

OCURRENCIA DE UN TOBAMOVIRUS ASOCIADO CON MANCHAS ANULARES AMARILLAS EN NOPAL TUNERO EN MÉXICO

OCCURRENCE OF A TOBAMOVIRUS ASSOCIATED WITH YELLOW RINGSPOTS IN PRICKLY PEAR CACTUS IN MEXICO

Rodolfo De La Torre-Almaraz¹, Mario Salazar-Segura² y Roberto Ruiz-Medrano³

¹FES-IZTACALA-UNAM. Unidad de Biotecnología y prototipos (UBIPRO). Avenida De los Barrios 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México. 54090 (drodolfo@servidor.unam.mx).

²Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. 56230. Chapingo, Estado de México.

³Centro de Investigaciones Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV). Unidad de Biotecnología y Bioingeniería. Avenida Politécnico Nacional, esquina Avenida Ticomán, Distrito Federal.

RESUMEN

Se detectó un virus en cladodios de nopal tunero cultivado en la región de San Martín de las Pirámides, Estado de México, con manchas anulares de color amarillo. Los cladodios afectados desarrollan, en ataques severos, clorosis y marchitez. El virus se transmitió mecánicamente a algunas especies de plantas hospedantes indicadoras, causando lesiones locales cloróticas y después necróticas en las hojas inoculadas; sólo *Nicotiana tabacum* L. var. White Burley y *Capsicum annuum* L. desarrollaron además mosaicos tenues en hojas no inoculadas. El desarrollo de síntomas en los hospedantes alternos fue lento, pero se aceleraron a temperaturas mayores a 30 °C en invernadero. El análisis electroforético y el tratamiento con nucleasas del ARN replicativo mostró que el virus aislado de plantas de nopal tiene un genoma de ARN de cadena sencilla, mientras que el análisis al microscopio electrónico de macerados de tejidos de plantas de las especies de hospedantes indicadoras con mosaico, mostró partículas en forma de varilla rígida de 300-350 nm de longitud. Además, el ensayo por RT-PCR confirmó que el virus es una especie del grupo Tobamovirus. Las características biológicas de este virus indicaron que es una variante no severa relacionada con la especie *Opuntia Sammons'* virus.

Palabras clave: *Opuntia amyclaea*, virus.

INTRODUCCIÓN

En México el nopal ha sido importante en el desarrollo de las culturas regionales por su uso medicinal, ornamental y alimenticio (Pimienta, 1997). En la zona norte de México, el nopal se explota como forraje, mientras en la zona centro se consume principalmente como verdura o fruto. Las especies más importantes como forraje son *Opuntia streptacantha* (L.) (cardón) y *O. leucotricha* (L.) (duraznillo); para consumo como verdura es importante *O. ficus-indica*

Recibido: Septiembre, 2005. Aprobado: Mayo, 2007.

Publicado como NOTA en *Agrociencia* 41: 763-773, 2007.

ABSTRACT

A virus was detected in fruit prickly pear cladodes cultivated in the region of San Martín de las Pirámides, State of Mexico, causing yellow ringspots. In severe attacks the affected cladodes develop chlorosis and wilting. The virus was transmitted mechanically to species of indicator host plants in which localized chlorotic lesions, later becoming necrotic, were caused on inoculated leaves; only *Nicotiana tabacum* L. var. White Burley and *Capsicum annuum* L. also developed tenuous mosaic on non-inoculated leaves. Symptom development on alternate hosts was slow, but accelerated at temperatures above 30 °C in a greenhouse. Electrophoretic analysis and treatment with double stranded RNA nuclease showed that the virus isolated from prickly pear plants has a single stranded RNA genome, while macerated tissue analysis of the indicator host species with mosaic under an electronic microscope showed rigid bar-shaped particles 300-350 nm long. Besides, an RT-PCR assay confirmed that the virus is a species of the Tobamovirus group. The biological characteristics of this virus indicate that it is a non-severe variant related to the species *Opuntia Sammons'* virus.

Key words: *Opuntia amyclaea*, virus.

INTRODUCTION

In México prickly pear cactus has been important in the development of regional cultures having multiple uses as a remedy, an ornamental and food (Pimienta, 1997). In northern México, prickly pear is used as forage, while in central México, its fruit and tender cladodes are consumed. The most important forage species are *Opuntia streptacantha* (L.) (cardón) and *O. leucotricha* (L.) (duraznillo); *O. ficus-indica* (L.) is important for its consumption as a vegetable and, for its quality fruit, *O. amyclaea* (L.) is outstanding (Granados and Castañeda, 1997).

O. amyclaea is grown widely in the region of San Martín de las Pirámides, San Juan Teotihuacan, State

(L.) y por la calidad del fruto o tunas destaca *O. amyclaea* (L.) (Granados y Castañeda, 1997).

O. amyclaea se cultiva mucho en la región de San Martín de las Pirámides, en San Juan Teotihuacán, Estado de México. En esta especie de nopal se han observado diversos problemas sanitarios, atribuidos al ataque de patógenos, principalmente hongos y bacterias (García, 1979). En esta región ha aumentado una clase particular de daño en numerosas plantas de nopal, caracterizada por la presencia en los cladodios de pequeñas y numerosas manchas o moteados en forma de pequeños anillos, de color amarillo intenso a blanquecino (Figura 1). Los síntomas de manchas anulares amarillas son notables en brotes nuevos y pasan desapercibidos cuando los cladodios maduran. En ataques severos el cladodio afectado adquiere una coloración amarillenta generalizada, adelgazamiento y eventualmente marchitez, y los frutos reducen su tamaño, disminuyen su color y pierden sabor (observación personal).

Análisis preliminares de diagnóstico realizados en el Laboratorio de Microbiología de la UBIPRO (FES-IZTACALA-UNAM) no mostraron la presencia de hongos, bacterias o nematodos asociados a la sintomatología de manchas amarillas, y se sospechó que esta anomalía pudiera ser causada por algún virus o partículas semejantes a virus (Sosa, *et al.*, 1997).

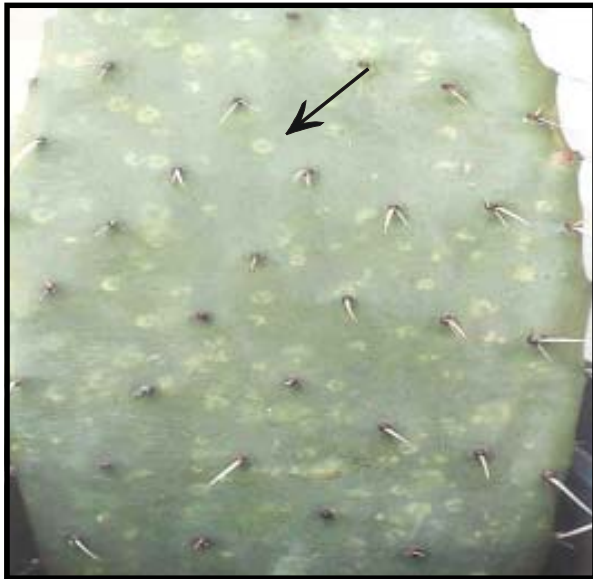


Figura 1. Síntomas de origen viral. Moteado y manchas anulares de color amarillo en el cladodio de una planta de nopal tunero cultivado en el municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México.

