

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
POSGRADO EN HORTICULTURA**

F
Tesis
3086
C.2

**CARACTERIZACIÓN DE UN CARMOVIRUS ASOCIADO
A LA DEFORMACIÓN Y OBTENCIÓN DE PLANTAS *in vitro*
DEL NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* L.).**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:**

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES

PRESENTA:

MARIA LUISA RODRÍGUEZ MITZI

Chapingo, Estado de México, Diciembre 2008.



Instituto de Horticultura

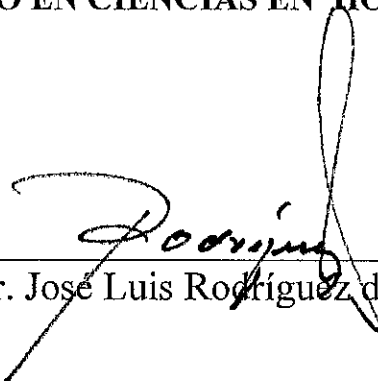


BIBLIOTECA

**“CARACTERIZACIÓN DE UN CARMOVIRUS ASOCIADO A LA
DEFORMACIÓN Y OBTENCIÓN DE PLANTAS *in vitro* DEL NOPAL
VERDURA (*Opuntia ficus-indica* L.).”**

Tesis realizada por la C. María Luisa Rodríguez Mitzi bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial par obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR: 
Dr. José Luis Rodríguez de la O.

ASESOR: 
Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz.

ASESOR: 
Dr. Jaime Sahagún Castellanos

DEDICATORIA

A Dios por darme la oportunidad de vivir y permitirme lograr una meta más en mi vida.

A mis padres Leonor y Zeferino porque gracias a su amor, apoyo y comprensión he logrado un objetivo más en mi vida profesional.

Especialmente a mi esposo Jesús, por su amor y apoyo incondicional y a mi hijo Daniel por ser el motivo de mi vida y superación.

A mis hermanas y hermano por todo su cariño y confianza que me brindan día a día.

A mis sobrinas y sobrinos por su gran ternura.

A mis cuñadas y cuñados.

A la familia Borbolla Paredes por hacerme sentir parte de su familia.

A mis amigas y amigos (María, Lulú, Agueda, Caro, Aurora, Elida, Liliana, Salomé, Samuel) gracias por todo su apoyo y amistad.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el financiamiento brindado en la realización de mis estudios de postgrado.

A la **Universidad Autónoma Chapingo**, en particular al departamento de Fitotecnia por contribuir en uno más de mis objetivos profesionales.

Al **Dr. José Luis Rodríguez de la O**, por su amistad y acertada dirección en la realización de la presente investigación.

Al **Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz**, por su amistad y apoyo brindado en la presente investigación.

Al **Dr. Jaime Sahagún Castellanos** por sus valiosas sugerencias para mejorar este trabajo.

A **Mario Salazar**. Por el apoyo y amistad brindada.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Fitopatología de la FES-Iztacala.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera me apoyaron en la realización de este trabajo.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor del presente documento nació en Tlacotepec, Morelos, el 19 de agosto de 1977; realizó sus estudios de licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo, donde obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo especialista en Parasitología Agrícola en 1999. Realice una maestría en el departamento de Fitotecnia en el programa de Horticultura (2006-2007).

En el desempeño laboral: Asesor Técnico SINDER en el Estado de Puebla de febrero a julio del año 2000. En el Grupo Integral de Servicios Fitosanitarios ENA S.A. de C.V. como signatario aprobado de las áreas de Entomología, Virus y Bacterias de agosto del 2000 a abril del 2003 y a partir de esta fecha al 2005 como Gerente Técnico del área Fitosanitaria.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
RESUMEN Y ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Generalidades del cultivo del nopal (<i>Opuntia ficus-indica</i> L.)	3
2.1.1. Clasificación taxonómica	3
2.1.2. DESCRIPCIÓN.....	3
2.2. Origen.....	4
2.3. Distribución.....	5
2.4. Importancia del cultivo	5
2.5. Usos del nopal	9
2.6. Principales plagas del nopal	9
2.7. Principales enfermedades del nopal	11
2.7.1 Enfermedades causadas por hongos:	11
2.7.1.1. Pudrición negra, <i>Macrophomina</i> sp.....	11
2.7.1.2. Mancha de oro, <i>Alternaria</i> sp. y <i>Ascochita</i> sp.	11
2.7.1.3. Lesiones causadas por <i>Phyllosticta concava</i>	11
2.7.1.4. Enfermedad causada por <i>Fusarium solani</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> ..	12
2.7.1.5. Gomosis, <i>Dothiorella ribis</i>	12
2.7.1.6. Antracnosis de la penca y del fruto <i>Colletotrichum gloesporoides</i>	12
2.7.1.7. Negrilla o fumagina <i>Capnodium</i> sp.....	12
2.7.1.8. Pudrición de la epidermis <i>Phoma</i> sp.	13
2.7.2. Enfermedades causadas por Bacterias.....	13
2.7.2.1. Necrosis bacteriana <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> = <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	13
2.7.2.2. Mancha bacteriana <i>Bacterium</i> sp.....	13
2.7.2.3 Agalla del nopal <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
2.7.3. Enfermedades causadas por Virus.	14
2.7.3.1. Descripción del género Carmovirus	15
2.8. Métodos de Diagnóstico de virus.....	16
2.8.1. Diagnóstico mediante métodos biológicos.	16
2.8.1.1. Inoculación por vectores	17
2.8.1.2. Injerto	17

2.8.2. Microscopia electrónica	18
2.8.3. Métodos serológicos	18
2.8.4. Detección por ácidos nucleicos	19
2.9. Sistemas de propagación del género <i>Opuntia</i>	20
2.10. Aplicaciones del cultivo <i>in vitro</i> de células y tejidos vegetales.	21
2.10.2. Estrategias <i>in vitro</i> para obtener plantas libres de virus	24
2.10.3. La sanidad del material regenerado debe ser supervisada	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
3.1 Localización del área de trabajo.	32
3.2. Metodología para la detección del virus.....	32
3.2.1. Colecta de material enfermo e inoculación en plantas indicadoras.	32
3.2.2. Microscopia electrónica	34
3.2.3. Detección de virus por inmunoadsorción ligado a enzimas (DAS- ELISA)	35
3.2.4. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR)	35
3.3. Metodología para el cultivo <i>in vitro</i> de nopal.....	36
3.3.1. Obtención material para cultivo de tejidos.....	36
3.3.2. Preparación de los medios de cultivo	36
3.3.3. Desinfección de los explantes y establecimiento <i>in vitro</i>	37
3.3.5. Inducción de brotes <i>in vitro</i>	38
3.3.6. Multiplicación de brotes.	40
3.3.7. Aclimatación de plantas a condiciones de suelo.	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
4.1. Diagnóstico del virus	43
4.1.1. Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en plantas indicadoras	43
4.1.2. Microscopía electrónica	45
4.1.3. Detección por inmunoadsorción ligada a enzimas (DAS-ELISA)	45
4.1.4. Transcripción inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR).	46

4.2. Cultivo <i>in vitro</i> del nopal (<i>O. ficus-indica</i>)	47
4.2.1. Desinfección y establecimiento <i>in vitro</i> de inóculos o explantes.....	47
4.2.2. Inducción de brotes	49
4.2.3. Multiplicación de brotes.	51
4.2.4. Enraizamiento de brotes.....	53
4.2.5. Aclimatación de plantas a suelo	54
5. CONCLUSIONES.....	56
6. LITERATURA CITADA	57
7. ANEXOS	67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Antecedentes de la propagación <i>in vitro</i> del Género <i>Opuntia</i>	31
Cuadro 2.	Síntomas en plantas indicadoras y diferenciales inoculadas con el virus asociado a síntomas de deformación en cladodios de nopal verdura.....	33
Cuadro 3.	Tratamientos empleados en la inducción <i>in vitro</i> de brotes de nopal.....	40
Cuadro 4.	Comparación de las medias de caracteres de brotes que provienen de cortes transversales y longitudinales según los análisis de varianza de estas variables, cuadros 1, 2 y 3 del anexo)	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	A. Cladodios , B. Flor y C. fruto de una planta de nopal	4
Figura 2.	Aprovechamiento del nopal en el país	7
Figura 3.	Superficie sembrada de nopal en 1999	8
Figura 4.	Explantos utilizados para la propagación de nopal <i>in vitro</i>	38
Figura 5.	A) corte transversal y B) longitudinal del nopal para su multiplicación.	41
Figura 6.	Síntomas de deformación en nopal verdulero A) Cladodio en el invernadero B) Cladodio recién colectado en campo.....	43
Figura 7.	Lesiones locales necróticas en plantas indicadoras causadas por un aislado del Carmovirus separado de <i>O. ficus-indica</i> , transmitido mecánicamente a: A) <i>Gomphrena globosa</i> , B) <i>Chenopodium amaranticolor</i> , c) <i>Datura stramonium</i> . D) <i>Chenopodium quinoa</i> E) <i>Nicotiana glutinosa</i> y F) marchitez en <i>N. bentamiana</i>	44
Figura 8	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos secuenciados de la rt-PCR del gen de la proteína de la cápside del carmovirus separado de cladodios de nopal. carril 1) Marcador de peso molecular 1 Kb., 2), y 3), <i>Chenopodium amaranticolor</i> 4), 5) y 6 <i>O. ficus indica</i>	46
Figura 9.	Secuencias obtenidas de la rt-PCR y alineadas en el NCBI/GenBank	47
Figura 10.	Presencia de hongos en el desarrollo <i>in vitro</i> de brotes de nopal.....	48
Figura 11.	<i>Colletotrichum</i> sp. A) Crecimiento en medio de cultivo, B) Conidios hialinos, C) Clamidosporas y D) Presencia de espigas o setas	49
Figura 12.	Brotación <i>in vitro</i> de <i>O. ficus-indica</i> A) Explante en medio de cultivo MS al 100 % complementado con Inositol y Tiamina y vitaminas WS y los reguladores BA y Kinetina en concentraciones	

	de 3.0 mg/l ⁻¹ y 2,4-D 0.5 mg/l ⁻¹ , B) Explante después de 7 semanas en medio de cultivo, C y D) Explantes después de 3 meses en el mismo medio de cultivo	50
Figura 13.	Multiplicación de brotes de <i>O. ficus-indica</i> libres de contaminantes <i>in vitro</i> . A) Brote de la parte apical B) Brote a partir de la parte basal del nopal. C) Brotación a partir de corte transversal y D) Brotación a partir de corte longitudinal	53
Figura 14.	Producción de callo en cortes longitudinales	53
Figura 15.	Generación de raíces de <i>Opuntia ficus-indica</i> en mismo medio de cultivo (MS al 100 % + 3.0 mg/l ⁻¹ BA 3.0 mg/l ⁻¹ Kinetina y 0.5 mg/l ⁻¹ de 2,4-D) después de 3 meses	54
Figura 16.	A) Transferencia de plantas de nopal <i>in vitro</i> a suelo, B) Planta transferida con dos brotes C) Plantas recién transferidas, y D) Planta después de 2 meses de transferida a suelo	56

**CARATERIZACION DE UN CARMOVIRUS ASOCIADO A LA
DEFORMACION Y OBTENCION DE PLANTAS *in vitro*.
DE NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus – indica* L.)**

**CHARACTERIZATION OF A CARMOVIRUS ASSOCIATED DEFORMATION
GREENGROECER AND OBTAINING PLANTS *in vitro*
IN PRICKLY PEAR (*Opuntia ficus – indica* L.)**

María Luisa Rodríguez Mitzi¹, José Luis Rodríguez de la O²

RESUMEN

Fue detectado un virus asociado con la deformación de cladodios en nopal verdulero (*Opuntia ficus-indica*) en San Martín de las Pirámides, Estado de México. El virus es transmitido mecánicamente a algunas especies de plantas indicadoras, causando lesiones locales necróticas en *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium* y *Nicotiana glutinosa*, y marchitez en *N. benthamiana*; la detección serológica por DAS-ELISA con antiseros comerciales para los grupos de Potexvirus, Tobamovirus y Carmovirus resultaron negativos en todos los casos; se observaron en el microscopio electrónico partículas icosaédricas de macerados de plantas indicadoras con lesiones y la secuenciación directa de los productos de la rt-PCR (EF584754 y EF584755) al ser alineados y comparados con la base de datos del NCBI/GenBank mostraron una identidad nucleotídica con el *Carnation mottle virus* (Carmovirus). El cultivo *in vitro* de tejidos permitió regenerar plantas a partir de explantes contaminados con fitopatógenos y establecer un sistema de propagación para *O. ficus-indica*.

