otra especie nueva no reportada aun en México.

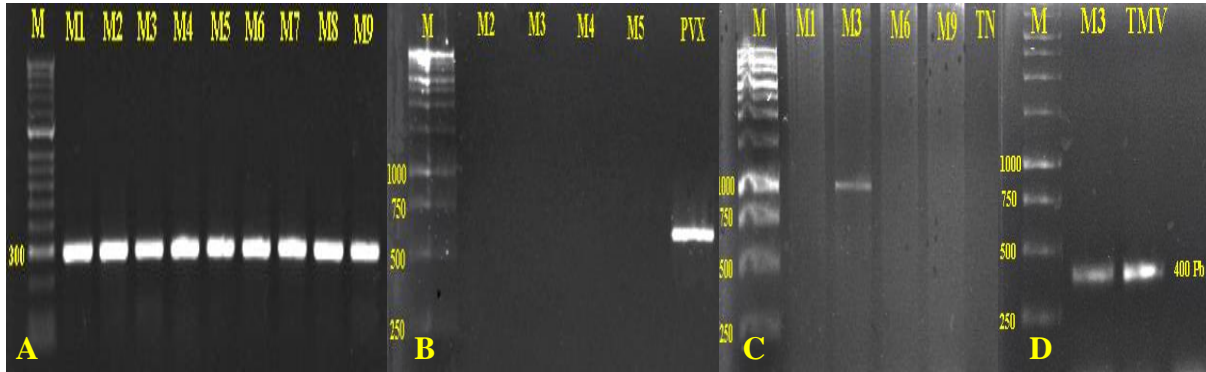


Figura 8. Productos obtenidos de RT PCR a partir de RNA total de cladodios con síntomas de “Pinto” utilizando los siguientes primers: **A)** específicos para el gen 18S (300 pb aproximadamente); **B)** primers universales para Potexvirus, M; marcador molecular 1kb (PROMEGA®); carriles 2-5 muestras de nopal con síntomas de “Pinto”; carril 6; RNA de papa infectada con *Potato virus X*. **C)** primers universales para Allexivirus, M; marcador molecular; 1kb (PROMEGA®); carriles M1-M6: muestras de cladodios con síntomas de “Pinto”; carril TN: testigo negativo (agua). **D)** primers universales para Tobamovirus, M; marcador molecular 1kb (PROMEGA®), carriles M-3 y M7: RNA de cladodios con síntomas de “Pinto”; TMV RNA de planta de jitomate infectada con *Tobacco mosaic virus*.

DISCUSIÓN

Los síntomas de “Pinto” consistentes en halos cloróticos alrededor de las espinas de cladodios de nopal verdura variedad “Atlixco” no se encuentran asociadas a ninguna deficiencia nutrimental, bacteria u hongo fitopatógeno, pero se relaciona con un virus, posiblemente a una especie del género *Tobamovirus*. Diferentes estudios indican que los *tobamovirus* son varillas rígidas de 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro (Wei *et al.*, 2010). La partícula viral obtenida de cladodios de nopal con síntomas de “Pinto” fue en forma de varilla rígida (335 ± 5 nm de longitud X 14 ± 2 nm de ancho) muy parecidas en forma y tamaño a las del género *Tobamovirus* (Fauquet *et al.*, 2005). Del rango de hospedantes empleados; *Chenopodium quinoa*, *N. glutinosa* y *N. tabacum* permiten comparar los virus reportados en cactáceas (De La Torre *et al.*, 2007; Hausbeck y Gildow, 1991; Lastra *et al.*, 1976; Nelson *et al.*, 1975; Casper y Brandes, 1969). Cuando se inocula mecánicamente induce lesiones locales necróticas en *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* var. Xanthi, *N. clevelandii* y lesiones locales cloróticas en *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa*, diferentes a los reportados por De la Torre-Almaraz *et al.*, 2007, que ocasiona lesiones locales cloróticas y después necróticas en *N. glutinosa*, *N. rustica*, *N. tabacum* var. Xanthi, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* y *G. globosa*, además de que el tamaño de la partícula viral es un poco más corta (de 325 nm). Difiere del *Cactus mild mottle virus* (Min *et al.*, 2006) el cual posee una partícula con una longitud de 320 X18 nm de diámetro pero se limita solamente a