Figure 1. Viral symptoms. Mottle and yellow ringspots on the cladode of a fruit prickly pear plant cultivated in the municipality of San Martín de las Pirámides, State of Mexico.

of México. Diverse sanitary problems, attributed to pathogens mainly fungi and bacteria (García, 1979), have been observed in this species. In this region one particular class of damage has increased in numerous prickly pear plants, characterized by numerous small spots on the cladodes, or mottled with small intense yellow to whitish rings (Figure 1). The symptoms of yellow ringspots are notable in newly sprouted cladodes and are unnoticeable when the cladodes mature. In severe attacks the affected cladode acquires an overall yellowish color, becomes thin and eventually wilts; fruits are smaller, color diminishes and flavor is lost (personal observation).

Preliminary diagnostic analyses conducted in the microbiology laboratory of UBIPRO (FES-IZTACALA-UNAM) did not reveal the presence of fungi, bacteria or nematodes associated with yellow spot symptomatology, and it was suspected that this disorder could be caused by some virus or particles similar to virus (Sosa *et al.*, 1997).

Diverse species of virus that affect wild and cultivated plants of the Cactaceae family have been reported (Chessin and Leseman, 1972; Attothom *et al.*, 1978 b). The most frequent are *Cactus × virus* (CXV) and *Zygocactus × virus* (ZXV), which belong to the genus Potexvirus (Attothome *et al.*, 1978 a; Fuldi-Allah *et al.*, 1983; Chessin, 1989). Other viruses that frequently attack *Opuntia* are *Saguaro cactus virus* (SCV) (Milbrath and Nelson, 1972), belonging to the genus Carmovirus (Brunt *et al.*, 1996); *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), a Topovirus (Hausbeck and Geldow, 1991) and *Opuntia Sammons' virus* (OSV), member of the Tobamovirus group, which regularly infects *Opuntia engelmannii*, *O. vulgaris* and *O. basilaris* (Giri and Chessin, 1975; Wetter, 1989; Brunt *et al.*, 1996).

In México there is abundant literature on the taxonomy, ecology, physiology and agronomy of diverse species of cultivated or domesticated *Opuntia*, describing problems caused by pests and diseases and indicating causal agents. Most describe damage such as mosaic, chlorosis, ringspots, etc., which are attributed to probable virus or phytoplasma attacks, based on Chessin and Leseman (1972) and Milbrath and Nelson (1972). However, they do not include diagnostic tests that confirm the identity of virus in Mexican prickly pear. Therefore, considering the damage associated with yellow ringspots on fruit-producing prickly pear in the region of San Martín de las Pirámides and that little information is available in México to determine their cause, the objectives of this study were to characterize and identify possible viruses related to the yellow ringspots on *O. amyclaea*.

Se han reportado diversas especies de virus que afectan a plantas silvestres y cultivadas de la familia Cactaceae (Chessin y Leseman, 1972; Attothom *et al.*, 1978 b). Las más frecuentes son el *Cactus × virus* (CXV) y *Zygocactus × virus* (ZXV) que pertenecen al género Potexvirus (Attothom *et al.*, 1978 a; Fuld-Allah *et al.*, 1983; Chessin, 1989); otro es el *Saguaro cactus virus* (SCV) (Milbrath y Nelson, 1972), perteneciente al género Carmovirus (Brunt *et al.*, 1996); el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV), un Toposvirus (Hausbeck y Gildow, 1991) y *Opuntia Sammons' virus* (OSV), miembro del grupo Tobamovirus que infecta regularmente a *Opuntia engelmannii*, *O. vulgaris* y *O. basilaris* (Giri y Chessin, 1975; Wetter, 1989; Brunt *et al.*, 1996).

En México hay abundante literatura sobre taxonomía, ecología, fisiología y agronomía de diversas especies de *Opuntia* cultivadas o domesticadas. Se describen problemas causados por plagas y enfermedades, indicando los agentes causales. La mayoría señala la presencia de daños como mosaicos, clorosis, manchas anulares, etc., que se atribuyen a probables ataques de virus o fitoplasmas, con base en Chessin y Leseman (1972), y Milbrath y Nelson (1972). Sin embargo no se incluyen pruebas de diagnóstico que confirmen la identidad de algún virus en nopal en México. Por tanto, considerando los daños asociados a las manchas anulares amarillas del nopal tunero en la región de San Martín de la Pirámides, y por la carencia de información en México que permita determinar su origen, los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar e identificar los posibles virus relacionados con las manchas anulares amarillas en *O. amyclaea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en plantas indicadoras

Se separaron porciones de 1 cm² de epidermis de los cladodios con síntomas de manchas amarillas, con una navaja y pinzas de disección. Las porciones se maceraron en 5 mL de solución amortiguadora (fosfato de sodio 0.02 M, pH 7). El macerado se frotó, con un hisopo de algodón, en hojas cotiledonales o en las primeras hojas verdaderas de plántulas sanas de 16 especies indicadoras, previamente espolvoreadas con carborundum (Cuadro 1). Las hojas inoculadas se lavaron con agua para eliminar los residuos del macerado y del carborundum. Cada planta de las especies indicadoras se inoculó utilizando un hisopo de algodón diferente para evitar posibles contaminaciones por sustancias inhibitorias u otros virus. Las plantas con hojas inoculadas se incubaron en invernadero (25-35 °C, 70% de humedad relativa y 12 horas luz) hasta por 30 d registrando el tipo de síntomas presente en cada especie indicadora. Los ensayos de separación de virus a partir de macerados

Cuadro 1. Síntomas en plantas indicadoras y diferenciales inoculadas con el virus relacionado con manchas amarillas del nopal tunero.

Table 1. Symptoms in indicator and differential plants inoculated with the virus related to yellow ringspots on fruit prickly pear.

Hospedantes	Síntomas
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Lln
<i>N. rustica</i> L.	Lln
<i>N. benthamiana</i> L.	Lln
<i>N. tabacum</i> var. xanthi L.	Lln
<i>N. tabacum</i> var. White Burley L.	Lln, Mos
<i>Datura stramonium</i> L.	Lln
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Ss
<i>C. amaranticolor</i> Coste & Reyn	Llc
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Lln
<i>Cucumis sativus</i> L.	Ss
<i>Cucurbita pepo</i> L.	Ss
<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	Ss
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	Ss
<i>Vicia fabae</i> L.	Ss
<i>Pisum sativum</i> L.	Ss
<i>Capsicum annuum</i> L. Ancho L.	Lln, Mos
<i>Lycopersicon esculentum</i> M.	Ss

Llc = lesiones locales cloróticas; Mos = mosaico; Lln = lesiones locales necróticas; Ss = sin síntomas.