Palabras clave: *Opuntia ficus-indica*, deformación, virus, *in vitro*.

ABSTRACT

A virus associated with the deformation of cladodes in nopal (*Opuntia ficus-indica*) was detected in San Martín de las Pirámides, State of Mexico. The virus is transmitted mechanically to certain of indicator plants, causing local necrotic lesions in *Chenopodium amaranticolor*, *Gomphrena globosa*, *Datura stramonium* and *Nicotiana glutinosa*, and withering in *N. benthamiana*. Serological detection by DAS-ELISA with commercial antisera for the Potexvirus, Tobamovirus and Carmovirus groupings tested negative in all cases; icosahedral particles in macerated of indicator plants with lesions were observed in the electron microscope, and direct sequencing of the rt-PCR products (EF584754 and EF584755) upon being aligned and compared with the NCBI / GenBank database showed a nucleotide identity with the *Carnation mottle virus* (Carmovirus). The *in vitro* culture with tissues allowed regenerating plants from explants contaminated with pathogens and establishing a propagation system for *O. ficus-indica*.

Key words: *Opuntia ficus-indica*, deformation, virus, *in vitro*

¹ Tesista

² Director

1. INTRODUCCIÓN

Por siglos, el nopal (*Opuntia* sp). ha estado asociado a las tradiciones de los mexicanos. Ha formado parte de su alimentación, religión, mitología y folklore. Aunque del género *Opuntia* se aprovechan diversos subproductos desde hace más de mil años, su cultivo comercial en escala importante se inició hace sólo algunas décadas, impulsado sobre todo por las excelentes cualidades de sus frutos (tunas) y cladodios (nopales) y por el potencial intrínseco que su explotación representa (Esparza et al., 2004). En el norte de México, el nopal se explota como forraje, mientras que en la zona centro se consume principalmente como verdura o fruto (Granados y Castañeda 1997).

En México, hay abundante literatura sobre taxonomía, ecología, fisiología y agronomía de diversas especies de *Opuntia*. En esta información se describen problemas causados por plagas y enfermedades, y se mencionan los agentes causales. La mayoría de los trabajos se refieren a la presencia de daños como mosaicos, clorosis, manchas anulares, deformaciones etc., que se atribuyen a probables ataques de virus o fitoplasmas (Chenssin y Leseman, 1972; Milbrath y Nelson, 1972). Sin embargo, aún no existen pruebas de diagnóstico que confirmen la identidad de algún virus en nopal en México.

Recientemente, en la región de San Martín de las Pirámides, Estado de México, en cladodios de nopal tunero (*Opuntia amyclaea* L.) se detectó un virus, caracterizado por causar manchas pequeñas y numerosas, como moteados en forma de pequeños anillos, de color amarillo intenso a blanquecino. Los síntomas de las manchas anulares son muy

notables en los brotes nuevos y pasan desapercibidos cuando los cladodios maduran. Con ataques severos el cladodio afectado adquiere una coloración amarillenta generalizada, adelgazamiento y eventualmente marchitez. El análisis electroforético y el tratamiento con nucleasas del ARN replicativo mostró que el virus aislado del nopal tunero tiene un genoma de ARN de cadena sencilla, mientras que el análisis al microscopio electrónico de macerados de tejidos de plantas de las especies 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* (De la torre *et al.*, 2007.) En recorridos posteriores a la región de San Martín de las Pirámides se encontraron cladodios con daños diferentes a los ya descritos. Estos daños se caracterizaron por formar manchas grandes, de forma irregular, abultadas, que dan la apariencia de una ampula, que ocasiona deformación de los cladodios, que en ocasiones adquieren la forma de una cuchara. Estos daños afectan directamente en la calidad de los cladodios del nopal verdura y por consecuencia en el rendimiento.

Por los daños asociados a la deformación de los cladodios del nopal verdura en la región de San Martín de la Pirámides, y por carecer de información en México que permita determinar su origen, los objetivos del presente trabajo fueron identificar y caracterizar los posibles virus relacionados con la deformación de los cladodios en *O. ficus-indica* y obtener plantas de nopal sanas *in vitro*.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo del nopal (*Opuntia ficus-indica* L.)

2.1.1. Clasificación taxonómica

Bravo (1978) indica que las cactáceas son plantas xerófitas debido a que son suculentas y resistentes a sequía. La posición taxonómica más utilizada para la clasificación de las cactáceas es el sistema de Britton y Rose, el cual clasifica a las opuntias de la siguiente forma:

- Reino: Vegetal
- División: Angiospermae
- Clase: Dicotiledonea
- Orden: Cactales
- Familia: Cactaceae
- Subfamilia: Opuntioideae
- Tribu: Opuntieae
- Género: *Opuntia*
- Especie: *Opuntia ficus-indica* L. (Bravo-Hollis, 1978).

2.1.2. DESCRIPCIÓN

Planta arborescente, de 3 a 5 metros de alto o más. Tallo leñoso bien definido de 60 cm a 1.50 m de altura y 20 a 30 cm. de diámetro. Cladodios oblongos hasta largamente ovalados, de 30 a 60 cm de largo y 20 a 40 cm de ancho y 1.9 a 2.8 cm de grosor, color

verde opaco. Aréolas distantes separadas entre si de 2 a 5 cm. Espinas siempre ausentes, cuando existen son escasas y pequeñas; glóquidas más o menos numerosas, amarillas caducas. Flores hermafroditas, de 7 a 10 cm, de diámetro y 6 a 8 cm. de largo, Fruto oval, de 5 a 10 cm de largo y de 4 a 8 cm de diámetro, verde, amarillo, naranja, rojo o púrpura, con abundante pulpa carnosa (Figura 1.) (Bravo-Hollis 1978).

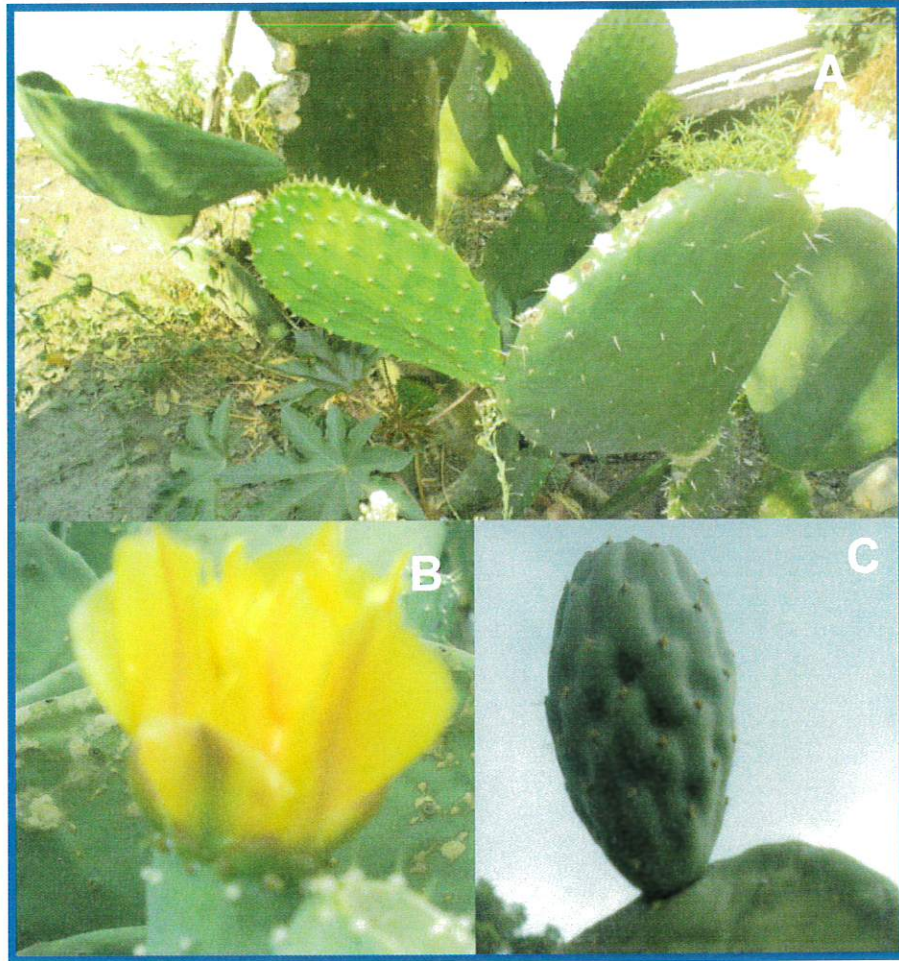


Figura 1. A. Cladodios , B. Flor y C. fruto de una planta de nopal.

2.2. Origen

Las cactáceas son originarias del continente Americano, en donde se encuentran distribuidas principalmente en las regiones áridas y semiáridas (Bravo, 1978).

Las especies del género *Opuntia* son originarias del sur de los Estados Unidos, México, Ecuador y Perú (Tisconia 1976).

2.3. Distribución

El género *Opuntia* se encuentra distribuido desde la provincia de Alberta, en Canadá, hasta la Patagonia, en Argentina; se les encuentra principalmente en las zonas desérticas del sur de los Estados Unidos, de México y de América del Sur. En la altiplanicie mexicana, este género crece en suelos pedregosos sujetos a temperaturas extremas y sequías prolongadas (Bravo, 1973; Flores y Aguirre, 1979) citado por Granados (1997).

2.4. Importancia del cultivo

La importancia económica y social que el nopal posee en México se asocia directamente con la superficie ocupada por esta planta y el aprovechamiento que se da a sus principales productos.

La producción de nopal, puede clasificarse en tres grandes tipos: nopaleras silvestres, de huertos familiares y en plantaciones.