Chenopodium quinoa y *amaranticolor* (mientras que el virus asociado al “Pinto” infecta además a *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* var. *Xanthi* y *N. clevelandii*). Lesiones locales cloróticas en *C. amaranticolor* y lesiones necróticas en *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* var. *Xanthi*, *N. clevelandii*, descartó a *Sammons’Opuntia Virus*, debido a que este último se limita a infectar solo a *C. quinoa* (Chessin y Solberg, 1963). Se descartó a *Tobacco mosaic virus* (Fauquet *et al.*, 2005) ya que este provoca mosaico sistémico en *N. tabacum*, sin embargo en *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* var. *Xanthi*, *N. clevelandii* se presentan lesiones locales necróticas cuando se inoculan mecánicamente con el “Pinto”. Por último se descarta la asociación al Rattail cactus necrosis-associated virus (*Tobamovirus*), ya que este se limita a infectar solamente a *N. benthamiana* provocando mosaico y arrugamiento foliar, y lesiones locales necróticas en *N. tabacum* cv. Samsun, y *N. tabacum* cv. *Xanthi*, mientras el pinto infecta a *C. quinoa* y *amaranticolor*.

Por el tipo de partícula viral que presenta el virus del “Pinto” (varilla rígida), se descarta al *Virus Cactus X* (Lastra *et al.*, 1976) ya que este posee una varilla flexible de 520 nm de longitud (*Potexvirus*); *Virus Cactus 2* (ICVT) varilla flexible de 650 nm de longitud (*Carlavirus*), a *Saguaro Cactus virus* (Nelson y Tremaine, 1975) (*Carmovirus*) y *Tomato spotted wilt virus* (*Tospovirus*) por poseer partículas virales isométricas.

Los tobamovirus inducen comúnmente la formación de dos tipos de inclusiones virales: cristalinas y paracristalinas (Christie y Edwarson,

1977), estas últimas observadas en epidermis de plantas de *Chenopodium amaranticolor* inoculadas mecánicamente con el PPV. No obstante, la presencia de inclusiones citoplásmicas amorfas en este mismo tejido no corresponden con las del género *tobamovirus*, lo cual dificulta la identificación del virus asociado al “Pinto”.

Utilizando primers universales para tobamovirus TobRT up1, TobRT do2, TobN up3, TobN do4 y TobN do4G (Dovas *et al.*, 2004) se obtiene un fragmento de 400 pb, el cual hace pensar que el virus asociado a los síntomas del “Pinto” sea *tobamovirus* poco común.

CONCLUSIONES

- Se encontraron partículas virales en forma de varilla rígida con una longitud de 320-360 nm X 12.8-16 nm de diámetro en cladodios con síntomas de “Pinto” que se transmitieron mecánicamente a nopal así como a *Nicotiana glutinosa*, *N. tabacum* var. *Xanthi* y *N. clevelandii* provocando lesiones locales necróticas y a *Chenopodium amaranticolor* y *C. quinoa* ocasionando lesiones locales cloróticas.
- El virus asociado al “Pinto” del nopal no pertenece al género *Potexvirus* o *Allexivirus* y posiblemente se trate de un tobamovirus.

LITERATURA CONSULTADA

Abadía J. (1992). Leaf Responses to Fe deficiency: a review. *J. Plant Nutr.* 15 (10): 1699-1713.

Adiloglu S. (2006). The effect of increasing nitrogen and zinc doses on the iron, copper and manganese contents of maize plant in calcareous and zinc deficient soils. *Asian J. Plant Sci.* 5: 504-507.

Aref F. (2011). Influence of zinc and boron nutrition on copper, manganese and iron concentrations in maize leaf. *Aust. J. Basic & Appl. Sci.* 5: 52-62.

Benavides A. (2000). Absorción y asimilación de hierro en las plantas. *Ciencias UANL.* 3: 50-57.

Blanco MF, Magallanes QR, Valdez CRD, Vazquez AR, Olivares SE, Gutiérrez O, Vidales CJA. (2009). Comparison Between CND Norms and Boundary-Line Approach Nutrient Standards: *Opuntia ficus-indica* L. Case. *Revista Chapingo Serie Horticultura:* 217-223.

Casper R & Brandes J. (1969). A New Cactus Virus. *J. Gen. Virol.* 5: 155-156.

Chen JH, Zheng HJ, Antoniw FM, Adams JJ, Chen PL, Lin (2004). Detection and classification of alexiviruses from garlic in China. *Arch Virol* 149: 435-445.

Chessin M, Solberg, RA and Fischer PC. (1963). External symptoms and Giemsa-stainable cell inclusions associated with virus infection in cacti. *Phytopathology* 53: 988 – 989.

Christie RGR & Edwardson J. (1977) Light and electron microscopy of plant virus inclusions. *Fla. Agric. Exp. St. No. 9*: 150 p.

Cohen CK, Fox T, Garvin DF y Kochian LV. (1998). The role of Fe-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. *Plant Physiol.* 116: 1063-1072.