MATERIALS AND METHODS

Separation of virus and susceptibility tests in indicator plants

One cm² portions of epidermis were separated from cladodes with yellow spot symptoms using a razor and dissection forceps. The portions were macerated in 5 mL of buffer solution (sodium phosphate 0.02 M, pH 7). The macerate was rubbed, with a cotton swab, on cotyledonal leaves or on the first true leaves of healthy seedlings of 16 indicator species previously dusted with carborundum (Table 1). The inoculated leaves were washed with water to eliminate residues of the macerate and carborundum. Each of the indicator plant species was inoculated using a different cotton swab to avoid possible contamination by inhibitor substances or other viruses. The plants with inoculated leaves were incubated in a greenhouse (25-35 °C, 70% relative humidity, 12 h light) up to 30 d, during which the type of symptom that appeared in each indicator species was recorded. Assays of separation of virus using macerates of cladode epidermis was repeated another three times and in each assay the same number of species of healthy non-inoculated plants was used.

Indicator plants with symptoms, localized lesions with mosaic (systemic symptoms), were separated after the period of incubation in the greenhouse and their leaves were macerated to inoculate another 16 healthy indicator plants to obtain pure isolates of the virus. This test was repeated three times with the method described above (Kurstak, 1981; Dijkstra and KeJager, 1998).

de epidermis de cladodios de nopal se repitieron en tres ocasiones más, y en cada ensayo se incluyó el mismo número de especies de plantas sanas sin inocular.

Se separaron las plantas indicadoras con síntomas que presentaron lesiones locales o con mosaicos (síntomas sistémicos) después del periodo de incubación en el invernadero y se maceraron sus hojas para inocular otras 16 plantas indicadoras sanas, para obtener aislados puros de virus. Este ensayo se repitió tres ocasiones con el método ya descrito (Kurstak, 1981; Dijkstra y De Jager, 1998).

Las plántulas de las especies indicadoras usadas para separar y caracterizar de los virus asociados en el nopal e inoculadas por transmisión mecánica, fueron producidas desde semilla libres de virus en invernadero y pertenecen al Banco de Semillas del Laboratorio de Virología del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo.

Por la dificultad de producir rápidamente plantas de nopal tunero desde semillas, o usar plantas certificadas como libres de virus no se realizaron ensayos de transmisión mecánica de virus en esta especie, por lo que no se pudieron verificar los postulados de Koch.

Microscopía electrónica

En una rejilla de cobre cubierta con forvan se colocaron 50 mL del macerado de epidermis de cladodios de nopal con síntomas de manchas anulares amarillas y en otra rejilla la misma cantidad de macerado de hojas de las plantas indicadoras con lesiones locales o mosaicos. Las muestras se incubaron 10 min, posteriormente se adicionó 50 mL del fijador glutaraldehído y 50 mL de acetato de uranilo, incubando 10 min y lavando con agua destilada estéril en cada paso. La observación, medición y toma de microfotografías de las partículas virales se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Mod. JEOL 100 CX (Dijkstra y De Jager, 1998).

Detección por inmunoadsorción ligado a enzimas (DAS-ELISA)

Se utilizó la técnica de inmunoadsorción enzimática en fase sólida de doble sándwich (DAS-ELISA), en dos días (Clark y Adams, 1977), para detectar virus en las muestras de campo de nopal y en plantas indicadoras. Por la carencia de antisueros específicos de los distintos virus reportados en cactáceas, en este trabajo se utilizaron antisueros policlonales comerciales (Agdia, Co. USA) disponibles en nuestro laboratorio, de los virus mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*. TMV. Tobamovirus) y marchitez manchada del tomate (*Tomato spotted wilt virus*. TSWV. Tosposvirus), considerando los reportes de que algunas especies de estos géneros afectan a cactáceas y que podrían tener alguna posible reacción serológica estos antisueros comerciales (Hausbeck y Gildow, 1991; Wetter, 1989).

La absorbencia de las posibles reacciones antígeno-anticuerpo se registró en un Microlector con filtro de 492 nm, 20-30 min después de añadir el sustrato. La reacción se consideró positiva si la absorbencia fue igual o superior a la lectura del testigo positivo para los virus probados. Se usaron macerados de tejidos de plantas sanas

The indicator plant seedlings used for separation and characterization of the viruses associated with prickly pear and inoculated by mechanical transmission, were produced in a greenhouse from virus-free seed belonging to the Seed Bank of the virology laboratory of the Department of Parasitology of the Universidad Autónoma Chapingo.

Because of the difficulty of producing fruit prickly pear rapidly from seed, or of using plants certified as virus-free, no mechanical transmission tests were conducted in this species, and thus the Koch postulates could not be verified.

Electronic microscopy

Fifty mL of the macerate of prickly pear cladode epidermis with yellow ring spot symptoms was placed a copper screen covered with Formvar and the same amount of macerate of indicator plant leaves with localized lesions or mosaics was placed in another screen. These samples were incubated for 10 min, and 50 mL of the fixative glutaraldehyde and 50 mL of uranyl acetate was then added, incubated for 10 min and washing with sterile distilled water in each step. Observation, measurement and microphotography of the virus particles were performed in an electronic transmission microscope Mod. JEOL 100 CX (Kijkstra and De Jager, 1998).

Detection by enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)

The two-day solid phase double antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent (DAS-ELISA) technique was used (Clark and Adams, 1977) to detect viruses in the prickly pear field samples and indicator plants. Because specific antisera for the different viruses reported in cactuses were lacking, in this study commercial polyclonal antisera (Agdia Co., USA) available in our laboratory were used: those of *Tobacco mosaic virus* (TMV Tobamovirus) and Tomato spotted wilt virus (TSWV, Tosposvirus), considering that reports indicate that some species of these genera affect cactuses and could have some possible serological reaction to these commercial antisera (Hausbeck and Gildow, 1991; Wetter, 1989).

Absorbance of the possible antigen-antibody reactions were registered in a micro-reader with a 492 nm filter, 20-30 min after addition of the substrate. The reaction was considered positive if absorbance was equal to or higher than the positive check for the tested viruses. Macerates of healthy *N. tabacum* var. *xanthi* plant tissues were used as negative checks (Kemeny and Challacombe, 1988).

Replicative RNA analysis (dsRNA)

Extraction and analysis of viral double-stranded RNA was conducted according to Valverde *et al.* (1990) using field collected prickly pear cladodes with symptoms and *N. tabacum* var White Burley leaves exhibiting mosaic symptoms 25 d after inoculation with macerates of cladode epidermis with yellow ring spot symptoms; dsRNA obtained from healthy plants of these two species were used

de *N. tabacum* var. *xanthi* como testigos negativos (Kemeny y Challacombe, 1988).