La producción de nopal en su gran mayoría silvestre, se estima en tres millones de hectáreas. Se localizan distribuidas en partes de Sonora, Baja California, Baja California Sur, Sinaloa, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo (Figura 2). Las nopaleras silvestres en estas regiones son fuente de forraje para ganado. También se usa en la región como abasto para su proceso industrial, siendo empacado en salmuera o escabeche por diversas empresas, para mercado de exportación, y en segundo término, para consumo en el mercado nacional.

La segunda forma de producción en nuestro país lo determinan los huertos familiares. La producción de nopal para autoconsumo y venta en los mercados de pueblos y ciudades, es tradicional desde épocas precolombinas hasta la actual. El crecimiento de estos huertos se dio en forma relevante en los estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato y Aguascalientes (Figura 2). Con una selección hecha por el hombre al paso de muchos años, la calidad del producto, en la actualidad, es muy superior a la silvestre en sabor, tamaño, consistencia, grosor, color, menor contenido fibroso, ahuates y espinas. Mediante una rigurosa selección de las mejores variedades para consumo humano, los productores llevan la explotación comercial del nopal a parcelas agrícolas. Esta situación se propaga a los principales estados productores del país, y así es como en la actual Delegación de Milpa Alta, zona de producción agrícola en los límites de la Ciudad de México, se impulsan programas de investigación y desarrollo en el año de 1950. Así se logró una explotación comercial hasta alcanzar a ser el principal centro productor de nopal-verdura en nuestro país.

Dentro del grupo de las principales hortalizas que produjo México en 1999, de acuerdo con los datos de la SAGARPA, la producción de nopalito en nuestro país se ubica en el lugar número 11 en volumen y en el lugar 12 en lo que se refiere a valor de la producción.

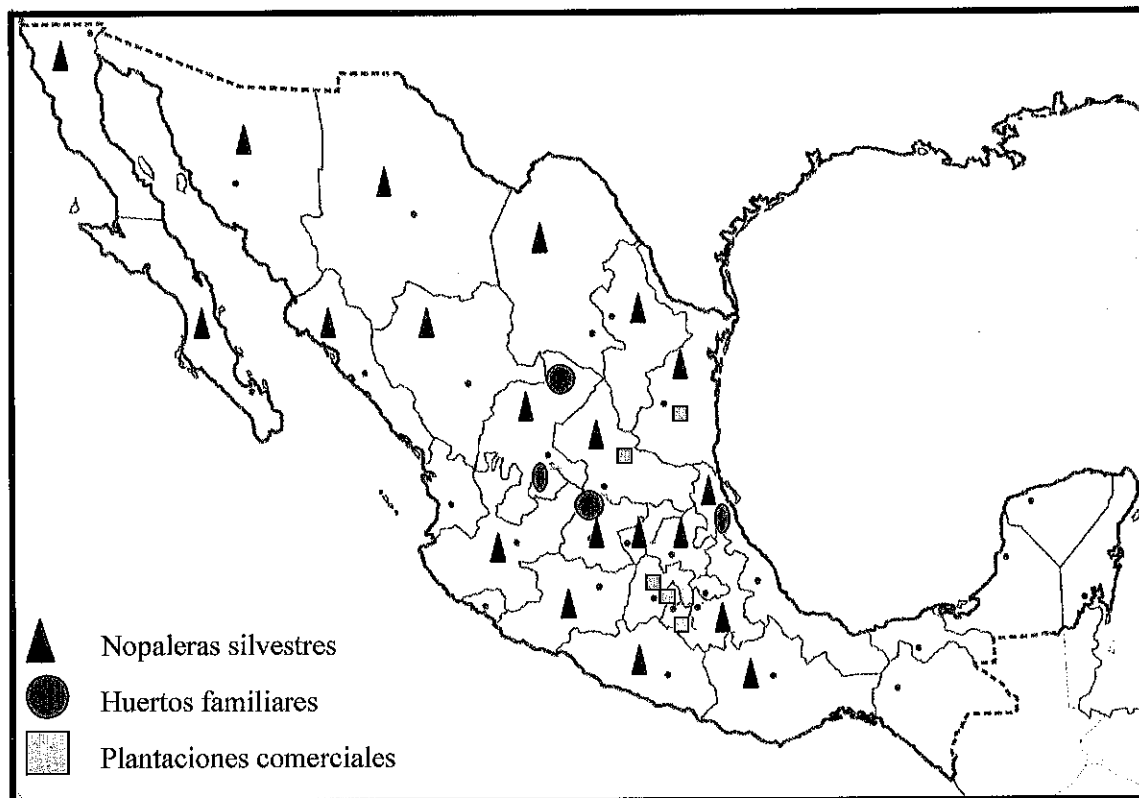


Figura 2. Aprovechamiento del nopal en el país.

Las superficies sembradas de “nopalito” en nuestro país durante 1999 de acuerdo con las cifras oficiales consistieron en 7,327 hectáreas; distribuidas en 19 estados, catorce de ellos tienen una participación marginal con áreas menores a las 300 hectáreas sembradas. El resto se encuentra en los estados de Morelos, con 796 hectáreas, San Luis Potosí con 380, Tamaulipas 378 y Baja California con 371 hectáreas, significando este grupo el 26 %. Destaca sobremanera el Distrito Federal con 4,159 hectáreas, que representa casi el 57 % de dichas superficies (Figura 3).

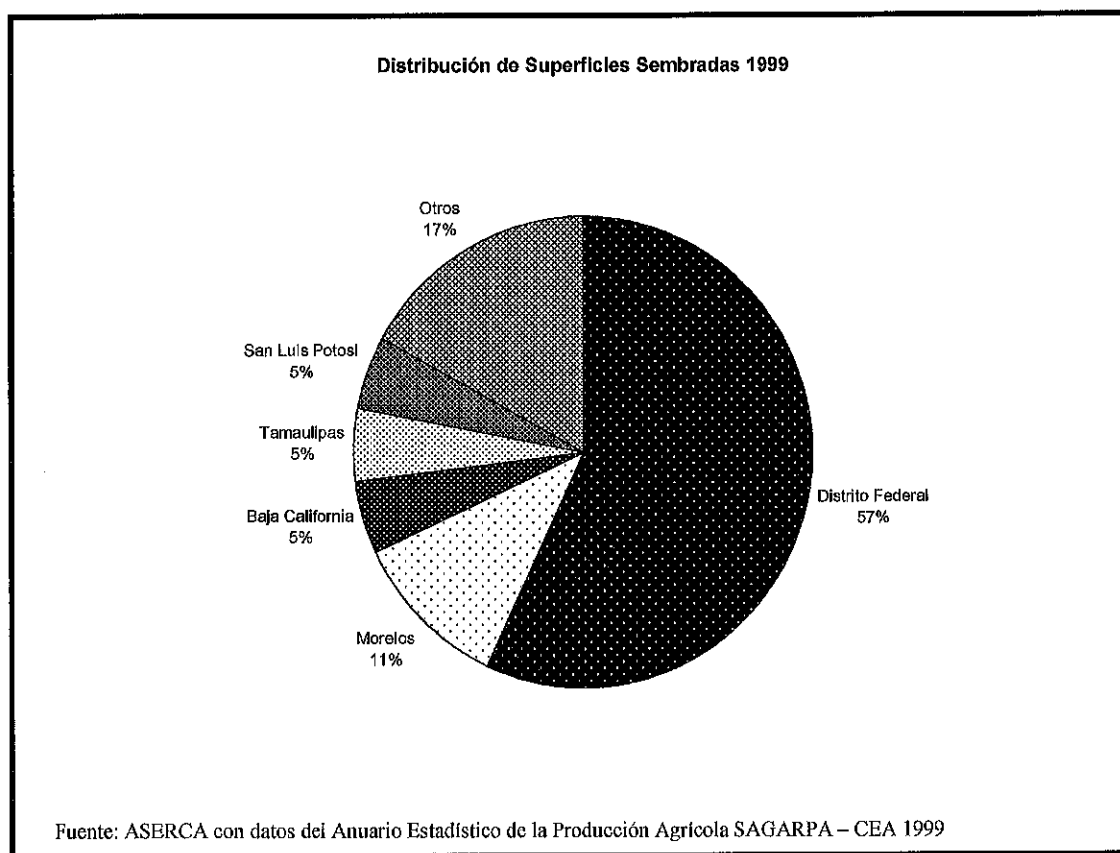


Figura 3. Superficie sembrada de nopal en 1999. Tomado de Claridades agropecuarias, Octubre 2001.

México es el primer productor de nopal verdura o nopalito. Según cifras del Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera de la SAGARPA, hasta abril del 2006, el país contaba con 11 mil 169 hectáreas sembradas, en comparación con otros productores, como Estados Unidos, que con cifras del 2003, sólo sembraba 200.

En cuanto a las exportaciones a EUA, durante los últimos 5 años los volúmenes de nopal verdura fresco aumentaron 128.5%, ubicándose en el 2004 en 26,022.58 toneladas y en el primer semestre del 2005, en 14,292.69 toneladas. El nopal preservado o conservado en vinagre o salmuera durante el 2004 reportó cifras de 1,131.1 toneladas, mientras que en el 2002 se ubicó en 4,981.4 toneladas. Por su parte, la tuna en los últimos 5 años tuvo un incremento en sus exportaciones del orden del 106.3%, con lo que alcanzó las 11,430.52 ton. en el 2004.

2.5. Usos del nopal

Los usos actuales y potenciales del nopal son sumamente variados. Algunos de ellos se mencionan a continuación: verdura (nopalito), ya sea fresca o enlatada en salmuera o escabeche, fruta (tuna) fresca, en postres (como helados), forraje, dulces, extracción de pectina de tuna, extracción de aceites y harinas de semillas, jugo concentrado de tuna, bebida alcohólica de tuna, como cercos o setos vivos, conservador del suelo, remedios caseros, materia prima en la industria para la obtención de cosméticos, aglutinante y fijador de pintura (o cal), combustible (leña), planta de ornato entre otros.

2.6. Principales plagas del nopal

El cultivo del nopal es infestado por diversas plagas que ocasionan pérdidas económicas dependiendo de la especie, entre las que se mencionan las que afectan a los cladodios y frutos provocando una disminución en la producción, tales como: el picudo barrenador *Metamasius* (= *Cactophagus*) *spinolae* Gyll; el gusano blanco del nopal *Laniifera cyclades* Druce; el picudo de las espinas (*Cylindrocopturus biradiatus* Champion), La chinche gris (*Chelinidea tabulata* Burmeister), la chinche roja (*Hesperolabops gelastops* Kira), el gusano cebra Melitara (= *Olycella nephelepsa* Dyar); la cochinilla o grana (*Dactylopius indicus* Green), el gusano de alambre (*Melanotus* spp), la gallina ciega (*Phyllophaga* spp), los trips del nopal (*Neohydatothrips opuntiae* Hood); barrenador del nopal (*Moneileima variolare* Tom); mayate verde del fruto (*Cotinis nitida* L.); gallina ciega (*Phyllophaga* spp.); Chinche del fruto (*Narnia femorata* Stal); escama del nopal (*Diaspis echinocacti* Bouche); perforador del fruto, (*Asphondylla opuntiae* Felt); Así mismo se encuentran algunos roedores como: rata nopatera (*Neotoma* spp) y tuzas (*Pappogeomys* sp). Hernández (1993).