De la Torre AR, M Salazar SR, Ruíz M. (2007) Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41: 763-773.

Donnini S, Castagna A, Guidi L, Zocchi G, Ranieri A. 2003. Leaf responses to reduced iron deficiency in bean plants. *Plant Physiology*: 824 – 846.

FAO. (1994). ECOCROP 1. The adaptability level of the FAO crop environmental requirements database. Versión 1.0. AGLS. FAO. Rome, Italy.

Foy CD, Farina MPW y Oakes AJ. (1998). Iron-manganese interactions among clones of nilegrass. *J. Plant Nutr.* 21: 987-1009.

Giri L. and Chessin, M. 1975. A severe strain of tobacco mosaic virus from cactus. *Phytopathology* 65: 824 -825.

Granados D Y Castañeda A D. (1996) El Nopal. 2ª Reimpresión, Ed. Trillas, México.

INAFED. (2014). URL;
<http://elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/EMM15mexico/municipios/15075a.html> Fecha de consulta: Marzo, 2014.

Izaguirre-Mayoral ML y Sinclair TR. (2005). Soybean genotypic difference in growth, nutrient accumulation and ultrastructure in response to manganese and iron supply in solution culture. *Ann. Bot.* 96: 149-158.

Kim NR, Hong JS, Song BN, Chung BN, Park JW and Ryu KH. (2012). The complete genome sequence of a member of a new species of tobamovirus (rattail cactus necrosis-associated virus) isolated from *aporcactus flegelliformis*). *Archives of Virology* 257:185-187.

Lastra JR, Gaskin D, Uzcategui RC. (1976) Virus X del Cactus en Venezuela. *Agronomía Tropical.* 26: 303-310.

Lindsay WL. (1995). Chemical reactions in soils that affect iron availability to plants. A quantitative approach. En: *Iron Nutrition in Soils and Plants.* Abadía J. (Ed.). Kluwer Academic Publishers. Holanda. 7 – 14.

Lindsay WL. (1979). *Chemical Equilibrium in Soils.* Eds. John Wiley and Sons. New York, USA. 5 ed. 449 p.

- Marschner H** y Römheld V. (1995). Strategies of plants for acquisition of iron. 375-378. En: Iron Nutrition in Soils and Plants. Abadía J. ed.; Klumer Academic Publishers: Dordrecht, Holanda.
- Miller GW**, Pushnik JC y Welkie GW. (1984). Iron chlorosis, a worldwide problema. The relation of chlorophyll biosynthesis to iron. J. Plant Nutr. 7:1-22.
- Min EB**; Chung BN, Kim MJ, Ha JH, Lee B and Ryu KH. (2006). Cactus mild mottle virus is a new cactus-infecting tobamovirus. Arc Virol (2006) 151: 13-21.
- Mudrak TP**, S Bysov A, A Kompanec T, V Korotyeyeva G. (2008). Incidence of Cactus Virus 2 in collection of Ukrainian Botanical Gardens. UDC 578.85/.86. 29-31.
- Nelson MR**, Tremaine JH. (1975) Physiochemical and serological properties of virus from Saguaro Cactus. Virology 65: 309-319.
- Tapia TR**, Quijano R, Rojas H, Larqué S, Pérez B (2005). A fast, simple and reliable high-yielding method for DNA extraction from different plant species. Molecular Biotechnology 31:137-139.
- Terry N** & Zayed AM. 1995. Physiology and biochemistry of leaves under iron deficiency. In iron Nutrition in Soils and Plants. (J. Abadía ed). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. ISBN: 0-7923-2900-7: 283-294.

Rioja MA. (2002). Apuntes de Fitotecnia General, E.U.I.T.A., Ciudad Real.
54 p.

Terry N, Abadía J. (1986). Functions of iron in chloroplasts. *J. of Plant Nutrition*: 609 – 646.

Sainz RH, H Echeverria E, Agelin H. (2011). Niveles de materia orgánica y pH en suelos agrícolas de la región Pampeana y Extrapampeana, Argentina. *Informaciones Agronómicas* N° 2-6.

Seibert M. (1993). Biochemical, biophysical and structure characterization of isolate photosystem II reaction center complex. *The Photosynthetic reaction center*. Norris J y Deisehhofer (eds). Academic Press NY.

Shanmugan V, Lo JC, Wu CL, Wang SL, Lai CC, Connolly EL y Yeh KC. (2011). Differential expression and regulation of iron-regulated metal transporters in *Arabidopsis halleri* and – the role in zinc tolerance. *New Phytol.* 1990: 125-137.