Análisis de ARN replicativo (ARN-dc)

La extracción y análisis del ARN viral de doble cadena se realizó según de Valverde *et al.* (1990), a partir de cladodios de nopal recolectados en campo con síntomas, y de hojas de *N. tabacum* var. White Burley, que mostraron síntomas de mosaico 25 d después de inoculadas con macerados de epidermis de cladodios con síntomas de manchas anulares amarillas. Se utilizó el ARN-dc obtenido de plantas sanas de estas dos especies como testigos negativos. Para demostrar la naturaleza del ARN-dc del ácido nucleico viral obtenido de las plantas inoculadas, parte del ARN-dc y previo a la electroforesis, fue tratado en forma independiente con ADNasa y ARNasa pancreática, utilizando 40 μ L de ARN-dc de la muestra y 1 μ L de ADNasa o ARNasa, incubando por 1 h a 35 °C para realizar inmediatamente la electroforesis (Valverde *et al.* 1990).

El ARN-dc se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida (6%), utilizando un minigel (1.75 mm \times 7 cm \times 8 cm) montado en una cámara Biorad doble. El volumen del extracto de ARN-dc viral de las muestras fue 40 μ L por carril. Se incluyeron como marcadores de peso molecular muestras de ARN-dc de TMV para calcular el peso molecular. Las condiciones de electroforesis fueron 100 V por 2:15 h a temperatura de laboratorio. Los geles fueron teñidos con solución de nitrato de plata (0.011 M) (Valverde *et al.*, 1990).

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

Se diseñó un protocolo para la detección molecular de Tobamovirus por rt-PCR, ya que frecuentemente se detecta estos virus infectando al género *Opuntia*. Se usaron y alinearon secuencias del gen de la proteína de la cápside de especies de Tobamovirus, disponibles en el Genbank (NCBI, 2002), seleccionándose una región consenso altamente conservada para el diseño de los oligonucleótidos TMV/CPF (5'-GCIYTIGGIAAYCARTTYCARACI CAR CA-3') y TMV/CPR (5'-IGCRTCIARIGTYTCIGCIGTIGTI GGRTT-3') y que amplifican un fragmento de 250 pb.

Se obtuvo ARN total de 5.0 g de tejidos de cladodios de nopal con síntomas de manchas anulares amarillas, de hojas de *N. tabacum* var. White Burley inoculadas con el virus de nopal y con síntomas de mosaico, así como de hojas de *N. tabacum* var. *xanthi* inoculadas con el TMV como testigo positivo, y se usaron macerados de tejidos de plantas sanas de *N. tabacum* var. *xanthi* como testigos negativos. Se maceraron los tejidos en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, que se mezcló con el amortiguador de guanidino (guanidín 8 M, MOPS 50 mM y EDTA 50 mM) (Surzyski, 2000).

Para la síntesis de cDNA se colocó en un tubo de Eppendorf 1.5 mL de ARN de la muestra (concentración de 100 ng), 1 μ L del oligonucleótido TMV/CPF y 1 μ L del oligonucleótido TMV/CPR, (concentración de 10 mM). La mezcla de reacción se incubó a 72 °C durante 10 min, se centrifugó por 30 s a 6500 g y se incubó en hielo. En otro tubo Eppendorf se preparó una segunda mezcla con 2 μ L de

as negative checks. To demonstrate the nature of dsRNA from viral nucleic acid obtained from inoculated plants, part of the dsRNA, previous to electrophoresis, was treated independently with pancreatic DNAase or RNAase using 40 μ L of dsRNA of the sample and DNAase or RNAase; this was incubated for 1 h at 35 °C to perform electrophoresis immediately (Valverde *et al.*, 1990).

The dsRNA was analyzed by electrophoresis in polyacrylamide gels (6%) using a minigel (1.75 mm \times 7 cm \times 8 cm) mounted in a double Biorad chamber. The volume of viral dsRNA from the samples was 40 μ L per track. Samples or dsRNA from TMV were included as molecular weight markers to calculate molecular weight. The conditions of electrophoresis were 100 V for 2:15 h at laboratory temperature. The gels were dyed with a solution of silver nitrate (0.11 M) (Valverde *et al.*, 1990).

Reverse transcription-polymerase chain reaction (rt-PCR)

A protocol was designed for molecular detection of Tobamovirus by rt-PCR. Since these viruses are frequently found infecting the genus *Opuntia*, sequences of the Tobamovirus capsid protein gene available in the Genebank (NCBI, 2002) were used and aligned. A highly conserved consensus region was selected for the design of the oligonucleotides TMV/CPF (5'-GCIYTIGGIAAYCARTTYCARACI RACICARCA-3') and TMV/CPR (5'-IGCRTCIARIGTYTCIG CIGTIGTIGGRTT-3') and which amplify a fragment of 250 pb.

Total RNA was obtained from 5.0 g of prickly pear cladode tissue with yellow ring spot symptoms, from *N. tabacum* var. White Burley inoculated with the prickly pear virus and exhibiting mosaic symptoms, and from *N. tabacum* var. *xanthi* inoculated with *tobacco mosaic virus* TMV used as the positive check, and from tissue macerates of healthy *N. tabacum* var. *xanthi* as the negative check. Tissues were macerated to fine powder in a mortar with liquid nitrogen and mixed with guanidine buffer (guanidine 8 M, MPS 50 mM and EDTA 50 mM) (Surzyski, 2000).

For cDNA synthesis, 1.5 mL RNA of the sample (concentration of 100 ng), 1 μ L of TMV/CPF oligonucleotide and 1 μ L of the TMV/CPR oligonucleotide (concentration of 10 mM) were placed in an Eppendorf tube. The reaction mixture was incubated at 72 °C during 10 min, centrifuged for 30 s at 6500 g and incubated on ice. In another Eppendorf tube a second mixture with 2 μ L of first strand tampon for superscript (Invitrogen 5x, 1 μ L 20 mM DTT, 1 μ L dNTP'S at 10 mM per nucleotide. The mixture was combined with the first tube and reverse transcription polymerase Superscript (Invitrogen) was added. The total mixture was incubated at 41 °C for 90 min. The polymerase chain reaction (PCR) was done by mixing in a tube (1.5 mL), 2.5 μ L PCR 10 buffer solution (Tris-HCl, pH 9.40 mM, Kac 15 mM, MgAc3.5 mM, BSA 3.75 μ g mL⁻¹), 20 μ L water, 0.5 μ L TMV/CPR oligonucleotide, 2.5 μ L dNTPs 10 mM, 2 μ L cDNA, and 1 μ L Taq polymerase (Perkin-Elmer). The mixture was placed in a thermocycler (GeneAmp PCR System 2400) using the following amplification program: denaturalization 2 min at 95 °C, coupling 2 min at 56 °C, and extension 2 min at 72 °C, for 31 cycles (Gutiérrez *et al.*, 2004).

tampón de primera cadena para superscript (Invitrogen) 5x, 1 μ L 20 mM de DTT, 1 μ L de dNTP'S a 10 mM por nucleótido. La mezcla se agregó al primer tubo y se adicionó 1 μ L de transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). La mezcla total se incubó a 42 °C durante 90 min. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se hizo mezclando en un tubo (1.5 mL), 2.5 μ L de solución amortiguadora PCR 10x (Tricina-KOH, pH 9.40 mM, Kac 15 mM, MgAc 3.5 mM, BSA 3.75 μ g mL⁻¹), 20 μ L de agua, 0.5 μ L del oligonucleótido TMV/CPF, 0.5 μ L del oligonucleótido TMV/CPR, 2.5 μ L de dNTPs 10 mM, 2 μ L de cDNA y 1 μ L de Taq polimerasa (Perkin-Elmer). La mezcla se colocó en un termociclador (GeneAmp PCR System 2400), usando el siguiente programa de amplificación: desnaturalización 2 min a 95 °C, apareamiento 2 min a 56 °C y extensión 2 min a 72 °C, por 31 ciclos (Gutiérrez *et al.*, 2004).

Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.0% y su peso molecular se calculó por comparación con el marcador de peso molecular 1 kb plus (GIBCO BRL) que se incluyó en el mismo gel de electroforesis. Las condiciones de electroforesis fueron 65 V/80 min a temperatura de laboratorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en plantas indicadoras

Varias especies de las plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con los macerados de la epidermis de cladodios de plantas de nopal tunero con manchas anulares amarillas, mostraron síntomas 15 d después de la inoculación mecánica en invernadero, que se asoció a la transmisión de alguna clase de virus. Sin embargo, la mayoría de los síntomas se presentaron 30 o 40 d después de la inoculación.

El desarrollo de síntomas en las diferentes plantas hospedantes indicadoras inoculadas fue notablemente favorecido a temperaturas mayores a 30 °C, y hubo remisión de síntomas en todos los hospedantes a temperaturas inferiores.

Los síntomas observados incluyeron pequeñas lesiones locales cloróticas y después necróticas, sin daños sistémicos, en *N. rustica*, *N. glutinosa* (Figura 2 A), *N. tabacum* var. Xanthi, *Ch. amaranticolor* (Figura 2 B), *Ch. quinoa*, y *G. globosa*. Únicamente en plantas de *N. tabacum* var. White Burley (Figura 2 C) y *C. annuum* se observaron primero lesiones locales necróticas y después un leve mosaico en hojas nuevas, lo que indicó un movimiento sistémico del agente causal. Sin embargo, el síntoma de mosaico en ambas especies desapareció pocos días después, sin que la planta inoculada mostrara efectos posteriores o daños colaterales. No se observaron síntomas de ninguna clase en plantas de *Phaseolus vulgaris* var. Pinto y var. Negro Veracruz, *Vicia fabae*, *Pisum sativum* u otras especies utilizadas en el presente trabajo (Cuadro 1).

PCR products were analyzed by electrophoresis in agarose gels at 1.0% and their molecular weight was calculated by comparison with the molecular weight marker 1 kb plus (GIBCO BRL) which was included in the same electrophoresis gel. The conditions of electrophoresis were 65 V/80 min at laboratory temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Separation of virus and susceptibility tests in indicator plants

Several species of indicator plants inoculated mechanically with macerates of fruit prickly pear cladode epidermis with yellow ringspots exhibited symptoms 15 d after mechanical inoculation in the greenhouse. The symptoms were associated with transmission of a type of virus. However, most of the symptoms appeared 30 or 40 d after inoculation.

The development of symptoms in the different inoculated indicator host plants was markedly favored by temperatures above 30 °C, and at lower temperatures symptoms remitted in all of the hosts.

The symptoms observed included small localized chlorotic lesions which later became necrotic, without systemic damage, in *N. rustica*, *N. glutinosa* (Figure 2 A), *N. tabacum* var. Xanthi, *Ch. amaranticolor* (Figure 2 B), *Ch. quinoa*, and *G. globosa*. Only in *N. tabacum* var. White Burley (Figure 2C) and *C. annuum* plants were localized necrotic lesions observed first and later a tenuous mosaic in new leaves, indicating systemic movement of the causal agent. However, the mosaic symptom in both species disappeared a few days later, with no after effects or collateral damage in the inoculated plants. No symptoms of any kind were observed in plants of *Phaseolus vulgaris* var. Pinto and var. Negro Veracruz, *Vicia fabae*, *Pisum sativum* or other species used in this study (Table 1).

Considering that the damage observed in the indicator plants was consistent, all of the mechanical transmission tests confirmed the presence of at least one virus in fruit prickly pear associated with yellow ring spot symptoms. Taking into account the time symptoms took to appear, the size and number of necrotic lesions, systemic damage in only two plant species, and remission of the symptoms in most of the indicator host species, the virus separated from fruit prickly pear is not severe and does not widely affect indicator hosts at the greenhouse temperatures at which the experiments were conducted. Therefore, it is possible that at temperatures above 30 °C its severity may differ.



Figura 2. Síntomas causados por un virus separado de plantas de nopal tunero y verdulero por transmisión mecánica: A) lesiones locales necróticas en *N. glutinosa*; B) lesiones locales necróticas en *Ch. amaranticolor*; C) mosaico en *N. tabacum* var. White Burley, en invernadero.

Figure 2. Symptoms caused by a virus separated from fruit and vegetable prickly pear plants by mechanical transmission: A) localized necrotic lesions in *N. glutinosa*; B) localized necrotic lesions in *Ch. amaranticolor*; C) mosaic in *N. tabacum* var. White Burley, in greenhouse.

Considerando la consistencia de los daños observados en las plantas indicadoras, en todos los ensayos de transmisión mecánica se confirmó la presencia de al menos un virus en las plantas de nopal tunero asociado con los síntomas de manchas anulares amarillas. Tomando en cuenta el tiempo de aparición de síntomas, el tamaño y número de las lesiones necróticas, los daños sistémicos en sólo dos especies de plantas, y la remisión de síntomas en la mayoría de las especies hospedantes indicadoras, el virus separado de nopal tunero es una especie poco severa, con poca amplitud de hospedantes indicadoras, en las temperaturas de invernadero en que se realizaron los experimentos. Por tanto, es posible que a temperaturas mayores de 30 °C la severidad de este virus sea diferente.

Microscopía electrónica

Se observaron partículas en forma de varilla rígida, con una longitud aproximada de 300-350 nm, únicamente de las preparaciones procedentes de los macerados de plantas de *N. tabacum* var. White Burley con síntomas de mosaico. Por comparación con otros virus que afectan a plantas, éste comparte sus características con las descritas para miembros del grupo Tobamovirus (Figura 3). No se observaron partículas virales de los macerados obtenidos de los tejidos de los cladodios con síntomas de manchas anulares amarillas. Probablemente la naturaleza mucilaginosa de los tejidos de los cladodios del nopal impidió la fijación de las partículas virales a la superficie de la rejilla de cobre para su observación, aunque también es posible que hubiera

Electronic microscopy

Rigid bar-shaped particles approximately 300-350 nm long were observed only in the preparations from macerates of *N. tabacum* var. White Burley with mosaic symptoms. By comparison with other viruses that affect plants, this virus shares characteristics with those of the Tobamovirus group (Figure 3). No viral particles were observed in the macerates obtained from tissue of cladodes with yellow ring spot symptoms. It is likely that the mucilaginous nature of the prickly pear cladode tissues impeded viral particles from fixing on the copper screen surface for their observation, although it is also possible that there was a reduced number of viral particles in the cladode tissues when they were macerated (Dijkstra and De Pater, 1998).