Una de las mayores amenazas para la biodiversidad de México, en particular para diversas especies de *Opuntia* entre las que se encuentran los nopales es *Cactoblastis cactorum* conocida como la palomilla del nopal, la cual es nativa de Sudamérica que se ha usado exitosamente en Australia para el control biológico de Opuntias introducidas. El peligro de *C. cactorum* en nuestro país radica en el hecho de que albergamos la mayor diversidad de especies de *Opuntia* en el mundo, varias de las cuales pudieran ser hospederos de esta palomilla, tal y como se ha documentado para un amplio número de especies.

En nuestro país existen 83 especies de opuntias, entre las que se encuentran los nopales, de las cuales 53 son exclusivas de nuestro país y de acuerdo con reportes recientes 19 de ellas tienen el potencial de ser dañadas. Las rutas más probables de ingreso son por migración desde Florida (donde se ha reportado desde 1989) al norte del país, así como una migración desde el Caribe.

Las condiciones climáticas de México favorecen la invasión de esta palomilla y estudios preliminares sugieren que la zona norte de México, que produce grandes cantidades de tuna y nopal forrajero sería la más afectada. La invasión de la palomilla del nopal podría afectar tanto las nopaleras silvestres como las cultivadas con impactos importantes sobre la biodiversidad y la producción de nopales.

En agosto del año pasado el Comité de Sanidad Local de la SAGARPA confirmó el dictamen positivo de *Cactoblastis cactorum* en Isla Mujeres, Q. Roo. en opuntias ornamentales introducidas de la especie *O. stricta*

2.7. Principales enfermedades del nopal

Respecto a las enfermedades más frecuentes en *Opuntia* sp. se reportan las siguientes:

2.7.1 Enfermedades causadas por hongos:

2.7.1.1. Pudrición negra, *Macrophomina* sp.

La infección inicialmente se manifiesta con la presencia de una pequeña mancha clorótica en los cladodios; la epidermis no muestra un cambio, pero el tejido interno toma una apariencia de color verde oscuro, aproximadamente 5 mm de profundidad, posteriormente la lesión se torna de un color más oscuro, en estado avanzado, bajo la epidermis aparece una podredumbre semi-acuosa de color negro (Osorio, 1989)

2.7.1.2. Mancha de oro, *Alternaria* sp. y *Ascochita* sp.

Osorio y Soto (1994) mencionan que esta enfermedad se ha encontrado en el estado de Zacatecas y con mayor incidencia en el estado de Guanajuato, se destaca que su importancia radica en que impide la fotosíntesis en los cladodios afectados y forma costras de color amarillo sobre la superficie de las mismas pencas. Se presenta todo el año y con mayor incidencia de enero a febrero.

2.7.1.3. Lesiones causadas por *Phyllosticta concava*.

Las lesiones que producen en el nopal son circulares, de color café claro y se producen hundimientos de los tejidos cubiertos por puntos negros diminutos; los síntomas pueden aparecer simultáneamente en ambos lados del cladodio, la unión de varias lesiones en una penca origina manchas más grandes; posteriormente los tejidos afectados se contraen, se hacen negros y se forman los cuerpos de las esporas (García, 1990).

2.7.1.4. Enfermedad causada por *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum*

Estos patógenos provocan desde un color verdoso hasta un ablandamiento negro de los tejidos; que bajo la epidermis se pueden convertir en acuosos y negros con líneas café claro en las estructuras internas leñosas; generalmente aparece primero la infección cerca de la línea de apoyo, o donde las espinas de cladodios adyacentes han penetrado a la planta. La planta se derrumba por completo en pocos días (García 1990).

2.7.1.5. Gomosis, *Dothiorella ribis*

Consiste en una mancha canchrosa con abundante exudación de goma, ésta infecta lentamente los cladodios reseándolos y causando una declinación en la planta (García, 1990).

2.7.1.6. Antracnosis de la penca y del fruto *Colletotrichum gloesporoides*

Las pencas o plantas afectadas presentan manchas de color café con tonalidades rojizas, que generalmente inician en el borde de las pencas y van invadiendo hacia la base. En ocasiones estas manchas se presentan en los frutos (García 1990).

2.7.1.7. Negrilla o fumagina *Capnodium* sp.

Se presentan manchas semejantes a hollín o tizne, este hongo no causa daño directo, si no que se desarrolla en el excremento que los insectos depositan sobre las pencas, cubriendo las áreas verdes e impidiendo la fotosíntesis (García, 1990).

2.7.1.8. Pudrición de la epidermis *Phoma* sp.

Provoca la pudrición de las pencas y frutos, se observan manchas hundidas y oscuras que se agrandan y ennegrecen, a la vez que forman ampollas (García, 1990)

2.7.2. Enfermedades causadas por Bacterias

2.7.2.1. Necrosis bacteriana *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* = *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*.

Probablemente es la enfermedad más visible en los nopales, la cual infecta a la planta a través de aberturas naturales, heridas y perforaciones por insectos, probablemente también por contacto directo, o de raíz a raíz, lo que provoca una putrefacción suave, los tejidos internos se pueden volver líquidos y las pencas pueden semejar bolsas de agua, para después desplomarse o hundirse por completo. La bacteria puede permanecer restringida al área afectada, después de la destrucción del cladodio, o expandirse a través de la coyuntura o nudo al próximo cladodio. Por lo general no se afectan más de dos pencas sucesivas. (García, 1990)

2.7.2.2. Mancha bacteriana *Bacterium* sp.

Las plantas infectadas por esta bacteria presentan manchas que inicialmente son de color amarillo, agrandándose y cambiando a café y negro a medida que avanza el daño, las pencas adquieren consistencia blanda y despiden olor desagradable (García, 1990).

2.7.2.3 Agalla del nopal *Agrobacterium tumefaciens*.

En varias localidades del Estado de México se han observado en los cultivos de nopal manifestaciones de crecimiento deforme de tamaño variable en la base de la penca,

semejando tumores que al inicio de su desarrollo presentaban color blanquecino y de consistencia blanda, que al envejecer cambian a café-negruzco, se lignifican y resquebrajan (García, 1990)

2.7.3. Enfermedades causadas por Virus.

Existe muy poca información acerca de las enfermedades causadas por virus en nopal, solo se menciona que los nopales infectados por virus pueden mostrar síntomas severos tales como círculos amarillos y pencas retorcidas que tienen efecto marcado en el crecimiento de la planta. Granados y Castañeda (1997).

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; Fuldl-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).

Sin embargo recientemente se detecto la presencia de un Tobamovirus en la región de San Martín de las Pirámides; 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. 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. (De la Torre *et. al.*, 2007).

2.7.3.1. Descripción del género Carmovirus

El Género Carmovirus pertenece al grupo Tombosvirus y a la familia Tombusviridae que tiene ocho géneros: Aureusvirus, Avenavirus, Carmovirus, Dianthovirus, Machlovirus, Necrovirus, Panicovirus, Tombusvirus.

Los miembros de este género se caracterizan por tener morfología similar, partículas icosaédricas, y genomas pequeños de RNA de 3.9 Kb. Normalmente lineal y de cadena simple, genoma monopartita. El genoma de los Carmovirus se parece a los de los Aureusvirus y a los Tombusvirus por presentar 5 marcos abiertos de lectura potenciales (ORFs) y una gran proteína de la cápside de más de 35 kDa. Su replicación se realiza en el citoplasma (Conti, *et. al.*, 2000).

Biología: Dentro del género están descritas 14 especies, de las cuales 8 son provisionales. Son transmitidos por contacto, a través del suelo, escarabajos, o por el hongo del suelo (*Olpidium*), por multiplicación vegetativa y por transmisión mecánica. El virus moteado del clavel (*Carnation mottle virus*) se encuentra distribuido en todo el mundo en los cultivos de clavel (Astier *et. al.*, 2006).

Saguaro cactus virus (SCV) (Milbrath y Nelson 1972), infecta al cactus gigante Saguaro (*Carnegie gigantea*) encontrado en el sudeste de Arizona, en el que los daños son asintomáticos. Esta estrechamente relacionado con el *Carnation mottle virus*. También infecta a varias especies de la familia Cactaceae, Chenopodiaceae, Portulacaceae, Amaranthaceae, Nyctaginaceae, Aizoaceae.



2.8. Métodos de Diagnóstico de virus

2.8.1. Diagnóstico mediante métodos biológicos.

Cada virus es caracterizado por un rango de hospedantes, es decir por un set de plantas que pueden ser infectadas en condiciones naturales o experimentales. Las plantas indicadoras o diferenciales pueden ser cultivadas o silvestres. Algunas de estas plantas desarrollaran reacciones particulares (lesiones locales, síntomas sistémicos) que puede ser característico de un cierto virus. La transmisión experimental de virus en plantas indicadoras está basada sólo en las propiedades infecciosas del virus. Este método es muy importante para detectar la presencia de un virus en una planta infectada, especialmente cuando este es un virus desconocido para el cual no hay ningún otro método diagnóstico (Astier *et. al.* 2006)

La inoculación mecánica en plantas herbáceas es el método usado con mayor frecuencia. Es muy notable que ciertas especies, como *Chenopodium quinoa*, y *C. amaranticolor* o *Nicotiana benthamiana* y *N. clavelandi* son sensibles a más de 100 virus diferentes y son plantas universales para esta prueba. Para asegurar una alta sensibilidad y la reproductibilidad de síntomas, la inoculación mecánica es mucho mejor cuando es realizada sobre plantas jóvenes las cuales se mantienen en condiciones controladas (la temperatura aproximadamente 20 ° C y una alta intensidad lumínica). Ciertas plantas como *Chenopodium* o *Nicotiana* son usadas cuando presentan de 4 a 6 hojas, mucho antes de la inducción floral, lo cual podría modificar las reacciones en las plantas (Astier *et. al.* 2006).

El extracto obtenido de un pedazo de planta infectada, molido en un mortero y con un buffer apropiado (generalmente se utiliza un buffer de fosfatos) es depositado sobre la superficie de hoja de la planta indicadora. La inoculación mecánica es hecha por

frotación con una espátula o una esponja. El virus penetra fácilmente por las heridas causadas por la frotación sobre la epidermis foliar. Para facilitar esta penetración, se puede utilizar un abrasivo como el carborundum. Recomendamos que las hojas sean lavadas inmediatamente después de la inoculación. Las plantas inmediatamente deben ser colocadas en un invernadero o en una cámara de clima controlado para tener las condiciones que favorezcan la multiplicación del virus y la manifestación de síntomas (con luz suficiente y una temperatura de 20 - 25 ° C).

2.8.1.1. Inoculación por vectores.

Algunos virus no pueden ser transmitidos mecánicamente, en particular aquellos restringidos al floema (Luteovirus, Polerovirus, Nanovirus, Tenuivirus, Marafivirus, y Reovirus, así como ciertos miembros de Closterovirus y Geminiviridae). En este caso, las plantas indicadoras pueden ser inoculadas por vectores. Para esto se requiere que las colonias de vectores estén sanas (áfidos, mosquitas blancas, etc.) las plantas inoculadas deben permanecer en el invernadero (Astier *et. al.* 2006).

2.8.1.2. Injerto

El injerto sobre plantas indicadoras es otro tipo de inoculación biológico extensamente usado para la detección de virus o los agentes infecciosos de etiología desconocida, particularmente sobre frutales. Las plantas leñosas son seleccionadas para expresar síntomas. Esto a veces ocurre sólo después de varios meses a un año.