Soldatini GF, Tognini M, Castagna A, Baldan B, Ranieri A. (2000). Alterations in thylakoid membrane composition induced by iron starvation in sunflower plants. *J. of Plant Nutrition*: 1717 -1732.

ANEXOS.

Purificación Parcial (*Lastra et al., 1976*)

- Pesar 10 gramos de tejido vegetal
- Poner el tejido en un vaso de licuadora y agregar 70 mL de Buffer Tris-HCL 0.05 M pH 7.8 + DIECA (Disodio dietil ditiocarbamato) 0.001M.
- Licuar durante 1 minuto
- Pasar el macerado a través de una gasa y colectarlo en un vaso de precipitado
- Colocar el filtrado en tubo de poliestireno de 30 ml
- Centrifugar durante 15 min a 15,000 rpm
- Colectar el sobrenadante y agregar 4% de Polietilenglicol 6000 (PEG) y 0.1 NaCl (va a depender del volumen colectado del sobrenadante)
- Agitar durante media hora en frio y centrifugar durante 15 min a 8,000 rpm
- Desechar el sobrenadante y re suspender la pastilla en 15 mL de buffer acetato de amonio bicarbonato 0.01 M pH 7.1
- Centrifugar durante 15 min a 5,000 rpm y colectar el sobrenadante
- Almacenar en frio.

Microscopia Electrónica.

- Colocar 10 μ L del purificado en una parte lisa (plástico) y 10 μ L de Ácido fosfotúngstico al 1%.
- Tomar con unas pinzas de sentido negativo las rejillas y sumergirlas en la mezcla.
- Dejarlo remojar hasta ver que las rejillas se encuentran totalmente impregnada con la mezcla.
- Sacar las rejillas de la mezcla y colocarlas en papel filtro, hasta observar que el exceso haya desaparecido.
- Tomar las rejillas y guardarlas.

Extracción de RNA total para tejidos vegetales con alto contenido de Polisacaridos Harris (2002).

1. Agregar 500 μ L de buffer salino a un tubo eppendorf estéril
2. Pesar 0.1 gr de tejido vegetal y colocarlo en un tubo que contiene el buffer salino
3. Macerar con nitrógeno líquido
4. Eliminar la fase acuosa y agregar 600 μ L de buffer CTAB + 0.5 % β -mercaptoetanol y mezclar con vórtex.
5. Incubar a 55°C durante 10 min.
6. Adicionar 400 μ L de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y mezclar con vórtex.

7. Centrifugar a 14,000 rpm por 10 min.
8. Colectar la fase acuosa 500 μ L en un tubo eppendorf estéril y considerando el volumen colectado, adicionar 50 μ L de acetato de amonio 7.5 M y 500 μ L de isopropanol.
9. Mezclar por inversión e incubar los tubos en hielo por 10 min.
10. Centrifugar a 14 000 rpm por 10 min.
11. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante cuidando no tirar la pastilla formada en el fondo del tubo.
12. Agregar 1 mL de etanol al 70% y centrifugar a 14 000 rpm por 1 min.
13. Secar los tubos a temperatura ambiente y adicionar 50 μ L de agua libre de RNAasas.

Extracción de RNA total por el método de Trizol

- a) Agregar 700 μ L de Trizol a un tubo eppendorf de 1.5 mL y mantenerlo en frio.
- b) Moler 0.1 gramos de tejido vegetal en nitrógeno líquido.
- c) Colocar el tejido macerado dentro del tubo que contiene Trizol con una espátula estéril.
- d) Agitar vigorosamente el tubo que contiene el tejido y el Trizol e incubar durante 10 min en hielo.
- e) Adicionar 200 μ L de cloroformo al tubo que contiene el tejido macerado y el Trizol, para después agitar vigorosamente
- f) Centrifugar a 12, 000 g por 15 min a 10°C

- g) Colectar cuidadosamente la fase acuosa (superior) y transferirla a un tubo eppendorf de 1.5 mL
- h) Adicionar 500 μ L de isopropanol, mezclar suavemente e incubar en hielo durante 10 min.
- i) Centrifugar a 12, 000 g durante 10 min a 10°C
- j) Desechar cuidadosamente el sobrenadante. Debe observarse una pastilla de consistencia gelatinosa en el fondo del tubo.
- k) Agregar 1 mL de etanol al 75% y disolver cuidadosamente la pastilla.
- l) Centrifugar a 12, 000 g durante 10 min.
- m) Desechar cuidadosamente el sobrenadante y colocar el tubo abierto hacia abajo para su secado sobre papel absorbente (sanita) estéril.
- n) Una vez seco el tubo disolver la pastilla en 50 μ L de agua de ampolleta.
- o) Almacenar a -20°C.