Detection by enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA)

The tests on host plant tissues inoculated with the virus separated from prickly pear with this technique were negative in all of the cases for the antisera used in this experiment. The results indicate that the fruit prickly pear virus associated with yellow ring spot symptoms had no close serological relationship with any of the viruses whose antisera were tested in this study; it is likely that it is a distinct species that requires serological characterization (Chantler and Clayton, 1988). Nor were the tests positive on tissues of cladodes with yellow ringspots positive, confirming that the prickly pear virus has no serological relationships, although it is possible that the mucilage in this species

un reducido número de partículas virales en los tejidos macerados de los cladodios al momento de utilizarlos (Dijkstra y De Pater, 1998).

Detección por inmunoadsorción ligada a enzimas (DAS-ELISA)

Las pruebas con esta técnica usando los tejidos de las plantas indicadoras inoculadas con el virus separado de nopal fueron negativas en todos los casos, para los antisueros usados en este experimento. Los resultados indican que el virus de nopal tunero asociado con los síntomas de manchas anulares amarillas no tiene relaciones serológicas cercanas con ninguno de los virus cuyos antisueros se probaron en el presente trabajo, o probablemente es una especie distinta que se debe caracterizar serológicamente (Chantler y Clayton, 1988). Tampoco fueron positivos los ensayos cuando se usaron tejidos de cladodios con síntomas de manchas anulares amarillas, lo cual confirmó que el virus del nopal no tiene relaciones serológicas, aunque es posible que el mucílago en esta especie interfirió con el procedimiento de la técnica ELISA (Kemeny y Challacombe, 1988).

Análisis de ARN replicativo (ARN-dc)

El análisis electroforético en geles de poliacrilamida al 6% del ARN-dc de origen viral extraído de plantas de *N. tabacum* var. White Burley, con síntomas de mosaico con anillos cloróticos, producto de la inoculación con extractos de cladodios de plantas enfermas, mostró un perfil electroforético compuesto de dos bandas, una de 4.3 y otra de 1.3×10^6 Daltons (figura no incluida). El patrón electroforético fue similar al del ARN-dc de un aislamiento de TMV como muestra positiva con el que se comparó (Valverde *et al.*, 1990). No se observaron bandas adicionales cuando se agregó ARNasa a los extractos de ARN-dc obtenidos de *N. tabacum* var. White Burley con síntomas de mosaico. El patrón electroforético de dos bandas se conservó con el tratamiento de ADNasa. Sin embargo, el patrón electroforético observado permitió establecer que el genoma del virus separado de cladodios de plantas con síntomas de manchas anilladas coincide con el patrón electroforético típico de TMV usado como patrón de referencia (Valverde *et al.*, 1990). Finalmente, los análisis electroforéticos de cladodios de nopal tunero no permitieron observar algún patrón de bandas de ARN-dc como el observado en plantas indicadoras, debido principalmente a la abundancia de sustancias mucilaginosas que impidió el proceso de extracción de ARN-dc en las columnas de celulosa.

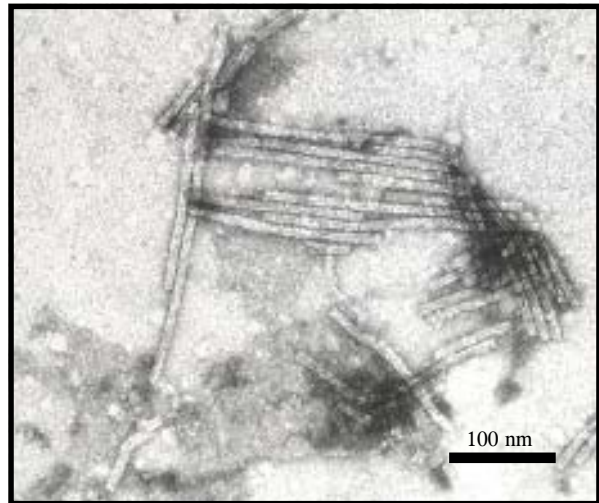


Figura 3. Partículas en forma de varilla rígida (300-350 nm) de un virus asociado a manchas anulares amarillas en nopal tunero. La preparación fue obtenida de tejidos de *N. tabacum* var. infectada White Burley con este virus.
Figure 3. Rigid bar-shaped particles (300-350 nm) of a virus associated with yellow ringspots in fruit prickly pear. Preparation obtained from tissues of *N. tabacum* var. White Burley infected with this virus.

interfered with the ELISA technique procedure (Kemeny and Challacombe, 1988).

Double-stranded RNA (dsRNA) analysis

The electrophoretic analysis in polyacrylamide gel at 6% of dsRNA extracted from *N. tabacum* var. White Burley plants exhibiting mosaic with chlorotic ring symptoms induced by inoculation with extracts from cladodes of diseased plants showed an electrophoretic profile composed of two bands, one 4.3 and the other 1.3×10^6 Daltons (figure not included). The electrophoretic pattern was similar to that of dsRNA from the positive check, an isolate of TMV, with which it was compared (Valverde *et al.*, 1990). No additional bands were observed when RNAase was added to the dsRNA extracts obtained from *N. tabacum* var. White Burley with mosaic symptoms. The two-band electrophoretic pattern persisted with the RNAase treatment. However, the electrophoretic pattern observed established that the virus genome separated from cladodes with yellow ringspots coincides with the electrophoretic pattern typical of TMV used as a reference pattern (Valverde *et al.*, 1990). Finally, the electrophoretic analyses of the fruit prickly pear cladodes did not produce a band pattern of dsRNA like that observed in indicator plants, due mainly to the abundance of mucilaginous substances that impeded the process of dsRNA extraction in the columns of cellulose.

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

El ensayo de la rt-PCR produjo una banda de 250 pb que coincidió en tamaño con el fragmento predicho cuando se diseñaron los oligonucleótidos CPF/CPR específicos para el grupo Tobamovirus (Figura 4 carril B), que fue idéntica a la banda obtenida con el ARN del TMV usada como testigo positivo (Figura 4 carril C). El ensayo de la rt-PCR sólo fue positivo cuando se usó ARN procedente de plantas indicadoras inoculadas con el virus de nopal, y negativo cuando se usó el tejido de cladodios con síntomas de manchas anulares amarillas como fuente de ARN, probablemente debido a la presencia de mucílago en el material.