2.8.2. Microscopia electrónica

Desde el desarrollo de los microscopios electrónicos, la posibilidad de observar varios tipos de partículas virales directamente en extractos de plantas infectadas ha sido explotada para la identificación de virus de plantas. El examen de cortes de células o de la savia bruta de plantas infectadas por virus en el microscopio electrónico puede o no revelar partículas semejantes a virus. Las partículas virales no siempre son fáciles de encontrar con el microscopio electrónico y aunque dichas partículas se observan como sucede en casos raros, se demuestra que dichas partículas son virus y que esta es la causa de una determinada enfermedad, todavía se requiere de mucho tiempo y trabajo complementario (Agrios, 2001).

Aparte de estas observaciones directas en extractos de plantas o en preparaciones de virus purificados, el análisis de tejido infectado en secciones ultrafinas proporciona información sobre la posición de partículas virales dentro de la célula, los tipos diferentes de inclusiones y alteraciones celulares que sirven de información adicional para el diagnóstico de virus.

2.8.3. Métodos serológicos

El método serológico de inmunoadsorción con enzimas ligadas (enzyme linked immuno sorbent assay) (ELISA) doble anticuerpo (DAS), es la variante más comúnmente utilizada del ELISA. Esta prueba consiste en la adsorción de anticuerpos específicos a una placa de poliestireno seguida de la adición de los antígenos o fitopatógenos los cuales reaccionan con los anticuerpos adheridos a la placa. Para formar el sándwich se agregan nuevamente anticuerpos ligados con enzimas que se adhieren a los patógenos capturados a la placa. Una vez formada la secuencia biológica de

anticuerpo+antígenos+anticuerpo ligado a una enzima, se adiciona el sustrato, el cual es hidrolizado por la enzima dando lugar a un cambio de color de la solución, lo que permite apreciar los resultados visualmente y cuantificarlos (Clark y Adams, 1977, Cruz y Frías, 1997).

2.8.4. Detección por ácidos nucleicos

El conocimiento de las secuencias de ARN o ADN de genomas de virus de planta abre una puerta al desarrollo de las nuevas técnicas de gran interés para el diagnóstico. En contraste con las técnicas serológicas, que generalmente detectan la proteína de la cápside del virus, estas técnicas basadas en la secuencia de ácidos nucleicos permite la detección de cualquier región del genoma viral. Dos técnicas son las más extensamente usadas para el diagnóstico: la hibridación molecular y PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (Astier *et. al.* 2006).

La técnica de amplificación enzimática *in vitro* es usada para copiar exponencialmente una parte o todo el ácido nucleico viral encontrado en una mezcla mediante el reconocimiento y la hibridación de secuencias cortas complementarias (iniciadores) y la acción de ADN polimerasas estables al calor. Esto hace posible descubrir la secuencia viral amplificada así como caracterizarlo con precisión por secuenciación (Astier *et. al.* 2006).

Numerosos ajustes metodológicos pueden ser usados para aplicar la técnica de PCR a una amplia gama de virus fitopatógenos. En el caso de virus que su genoma es ARN es necesario incluir, antes de la reacción de amplificación, un paso de reversa transcriptasa (rt-PCR). Dependiendo de los protocolos adaptados, estos dos pasos (la Transcripción y

amplificación) pueden ser conducidos separadamente o simultáneamente en un solo tubo (Astier *et. al.* 2006).

El principio relativamente simple de PCR está basado en la capacidad de una enzima de replicación, la ADN polimerasa, sintetiza a partir de un fragmento de ADN que usa como iniciadores los cuales son secuencias de nucleótidos cortos de alrededor de 20 bases. Estos dos iniciadores, complementarios a cada uno de las dos cadenas del ADN respectivamente, hacen posible la amplificación del fragmento de ADN entre las zonas de anillamiento. En cada ciclo, la secuencia definida por los dos iniciadores es duplicada. Sin embargo, una reacción en cadena ocurre, porque esta secuencia es duplicada no sólo de la molécula inicial, sino también de las cadenas recién sintetizadas. Esto es la repetición de varios ciclos de desnaturalización-hibridación-extensión (alrededor de 20 a 40 ciclos) que conduce a una acumulación exponencial del ADN (Astier *et. al.* 2006).

2.9. Sistemas de propagación del género *Opuntia*.

Las plantas obtenidas por reproducción sexual tardan más tiempo en iniciar la producción de frutos y además resultan heterogéneas en muchas de sus características por proceder de polinización cruzada, la cual tiene importancia para trabajos de mejoramiento genético. De la Rosa (1998).

La reproducción asexual es lo más recomendable para el cultivo de nopal, puesto que preserva las características de la planta madre. Puede realizarse por medio de los siguientes métodos (Borrego y Burgos 1986):

- Pencas (cladodios o raquetas)
- Fracciones mínimas

- Injertos
- Cultivo de tejidos

La raqueta o planta madre se debe de obtener de huertos o viveros con un buen manejo, lo que garantiza sanidad y calidad en las raquetas, debiendo cumplir con las siguientes cualidades:

- Presencia de buen vigor
- Libre de plagas y enfermedades
- Que no presenten malformaciones físicas
- Edad de 6 meses a 1 año
- El tamaño mínimo de 30cm. de ancho por 20cm de largo
- Presencia de buen grosor y succulencia.

2.10. Aplicaciones del cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales.

El cultivo de tejidos vegetales o la micropropagación, es una herramienta que forma parte de la biotecnología clásica, y se define como el conjunto de tecnologías *in vitro* empleadas en la propagación y mejoramiento de una especie. Estas tecnologías se fundamentan en los procesos naturales de propagación vía vegetativa y sexual y en la capacidad que tiene la célula vegetal para regenerar una planta completa, a partir de un explante, esa potencialidad se define como totipotencia celular. Así se obtiene la propagación rápida y masiva de plantas idénticas a la original a partir de cualquier parte aislada y viva de la planta, sean estos trozos de tejidos, ápices meristemáticos o incluso células aisladas. Inicialmente se usó esta técnica para la multiplicación masiva de plantas élites o micropropagación y también en la obtención de plantas libres de virus,

producción de semilla sintética, conservación de germoplasma, obtención de metabolitos. Etc.

La reproducción asexual de plantas por cultivo *in vitro* de tejidos es posible gracias a que cada una de las células de un individuo vegetal, posee la capacidad necesaria como para permitir el crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad se denomina totipotencia celular. Básicamente la reproducción asexual ocurre por división mitótica, mediante el cual, se cumplen sucesivas etapas de crecimiento y desarrollo. La mitosis implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que las mismas poseen un genotipo idéntico al de la célula madre. Así, las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo con suplementos de reguladores del crecimiento (también llamados hormonas vegetales), pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

1. Una dediferenciación celular acompañada de crecimiento celular desorganizado, que da lugar a una masa de células denominada callo, el cual bajo condiciones controladas y uso de reguladores de crecimiento es capaz de generar órganos o embriones somáticos,
2. Una respuesta morfogénica por la cual se forman directamente órganos o embriones.

La micropropagación permite reproducir *in vitro* cientos de clones de una misma especie (Kyte & Kleyn 1996), los cuales posteriormente son llevados a un vivero y luego al campo de cultivo, donde se desarrollarán y darán lugar al producto de interés económico que se busca obtener.

La micropropagación, se aplica a especies vegetales con el fin de obtener una población en el menor período de tiempo posible ya que las respuestas pueden lograrse en períodos de 3 a 6 meses, en contraposición con otras biotecnologías en las que el tiempo de

investigación es mayor, (Ingeniería genética,). Se puede decir, que es además versátil puesto que se adapta a los requerimientos de cada especie en estudio, al aprovechar al máximo la totipotencia celular, para canalizarla hacia la propagación.¹

Etapas de la micropropagación:

Murashige (1974, 1977) indica que el proceso de micropropagación requiere de tres etapas: establecimiento aséptico del inóculo, multiplicación de los propagulos y preparación de las plantas para su establecimiento a suelo.

1. Establecimiento del inóculo: Se refiere al estado en que el inóculo seleccionado, se somete a las condiciones del cultivo bajo las cuales se suscitará una respuesta. (Murashige, 1977). Durante esta etapa se presentan los principales problemas como son: la contaminación de los explantes producida por hongos y bacterias en el medio de cultivo, así como el necrozamiento de los tejidos; estos problemas pueden llegar a reducir considerablemente los cultivos durante su iniciación, puesto que reducen el estado fisiológico de los explantes y producir su muerte. Actualmente existen recomendaciones que ayudan a disminuir estos problemas (Debergh y Maene, 1981; Hughes, 1981; Bhojmani, 1983; Conger, 1984).
2. Multiplicación de los propagulos: Esta etapa tiene como fin, el producir suficiente cantidad de brotes, embriones u otros órganos, según los requerimientos (Murashige, 1974).
3. Enraizamiento: La etapa de enraizamiento, es importante durante el proceso de micropropagación ya que así se obtienen las plantas completas; las cuales posteriormente serán transferidas a condiciones de suelo (Murashige, 1977)

Esta etapa puede realizarse en condiciones *in vitro* o *in vivo* (Bhojmani y Razdan, 1983).

4. Transferencia de las condiciones *in vitro* a condiciones de suelo: Diferentes investigadores coinciden en señalar que el paso de condiciones *in vitro* a condiciones de invernadero es una de las más importantes causas de la muerte de plantas regeneradas por cultivo de tejidos (Loreti *et al.*, 1981; Cheema y Sharma, 1983; Villalobos, 1984). Sin duda la preparación de las plantas (etapa de endurecimiento) juega un importante papel en el posterior desarrollo de las plantas regeneradas (Villalobos y Thorpe, 1985). Sommer y Caldas (1981) consideran que son cuatro los aspectos más importantes a considerar antes y durante el transplante al suelo:

- a) Antes del transplante debe existir un balance razonable entre el brote y la raíz.
- b) Las plantas deben pasar por un período gradual de transición (más de 2 o 3 semanas)
- c) Todas las trazas de agar deben eliminarse del sistema radical de las plantas para evitar posibles contaminaciones.
- d) Se requiere de cierto sombreado.

2.10.2. Estrategias *in vitro* para obtener plantas libres de virus

Existen 5 métodos utilizables para producir plantas libres de virus: 1. Por tratamiento térmico (termoterapia); 2. Cultivo de meristemos; 3. Combinando tratamientos de calor, seguido, del cultivo de meristemos; 4. Formación de vástagos adventicios, seguido del

cultivo de meristemos; 5. Injerto de meristemos sobre patrones (plántulas), libres de virus conocido también como micro-injerto.

Termoterapia: es la técnica más antigua utilizada para la liberación de patógenos en plantas. No obstante, es difícil la obtención de plantas libres de virus con el empleo de altas temperaturas solamente. Mantener las plantas enfermas por períodos prolongados en termoterapia disminuye la concentración de virus, pero al llevar las plantas nuevamente a condiciones normales, en poco tiempo recuperan la concentración original. Una práctica muy usada es la combinación de la termoterapia y el cultivo de meristemos. Esto implica mantener las plantas en termoterapia por un período variable de tiempo y temperatura (generalmente entre 34° y 38 °C desde una a varias semanas), luego se realiza la extracción del meristemo, se siembra en el medio de cultivo y se continúa con los pasos convencionales para su desarrollo.

Cultivo de meristemos: Es el cultivo *in vitro* del domo apical (meristemo apical que como media mide 100x100 µm) más los primeros primordios foliares. El cultivo de meristemos es un método efectivo para la eliminación de infecciones virales y es el material preferido para la conservación de germoplasma. La razón principal por la cual las células meristemáticas son indemnes a los virus es que el meristemo carece de tejidos vasculares, que es por donde se propagan los virus que van contaminando a la planta.

Existen otros factores:

- En el meristemo apical la división mitótica es muy acelerada con una amplia actividad meristemática más rápida que la replicación viral.
- En una célula meristemática no hay diferenciación de haces vasculares, xilema, floema o tejidos fibrovasculares por lo que el virus tiene mayor dificultad de

acoplamiento con los ribosomas, debido a que estas células tienen un código de trabajo muy definido.

- Existe una competencia por uso de algunos metabolitos entre células y virus.

Quimioterapia: el uso de antivirales sería la solución definitiva para estas enfermedades; sin embargo, hasta ahora no se ha encontrado un producto que por sí solo cumpla esta función. Algunas sustancias químicas ocasionan una disminución en la concentración de virus existentes en la planta y atenúan, o suprimen, los síntomas típicos de los virus, pero, una vez suspendido el tratamiento se recupera la concentración original. Han sido evaluadas diferentes sustancias pero la más utilizada es el Ribavirin o Virazole (1- β -D-ribofuranosyl- 1, 2, 4 – triazole –3- carboxamide).

Un modo adecuado de emplear los antivirales es combinándolos con el cultivo de meristemos. También han sido aplicados directamente a los meristemos *in vitro*. En este caso, el antiviral es colocado en el medio del cultivo en concentraciones variables, que van desde 10 a 50 mg.L⁻¹, y en algunos casos hasta 100 mg.L⁻¹. Las plantas son mantenidas bajo la acción del antiviral por largos períodos que incluyen varios subcultivos.

Electroterapia: el método consiste en aplicar corriente eléctrica a yemas por un período variable de tiempo para obtener plantas libres de patógenos. Se menciona que la aplicación de electricidad produce degradación de las partículas y pérdida de infectividad. Esta técnica ha sido citada para liberar del mosaico al almendro cv Caetanuccia. Para ello los brotes fueron sometidos a 500 V por tiempos variables y luego injertados sobre pies sanos (obtenidos por semilla). Se señaló que con 5 minutos de tratamiento los resultados fueron buenos y con 20 minutos se obtuvo completa

inactivación. El método también ha sido empleado para eliminar bacterias de caña de azúcar, *Potato leaf roll virus* de papa, *Dasheen mosaic virus* de aráceas y *Banana streak virus* de banana, entre otras, aplicando 5-30 V a las yemas por un período de 5 minutos. En este caso se obtuvo una eficiencia del 3 al 60%, dependiendo del cultivar y el patógeno.

Si se sospecha que una planta está infectada por virus se deben realizar las siguientes operaciones (Quak, 1977)

1. En primer lugar se debe identificar el o los virus.
2. En segundo, se debe intentar eliminar (todos) los virus.
3. Las plantas obtenidas después de los pasos anteriores, deben ser ensayados para ver si realmente están libres de virus.

Las plantas deben ser analizadas una por una para hacer una buena selección de «plantas madres» a partir de las cuales se iniciarán los procesos de multiplicación del material. Es recomendable hacerle más de un análisis para asegurar su sanidad, es preferible que sea en etapas diferentes a lo largo del proceso, y en lo posible por técnicas distintas.

Para realizar un análisis confiable hay que tener en cuenta varios factores que son específicos para cada combinación planta-patógeno. Es importante el empleo de sistemas de alta sensibilidad que nos permitan detectar los virus aun en bajas concentraciones; sin embargo, no existe un sistema que sea infalible, siempre hay un límite de concentración por debajo del cual el virus no puede ser detectado. Para evitar errores en este sentido es recomendable tener en cuenta algunos factores. Como ya se ha mencionado, la concentración de virus no es igual en todas las partes de una planta; por lo tanto, si queremos hacer un análisis confiable hay que establecer qué tejidos y órganos son los que concentran más el patógeno y realizar la prueba a partir de ellos. Del mismo

modo también se ha comprobado que existen fluctuaciones a lo largo del ciclo de cultivo; por lo tanto, es conveniente realizar el análisis cuando la concentración de virus es mayor. Esto es importante cuando se prueba el material en campo.

4. Finalmente, se deberán poner los medios para impedir una re-infección.

2.10.3. La sanidad del material regenerado debe ser supervisada

Es importante asegurar, al final de una termoterapia o tratamientos de cultivo de meristemos, que el material obtenido este sano, y aquel virus presente en las plantas madre ha sido eliminado. Asimismo a lo largo de las generaciones sucesivas con regularidad deben ser analizados para descubrir una posible recontaminación. Cualquier método de diagnóstico puede ser usado para la observación de síntomas en el campo o bien recurrir a los métodos más sofisticados moleculares. Las técnicas más sensibles, y a menudo los más costoso (biológico, immunoquímicos, o pruebas moleculares), hacen posible eliminar rápidamente al individuo infectado de las primeras generaciones. Análisis rutinarios en gran escala, para supervisar las partes que están siendo propagadas así como para controlar partes de semillas comerciales, preferentemente usan observaciones de campaña y las técnicas de diagnóstico que pueden ser fácilmente automatizadas, como ELISA.

Cuando los síntomas son suficientemente característicos de la enfermedad y reconocibles en los campos, las plantas infectadas pueden ser eliminadas para mantener un estado sanitario satisfactorio. Éste es el caso, por ejemplo, con selección de masas para bulbos ornamentales, como para tulipanes contra TBV.

Incluso aunque en la práctica el injerto sobre plantas indicadoras sea larga y laboriosa, es esencial para controlar la sanidad de vid o árboles frutales. Una mejora notable

recientemente ha sido hecha en la práctica de cortes herbáceos. Similarmente en la fresa, el procedimiento de control recomendado contra aproximadamente 20 virus y el empleo de injertos para un fitoplasma sobre las reproducciones de *Fragaria vesca* y *F. virginiana* que claramente expresa síntomas típicos.

Reglas técnicas que definen condiciones de producción para plantas certificadas y semillas.

Los esquemas de certificación no solo implican enfermedades virales, también enfermedades bacteriales y fungosas; el objetivo total es la producción de semillas y plantas sanas. Este objetivo requiere la organización rigurosa y el control de las diferentes fases de propagación. Los programas de producción para plantas sanas han sido elaborados en muchos países para especies principalmente propagadas vegetativamente (por ejemplo, la papa, vid, árboles frutales, pelargonium).

Las plantas y semillas certificadas son producidas de acuerdo a regulaciones técnicas elaboradas por autoridades competentes (como los ministerios de agricultura, investigadores e institutos técnicos, servicios de protección de plantas, las asociaciones de los productores y agricultores). Sin embargo, estos esquemas y protocolos de supervisión de virus están siendo aerodinamizados por los europeos. La regulación debe desarrollarse y ser capaz de integrar nuevas técnicas y adaptarse a los diferentes tipos de empresas. A parte forme los aspectos fitosanitarios que garanticen un producto de calidad. Una vez que ellos son aerodinamizados, la certificación es oficial y las empresas pueden ser aceptadas para la producción de un tipo de semilla o planta. En Francia, la conformidad con normas con regularidad es controlada por SOC (un organismo de control oficial). El material producido, si respeta las tolerancias permitidas sanitarias, comercialmente es vendido bajo la etiqueta oficial de "plantas certificadas".

La propagación *in vitro* naturalmente es incluida dentro del marco de un esquema de certificación. Cualquier técnica que acorta el tiempo de propagación de una reproducción sana es potencialmente beneficiosa ya que esto reduce los riesgos de una nueva contaminación. La micropropagación, que se lleva a cabo en unos metros cúbicos de laboratorio que de otra manera ocuparía varias hectáreas, ha revolucionado la producción de muchas especies hortícolas, pero requiere numerosos cuidados sanitarios y fisiológicos. La opción de reproducción, la verificación de la ausencia de virus, y la garantía de mantener la calidad varietal son los factores que son en particular importantes para el éxito de esta estrategia.

Los esquemas de certificación a menudo requieren modificaciones significativas en sistemas de producción. Su establecimiento conduce a coacciones técnicas que aumentan bastante el costo de plantas y semillas.

Cuadro 1. Antecedentes de la propagación *in vitro* del Género Opuntia

Especie	Explante	Medio y reguladores de crecimiento	Respuesta	Referencia
<i>Opuntia polycantha</i>	Brotes apicales	BA, GA ₃ y ANA	Hojas, Espinas y Brotes	Mauseth y Halperin, 1975
<i>Opuntia policantha</i>	Brotes apicales	Murashige y Skoog (1962) BAP GA ₃	Hoja y espinas	Mauseth, James D., 1977
<i>Opuntia amyclaea</i>	Secciones de tejido de cladodios jóvenes sin espinas	Murashige y Skoog (1962) BA 10 ⁻⁵ M	Brotes axilares	Escobar, A. H.A.; Villalobos, A. V. M. y Villegas, M. A. (1986)
<i>Opuntia spp</i>	yemas axilares o aeréolas de cladodios jóvenes	Murashige y Skoog (1962)	brotes	Estrada, L. A. A.; 1988
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Secciones de tejido de cladodios y raíces	Murashige y Skoog (1962) 8.8 µM Benciladenina (BA) y 0.5 µM ácido naphthaleneacético (NAA)	Plantas completas	Yasseen, M. Y.; Barringer. S. A.; Plittstoesser W. E.; Schnell.; 1995
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Secciones de cotiledones e hipocotilos de 21 días	Murashige y Skoog (1962) 2.3 µM 2,4 - D + 0.9 µM de Kinetina y 1.0 µM de picloram	Callos	Llamoca-Zarate, et al 1999
<i>Opuntia elatior</i>	Segmentos de cladodios de 1 cm con una aureola	Murashige y Skoog (1962) Suplementado con diferentes concentraciones de BA	Brotación de yemas	Vargas, T. E. y De Garcia, E. 1999
<i>Opuntia ellisiana</i> Griff.	Secciones de tejido con areolas de cladodios	Murashige y Skoog (1962) BAP (10 µM) Acido Indolbutilico (10 µM)	Brotes	Juárez, M. C. y Passera, C. B. (2002).
<i>Opuntia cochenillifera</i>	Aureolas	Murashige y Skoog (1962) 7.5 µM de BA 0.2 µM de IAA	Brotes axilares	Brasil, J. N.; et al. 2005
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.)	Apices	Murashige y Skoog (1962) Picloram 4 mg·l ⁻¹	Primordios foliares	Ferreira, G. F. L. A. et al., 2006

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización del área de trabajo.

El presente trabajo de investigación se realizó en el invernadero del área de virus del Departamento de Parasitología Agrícola, Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-Iztacala) perteneciente a la UNAM y en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo. Durante el periodo de abril del 2006 a mayo del presente año.