Considerando en conjunto los resultados, se determinó que los síntomas de manchas anulares de color amarillo en plantas de nopal tunero (*Opuntia amyclae*) están asociadas con un virus que por sus características morfológicas pertenece al grupo de los Tobamovirus (Brunt *et al.*, 1996). Este virus pudo transmitirse mecánicamente con relativa facilidad a plantas diferenciales e indicadoras en invernadero, e infectó a un reducido número de hospedantes indicadoras. El desarrollo de los síntomas, la mayoría en forma de lesiones locales necróticas, fue notablemente lento y sólo en dos hospedantes se observó el desarrollo de síntomas sistémicos. A temperaturas mayores a 30 °C se acortó el tiempo de aparición de síntomas, pero no se incrementó su severidad. Estas características indican que el virus separado de nopal tunero es una variante dentro del grupo de los Tobamovirus, que se confirmó parcialmente mediante la amplificación de un fragmento del gene de la proteína de la cápside (CP), por rt-PCR usando oligonucleótidos degenerados y específicos para el grupo Tobamovirus.

El grupo de los Tobamovirus, cuya especie tipo es el virus mosaico del tabaco (TMV), incluye a muchas de las especies y variantes agresivas más comunes de virus ampliamente distribuidas en el mundo, que infectan a plantas cultivadas y silvestres, con una alta estabilidad a temperaturas extremas, sobrevivencia en desechos vegetales y gran facilidad para transmitirse mecánicamente a un gran número de especies de plantas. Aunque no se conocen insectos vectores, muchos de los Tobamovirus pueden ser distribuidos por las semillas y algunos incluso por el polen de sus hospedantes susceptibles (Kurstak, 1981; Brunt *et al.*, 1996).

Se han reportado diversas especies de virus que afectan a plantas silvestres y cultivadas de la familia Cactaceae (Chessin y Leseman, 1972; Brunt *et al.*, 1996). Sin embargo, *Opuntia Sammon' virus* es la única especie dentro de los Tobamovirus que infecta cactáceas, con relaciones morfológicas y serológicas

Reverse transcription-polymerase chain reaction (rt-PCR)

The rt-PCR assay produced a 250 pb band that coincided in size with the predicted fragment when the specific oligonucleotides CPF/CPR were designed for the Tobamovirus group (Figure 4, track A). This band was identical to the band obtained with RNA from the TMV used as a positive check (Figure 4, track B). The rt-PCR assay was positive only when RNA from indicator plants inoculated with the prickly pear virus was used and negative when cladode tissue with symptoms of yellow ringspots was used as the source of RNA, probably due to the presence of mucilage in the material.

Considering the results together, it was determined that the yellow ringspot symptoms in fruit prickly pear (*Opuntia amyclae*) are associated with a virus that, because of its morphological characteristics, belongs to the Tobamovirus group (Brunt *et al.*, 1996). This virus could be transmitted mechanically with relative ease to differential and indicator plants in the greenhouse, and it infected a small number of indicator hosts. The development of the symptoms, most in the form of localized necrotic lesions, was markedly slow,

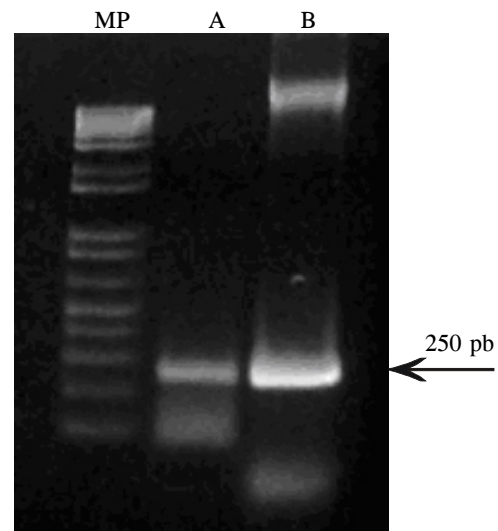


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de productos de RT-PCR específico para tobamovirus. Carril A) Virus del nopal tunero separado de tejidos *N. tabacum* var. White Burley; carril B) Virus del mosaico del tabaco (TMV) separado de tejidos de *N. tabacum* var. Xanthi; MP (marcador de peso molecular 100 pb).

Figure 4. Electrophoresis in 1.0% agarose gel of rt-PCR products specific for Tobamovirus. Track A) Virus of fruit prickly pear separated from *N. tabacum* var. White Burley tissue; track B) Tobacco mosaic virus (TMV) separated from *N. tabacum* var. Xanthi tissue; MP (molecular weight marker 100 pb).

con algunas variantes del TMV y al igual que éste, se han observado variantes atenuadas y severas, según el hospedante del género *Opuntia* que infecten (Sammons y Chessin, 1961; Giri y Chessin, 1975).

Por sus características biológicas y morfológicas, el virus separado de plantas de nopal tunero (*O. amyclae*) es sin duda un miembro del grupo Tobamovirus, relacionado probablemente con el *Opuntia Sammons' virus*. Sin embargo, el virus separado de nopal tunero es una variante poco agresiva, dado el tiempo de aparición de síntomas, el tamaño y número de las lesiones necróticas, los daños sistémicos en sólo dos especies de plantas y la remisión de síntomas en la mayoría de las especies hospedantes indicadoras. Así el virus separado de nopal tunero es una especie poco severa con poca amplitud de hospedantes indicadoras, bajo las temperaturas de invernadero en que se realizaron los experimentos. Entonces es posible que a temperaturas mayores a 30 °C varíe la severidad de este virus.

Por los daños asociados a las manchas anulares amarillas en plantas de nopal tunero en la región centro de México y de las que se separó un virus perteneciente al grupo de los Tobamovirus, se deben aspectos biológicos y moleculares de este virus. Es necesario conocer su distribución en México y confirmar la posible presencia de otras especies de virus en nopal tunero en México.

CONCLUSIONES

Los síntomas de las manchas anulares amarillas del nopal tunero se relacionaron con la infección de un virus del tipo ARN de cadena sencilla, mecánicamente transmisible a un reducido número de especies de plantas indicadoras, con morfología de la partícula viral del tipo de varilla rígida, semejante a los Tobamovirus, pero sin relación serológica con el antisuero del TMV con el que se comparó. Se confirmó que este virus es una especie de Tobamovirus por reacción de la transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR), utilizando oligonucleótidos degenerados. Dados los síntomas desarrollados en hospedantes indicadoras susceptibles y la morfología viral, el virus separado del nopal tunero se identificó como una variante relacionada con el *Opuntia Sammons' virus*, especie de Tobamovirus que se ha encontrado en otras especies de *Opuntia* en el mundo.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, México, Proyecto IN-225205-3 y por el proyecto SAGARPA-

and only in two hosts were systemic symptoms observed. At temperatures above 30 °C the time for symptoms to appear shortened, but severity did not increase. These characteristics indicate that the virus separated from fruit prickly pear is a variant of the Tobamovirus group, a conclusion that was partially confirmed by the amplification of a fragment of the protein capsid gene (CP) with rt-PCR using degenerate, specific oligonucleotides for the Tobamovirus group.

The Tobamovirus group, whose species type is the *Tobacco mosaic virus* (TMV), includes many of the most common aggressive species and variants of viruses widely distributed around the world that infect cultivated and wild plants. These viruses are highly stable in extreme temperatures and survive in plant residues; they are easily transmitted mechanically to a large number of plant species. Although no insect vectors are known, many Tobamoviruses can be dispersed by seed and some even by the pollen of their susceptible hosts (Kurstaik, 1981; Brunt *et al.*, 1996).

Diverse species of viruses that affect cultivated and wild plants of the Cactaceae family have been reported (Chessin and Leseman, 1972; Brunt *et al.*, 1996). However, *Opuntia Sammons' virus* is the only species of the Tobamovirus group that infects cactuses. This has morphological and serological relationships with some variants of TMV and, like TMV, attenuated and severe variants have been observed on different hosts of the genus *Opuntia* (Sammons and Chessin, 1961; Giri and Chessin, 1975).

By its biological and morphological characteristics the virus separated from fruit prickly pear plants (*O. amyclae*) is undoubtedly a member of the Tobamovirus group, probably related to *Opuntia Sammons' virus*. However, the virus separated from fruit prickly pear is not a very aggressive variant given the time in which symptoms appear, the size and number of necrotic lesions, the systemic damage to only two plant species and the remission of symptoms in most of the indicator host species. Thus, the virus separated from fruit prickly pear plants is a species with low severity and a small scope of indicator hosts affected under the greenhouse temperature conditions in which the experiments were conducted. It is thus possible that at temperatures above 30 °C severity could vary.

Given the damage associated with yellow ring spot in fruit prickly pear in the central region of México from which a virus belonging to the Tobamovirus group was separated, there are still biological and molecular aspects of this virus to be studied. It is necessary to determine its distribution and confirm the possible presence of other species of virus in fruit prickly pear in México.

CONACYT 077, con apoyo logístico del Departamento de Parasitología de la Universidad Autónoma Chapingo.

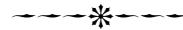
LITERATURA CITADA

- Attothom S., L. G. Weathers, and D. J. Gumpf. 1978a. Occurrence and distribution of a virus-induced disease of barrel cactus in California. *Plant Dis. Repr.* 62: 228-231.
- Attothom S., L. G. Weathers, and D. J. Gumpf. 1978b. Identification and characterization of a potexvirus from California barrel cactus. *Phytopathology* 68: 1401-1406.
- Brunt A. A., K. Crabtree, J. Dallwitz, M. J. Gibbs, A. L. Watson, and J. E. Zurcher (eds). 1996. Tobamoviruses. *Plant Viruses Online: description and Lists from the VIDE database*. Versión: 16th January 1997. URL. (15 may 2006).
- Chantler, M.S., and A. L. Clayton. 1988. The use of ELISA for rapid viral diagnosis: Viral antigen detection in clinical specimens. pp: 279-301. *In: Kemeny, D. M., and S. J. Challacombe (eds). ELISA and other Solid Phase Immunoassays. J. Wiley and Sons. New York.* pp: 279-301.
- Chessin, M. 1989. *Zygocactus Montana X potexvirus*. *In: Brunt A. A., K. Crabtree, J. Dallwitz, M. J. Gibbs, A. L. Watson, and J. E. Zurcher (eds). Plant Viruses Online: description and Lists from the VIDE database*. Versión: 16th January 1997. URL. (15 mayo, 2006).
- Chessin M., and D. E. Lesemann. 1972. Distribution of cactus viruses in wild plants. *Phytopathology* 62: 97-99.
- Clark M. F., and M. A. Adams. 1977. Characteristics of microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475- 483.
- Dijkstra J., and P. C. De Jager. 1998. *Practical Plant Virology. Protocols and Exercises*. Edit. Springer, Berlin. 459. p.
- Fuld-Allah, A. E.-S. A., L. G. Weathers, and F. C. Greer, Jr. 1983. Characterization of a potexvirus isolated from night-blooming cactus. *Plant Dis.* 67: 438-440.
- García, A. M. 1979. *Enfermedades de las Plantas en la República Mexicana*. Ed. Limusa. México. 93 p.
- Giri L., and M. Chessin. 1975. A severe strain of tobacco mosaic virus from cactus. *Phytopathology* 65: 824-825.
- Granados S. D., y A. D. P. Castañeda. 1997. *El Nopal*. Ed. Trillas. México. pp: 11-19.
- Gutiérrez, V.C., R. Ruiz M., E. Piedra I., y R. De La Torre A. 2004. Caracterización de una variante del virus mosaico del pepino (CMV) asociada con los síntomas de moteado amarillo de la azucena (*Hippeastrum x hybridum* Leopoldii) en México. *Agrociencia* 38: 343-354.
- Hausbeck M. K., and F. E. Gildow, 1991. First report of *Tomato spotted wilt virus* on Thanksgiving cactus. *Plant Dis.* 75: 215.
- Kemeny, D. M., and S. J. Challacombe. 1988. *ELISA and other Solid Phase Immunoassays. J. Wiley and Sons. New York.* 367 p.

CONCLUSIONS

Yellow ring spot symptoms in fruit prickly pear are related to infection by a single-stranded RNA virus that is mechanically transmittable to a small number of indicator plant species. Its morphology is a rigid bar-shaped particle similar to Tobamoviruses, but with no serological relationship with the TMV antiserum with which it was compared. It was confirmed that this virus is a species of Tobamovirus by its reverse transcription-polymerase chain reaction (rt-PCR), using degenerate oligonucleotides. Given the symptoms developed in susceptible indicator hosts and its viral morphology, the virus separated from fruit prickly pear was identified as a variant related to *Opuntia Sammons'* virus, a species of Tobamovirus that has been found in other *Opuntia* species.

—End of the English version—



- Kurstak, E. 1981. *Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 935 p.
- Milbrath M. G., and M. R. Nelson. 1972. Isolation and characterization of a virus from saguaro cactus. *Phytopathology* 62: 739-742.
- NCBI. 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>(May 15, 2006).
- Pimienta, E. 1997. El nopal en México y el mundo. *In: Conabio. Suculentas Mexicanas. Cactáceas*. CONABIO. México. pp: 87-95.
- Sammons, M. I., and M. Chessin. 1961. Cactus virus in the United States. *Nature* 191:517-518.
- Sosa, M. C., F. Perdomo R., C. W. D. Brathwaite, y J. J. Salazar Cruz. 1997. *Manual de Técnicas para el Diagnóstico de las Enfermedades de las Plantas*. IICA/México. 221 p.
- Surzycki, S. 2000. *Basic Techniques in Molecular Biology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 119- 144.
- Valverde, A. R., S. T. Nameth, and L. R. Jordan. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Dis.* 74: 255-258.
- Wetter, C. 1989. *Opuntia Sammons'* Tobamovirus *In: Brunt A. A., K. Crabtree, J. Dallwitz, M. J. Gibbs, A. L. Watson, and J. E. Zurcher. (eds). Plant Viruses Online: description and Lists from the VIDE database*. Versión: 16th January 1997. URL. (15 mayo, 2006).