3.2. Metodología para la detección del virus.

3.2.1. Colecta de material enfermo e inoculación en plantas indicadoras.

En varios recorridos realizados durante los meses de abril a agosto del 2006, se colectaron cladodios de nopal con síntomas característicos de deformación en la zona de San Martín de las Pirámides. Posteriormente, en el invernadero, con una navaja y unas pinzas se tomó una porción de 1cm² de epidermis de cladodios enfermos con el fin de separar el virus. Las porciones se maceraron en 5 ml de solución amortiguadora (fosfato de sodio 0.1 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 11 especies indicadoras. Las hojas cotiledonales fueron previamente espolvoreadas con carborundum de 600 mallas (Cuadro 2). Las hojas inoculadas se lavaron con agua para

eliminar los residuos de macerado y carborundum. Para evitar posibles contaminaciones con sustancias inhibidoras u otros virus, la inoculación de cada planta se hizo con un hisopo de algodón nuevo. Las plantas indicadoras inoculadas se incubaron en el invernadero a una temperatura de 25 a 35 °C, 70 % de humedad relativa y 12 horas luz; por un período de hasta 30 días. Se registraron los síntomas presentes en cada una de estas planta. La inoculación en plantas indicadoras sanas con macerados de la epidermis de cladodios de nopal enfermos se hicieron en tres ocasiones con el mismo número de especies indicadoras.

Cuadro 2. Síntomas en plantas indicadoras y diferenciales inoculadas con el el virus asociado a síntomas de deformación en cladodios de nopal verdura.

HOSPEDANTES	SÍNTOMAS
<i>Nicotiana glauca</i> L.	Ss
<i>N. rustica</i> L.	Ss
<i>N. occidentalis</i> L.	Ss
<i>N. tabacum</i> var. <i>xanthi</i> L.	Ss
<i>N. benthamiana</i> L.	M
<i>N. glutinosa</i> L.	Llc
<i>Datura stramonium</i> L.	Llc
<i>Lycopersicon esculentum</i> M.	Ss
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Lln
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Llc
<i>Ch. amaranticolor</i> . Coste & Reyn.	Llc
<i>Capsicum annuum</i> L.	Ss

Llc = lesiones locales cloróticas; Lln = Lesiones locales necróticas; M = marchitez;
Ss = Sin síntomas

Las plantas indicadoras que presentaron síntomas fueron separadas después del período de incubación en el invernadero y sus hojas fueron maceradas para inocular nuevas plantas indicadoras, con el fin de obtener aislados puros del virus. Este ensayo se repitió tres veces con el método descrito por Kurstak, (1981) y Dijkstra y De Pajer, (1998).

Las plántulas de las especies indicadoras utilizadas para separar los virus asociados en el nopal e inoculadas por transmisión mecánica fueron producidas en invernadero desde semillas libres de virus 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 verdura desde semillas, o usar plantas certificadas como libres de virus no se realizaron ensayos de transmisión mecánica de virus en esta especie, de tal manera que los postulados de Koch no se pudieron verificar.

3.2.2. Microscopia electrónica

En una rejilla de cobre cubierta con forvan se colocaron 50 mL del macerado de epidermis de cladodios de nopal con síntomas de deformación y en otra rejilla la misma cantidad de macerado de hojas de plantas indicadoras con lesiones locales o marchitez. Las muestras se incubaron 10 min, posteriormente se les agregó 50 mL del fijador (glutaraldehído al 2.5% en cacodilato de Na 0.1 M pH 7.2) y 50 mL de acetato de uranilo al 5%, incubando 10 min. y se lavó con agua destilada estéril en cada paso. La observación, medición y toma de microfotografías a las partículas virales se realizó en un microscopio electrónico de transmisión Mod. JEOL 100 CX (Dijkstra y De Jager, 1998).

3.2.3. Detección de virus 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 no disponer de antisueros específicos de los distintos virus reportados en cactáceas, en este trabajo se utilizaron antisueros policlonales comerciales (Agdia, Co. USA) disponibles en el laboratorio de los virus X de la papa (Potato virus X. Potexvirus) mosaico del tabaco (*Tobacco mosaic virus*. TMV. Tobamovirus) y Moteado del Clavel (Carnation Mottle *virus*. CarMV. Carmovirus), 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 minutos 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 (Anexo 1).

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

Se obtuvo ARN total de 0.1 g. de tejido de cladodios de nopal con síntomas de deformación, de hojas de *Chenopodium amaranticolor* inoculadas con el virus del nopal. Además, se utilizaron plantas sanas de *Ch. amarinticolor* como testigo negativo. La extracción del ARN total se realizó mediante el método Trizol^{MR} (Anexo 2).

La transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa o rt-PCR se realizó en un solo paso, mezclando en un tubo (1.5 mL) 12.5 µl de agua, 5.0 µl solución

amortiguadora 5x, 0.5 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl del oligonucleótido Primer 2 Rc, 1 µl del oligonucleótido Primer 5 Rc, 1 µl de MgSO₄, 0.5 µl de AMV, 0.5 de TIF 1 y 3 µl de ARN total. La mezcla se colocó en un termociclador (GeneAmp PCR System 2400), y se usó el siguiente programa de amplificación: 45 min. a 42°C, 94°C a 3 minutos desnaturalización 30 segundos a 94°C, apareamiento 1 minuto a 51.5 °C y extensión 1 minuto a 72 °C, por 35 ciclos.

Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1 % y su peso molecular se calculó por comparación con el marcador de peso molecular 1 KB plus (GIBCO BRL) que también fue incluido en el mismo gel de electroforesis. Las condiciones de electroforesis fueron 65V/80 minutos a temperatura del laboratorio.

3.3. Metodología para el cultivo *in vitro* de nopal.

3.3.1. Obtención material para cultivo de tejidos.

El material utilizado se obtuvo de los campos de Chapingo; se seleccionaron plantas adultas, sanas y en brotación. Los cladodios se cortaron de 5 a 10 cm de longitud. Posteriormente, estos cladodios fueron transportados al Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Fitotecnia.

3.3.2. Preparación de los medios de cultivo

El medio de cultivo empleado fue el básico MS al 100 % de Murashige y Skoog (1962), suplementado con tiamina 40 mg.L⁻¹, inositol 100 mg.L⁻¹, sacarosa al 3 % (30 g.L⁻¹) como fuente de carbohidratos, vitaminas WS 10 ml/l Wetmore y Sonokin (1955).

El medio se preparó a partir de soluciones concentradas (stock), de donde se tomaron alícuotas correspondientes para la preparación del medio de cultivo MS, éstas se

agregaron en un matraz Erlenmeyer con agua desionizada y destilada, posteriormente se adicionaron la sacarosa, inositol, tiamina y las vitaminas WS, para después agregar los diferentes reguladores de crecimiento utilizados y aforar al volumen deseado, ajustando el pH a 5.7, utilizando ácido clorhídrico (HCl) y/o Hidróxido de sodio (NaOH) 1 N; posteriormente se agregó el agar (8g.L^{-1}), como agente gelificante, el cual se disolvió en el horno de microondas, después se le adicionó carbón activado al 0.1%. Una vez diluido se vació 15 ml en tubos de ensaye con capacidad de 50 ml, por último, el medio se esterilizó en el autoclave a una presión de 1.5 kg/cm^2 y a una temperatura de 121°C durante 20 minutos.

3.3.3. Desinfección de los explantes y establecimiento *in vitro*

Para su desinfección los explantes se lavaron vigorosamente con detergente comercial más unas gotas de tween 80; posteriormente se colocaron en etanol al 70 % durante un minuto; después se pasaron a una solución de hipoclorito del sodio al 20 % durante 15 minutos; luego se mantuvieron en agitación durante 30 minutos en una solución que contenía fungicida (Benlate^R). Transcurrido este tiempo en condiciones asépticas, los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada y esterilizada con antioxidante.

Una vez desinfectados, los cladodios, en una campana de flujo laminar se colocaron en cajas Petri y con un bisturí y unas pinzas de disección, se eliminó el contorno para luego cortar en pequeños segmentos los cuales tenían 2 yemas (aureolas) (Figura 4).

En esta etapa se evaluó la variable:

Porcentaje de contaminación por hongo y/o bacteria

La siembra de los explantes se realizó con pinzas de disección, sumergiéndolos dentro del medio de cultivo manteniendo la polaridad de la yema.

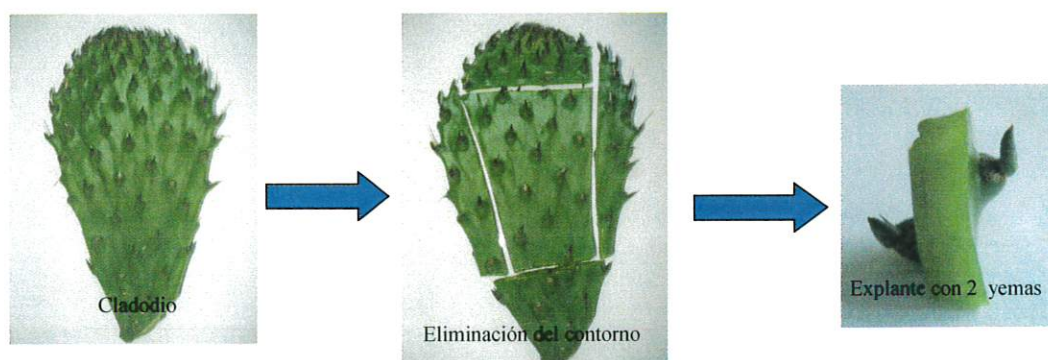


Figura 4. Cortes realizados al cladodio para obtener los explantes utilizados en la propagación *in vitro* de nopal.

3.3.4. Condiciones de incubación

Todos los cultivos se incubaron en un cuarto de cultivo con condiciones ambientales controladas, a una temperatura de $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperiodo de 16 horas de intensidad lumínica ($27.02 \mu\text{M} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) y 8 hrs. de oscuridad.

3.3.5. Inducción de brotes *in vitro*

Se realizaron varios bioensayos con el fin de seleccionar los reguladores de crecimiento que produjeran los mejores resultados. Para esto se hicieron varias combinaciones de diferentes reguladores de crecimiento de acuerdo con el Cuadro 3.

Los tratamientos que se seleccionaron fueron: 22, 23, 24, 25 y 26. Éstas propiciaron que los explantes empezaran a desarrollar o permanecían vivos por más tiempo.

La unidad experimental fue un tubo de ensaye por cada explante de nopal sembrado. El experimento se hizo con un diseño completamente al azar. Para cada tratamiento se usaron 10 repeticiones.

Cuadro 3. Tratamientos empleados en la inducción in vitro de brotes de nopal.

Tratamiento	BA (mg L ⁻¹)	AIB(mg L ⁻¹)	K (mgL ⁻¹)	2,4-D (mgL ⁻¹)	2iP(mgL ⁻¹)	ANA(mgL ⁻¹)	AG ₃ (mgL ⁻¹)
1	1.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
2	1.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
3	1.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
4	3.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
5	3.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
6	3.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
7	10	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
8	10	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
9	10	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.1	0.0
11	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.3	0.0
12	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	1.0	0.0
13	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.1	0.0
14	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	0.3	0.0
15	0.0	0.0	3.0	0.0	0.0	1.0	0.0
16	0.0	0.0	10	0.0	0.0	0.1	0.0
17	0.0	0.0	10	0.0	0.0	0.3	0.0
18	0.0	0.0	10	0.0	0.0	1.0	0.0
19	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
20	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0
21	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5
22	3.0	0.0	0.0	0.0	3.0	0.1	0.0
23	0.5	0.0	0.0	0.0	1.0	0.3	0.0
24	1.0	0.0	0.5	0.2	0.0	0.0	0.0
25	3.0	0.0	1.0	0.3	0.0	0.0	0.0
26	3.0	0.0	3.0	0.5	0.0	0.0	0.0

Las variables evaluadas en esta fase fueron:

1. Velocidad de brotación: se midió como el número de días para que empezaran a brotar las yemas a partir del momento en que se sembraron en el medio de cultivo.
2. Número de brotes por explante
3. Vigor de brotes: para medir esta variable se tomo la siguiente escala; 1 para los poco vigorosos, 2 los que presentaban vigor regular y 3 para los más vigorosos.
4. Longitud de brotes en cm.
5. Número de raíces
6. Longitud de raíces en cm. Se midieron todas las raíces de los brotes al momento de disectarlos para la siguiente fase de multiplicación.

3.3.6. Multiplicación de brotes.

Con el fin de incrementar la cantidad de material obtenido se llevó a cabo esta fase. En ella se utilizaron los brotes obtenidos anteriormente y el mismo medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) suplementado con Benciladenina, Kinetina y 2,4-D. Los brotes fueron disectados transversal o longitudinalmente (tomados como tratamientos, Figura 5).

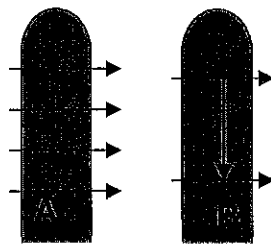


Figura 5. A) corte transversal y B) corte longitudinal del nopal para su multiplicación.

La unidad experimental consistió de un tubo de ensaye por cada explante disectado con nueve repeticiones, en un diseño completamente al azar.

Variables evaluadas:

1. Desarrollo del brote; se observó si hubo o no respuesta del brote después de una semana de haber realizado el corte.
2. Número de brotes por corte
3. Longitud del brote en cm.
4. Número de raíces
5. Longitud de raíces en cm. Se midieron todas las raíces de cada brote, antes de ser transferidos a suelo.
6. Presencia/ausencia de callo.

Los explantes que presentaron desarrollo de callo se transfirieron a medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962) al 100 % suplementado con 1.0 mg.L^{-1} de BA y 0.3 mg.L^{-1} de AIA.

A los datos obtenidos se les hizo un análisis de varianza por medio del paquete estadístico SAS. En caso del número de raíces los datos se transformaron previamente. La transformación fue $\sqrt{x+0.5}$.

3.3.7. Aclimatación de plantas a condiciones de suelo.

Las plantas con un sistema radical bien desarrollado se transfirieron a vasos de unicel con sustrato que fue una mezcla de peat moss, vermiculita y agrolita.

Las plantas fueron lavadas con agua corriente para retirar cualquier rastro de agar que pudiese repercutir como fuente de inóculo de diferentes enfermedades. Después fueron transplantadas en sustrato previamente regado. Para aclimatar las plantas a las nuevas condiciones ambientales se redujo gradualmente la humedad relativa con la finalidad de que puedan desarrollarse independientemente.

En esta última fase se determinó el porcentaje de sobrevivencia de plantas adaptadas a condiciones de invernadero.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Diagnóstico del virus

4.1.1. Separación de virus y pruebas de susceptibilidad en plantas indicadoras

Algunas de las especies de plantas indicadoras inoculadas mecánicamente con los macerados de la epidermis de cladodios de plantas de nopal verdura con deformación (Figura 6) mostraron síntomas ocho días después de haber realizado la inoculación mecánica en el invernadero, el cual se asoció con algún tipo de virus. Sin embargo en el caso de *N. benthamiana* los síntomas se presentaron entre 20 y 30 días después de la inoculación.

El desarrollo de síntomas en las diferentes plantas indicadoras inoculadas fue notablemente favorecido a temperaturas mayores a 30°C. Sin embargo, a temperaturas inferiores se presentaba una remisión de síntomas en todos los hospedantes.

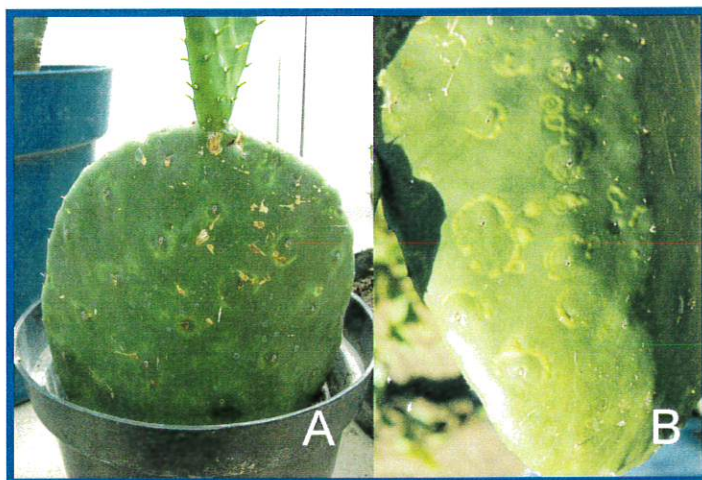


Figura 6. Síntomas de deformación en nopal verdura A) Cladodio en el invernadero y B) Cladodio recién colectado en campo.

Los síntomas observados incluyeron pequeñas lesiones locales cloróticas y posteriormente necróticas sin daños sistémicos, en *Gomphrena globosa* (Figura 7A), *Nicotiana glutinosa* (Figura 7B), *Datura stramonium* (Figura 7C), *Chenopodium amaranticolor* (Figura 7D) y *Ch. quinoa* (Figura 7E). Únicamente en plantas de *N. benthamiana* (Figura 7F) se observó un enrollamiento de hojas nuevas y posteriormente una marchitez, lo que indicó un movimiento sistémico del agente causal. No se observó ningún síntoma en plantas de *N. clavelandi*, *N. occidentalis*, *N. rustica*, *N. xanthi*, *Lycopersicon esculentum* y *C. annuum*.

Se consideró 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 plantas de nopal verdura asociado con la deformación de los cladodios.

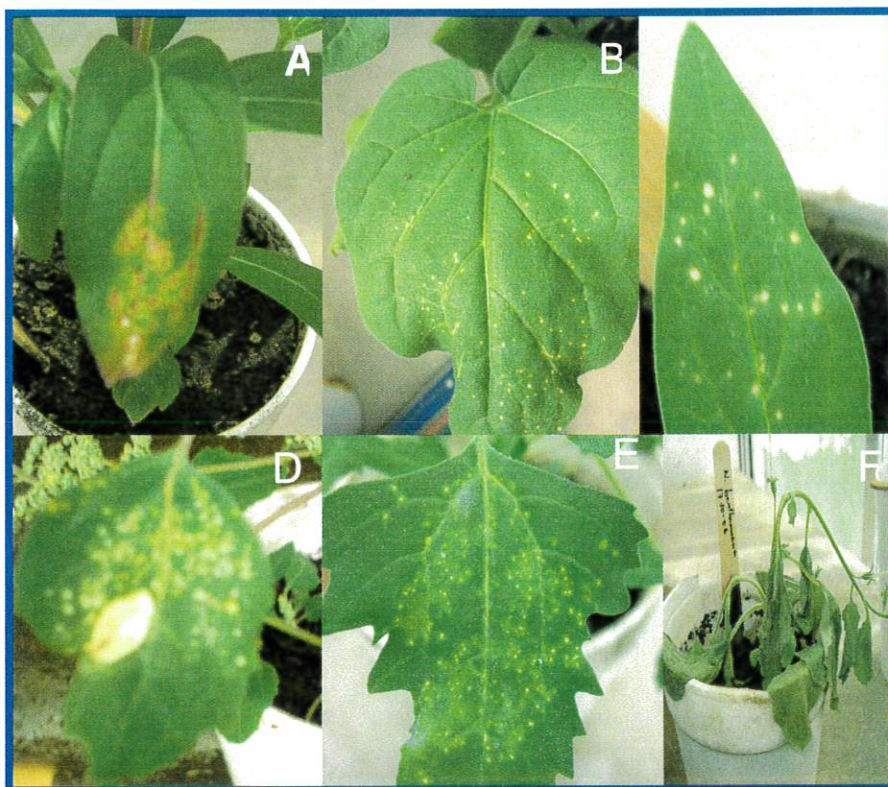


Figura 7. Lesiones locales necróticas en plantas indicadoras causadas por un aislado del Carmovirus separado de *O. ficus-indica*, transmitido mecánicamente a: A) *Gomphrena globosa*, B) *Chenopodium amaranticolor*, C) *Datura stramonium*. D) *Chenopodium quinoa* E) *Nicotiana glutinosa* y F) marchitez en *N. benthamiana*.

4.1.2. Microscopía electrónica

Se observaron partículas icosaédricas, únicamente de las preparaciones de *Ch. amaranticolor*. Éste comparte características con las descritas para los miembros del grupo Carmovirus. Sin embargo, en las fotos no distinguió dichas partículas. Así mismo, en los macerados obtenidos de tejidos de los cladodios con síntomas de deformación, posiblemente la naturaleza mucilaginosa de estos tejidos impidió la fijación de las partículas virales a la superficie de la rejilla de cobre para su observación, o probablemente al momento de utilizar los tejidos macerados de los cladodios presentaban una cantidad de partículas virales muy reducida (Dijkstra y D Pager, 1998).

4.1.3. Detección por inmunoadsorción ligada a enzimas (DAS-ELISA)

Las pruebas con esta técnica con tejidos de plantas indicadoras inoculadas con el virus separado del nopal siempre fueron negativas para los antisueros usados en el experimento. Los resultados indican que el virus de nopal verdura asociado con los síntomas de deformación no tiene relaciones serológicas cercanas con los virus cuyos antisueros se probaron en el presente trabajo, o posiblemente es una especie distinta que se debe caracterizar serológicamente (Chantler y Clayton, 1988). Así mismo en tejidos de cladodios enfermos tampoco fueron positivos, lo que confirmó que el virus del nopal no tiene relaciones serológicas, aunque es posible que el mucílago de esta especie interfirió con el procedimiento de la técnica ELISA (Kemeny y Chalacombe, 1988).

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

El ensayo de la rt-PCR fue positivo cuando se utilizó ARN procedente de tejido de cladodios de nopal y de plantas indicadoras inoculadas con el virus del nopal (Figura 8). Se confirmó una identidad del 95 % con Carmovirus por transcripción inversa ligada a la PCR (rt-PCR) y secuenciación directa de sus productos. Las secuencias obtenidas, alineadas y comparadas con las disponibles en el NCBI/GenBank databases mostraron una alta identidad con el *Carnation mottle virus* (Carmovirus) (Figura 9). Se ha reportado la presencia de un posible Carmovirus en plantas de Zaguaro en el desierto de Nuevo México, USA, del que no se encontraron secuencias en el Genbank. Éste sería el primer reporte de un Carmovirus en *Opuntia ficus-indica* en México y aunque hasta este momento se desconoce el parentesco del virus con otros aislados que afectan otras especies de cactáceas.

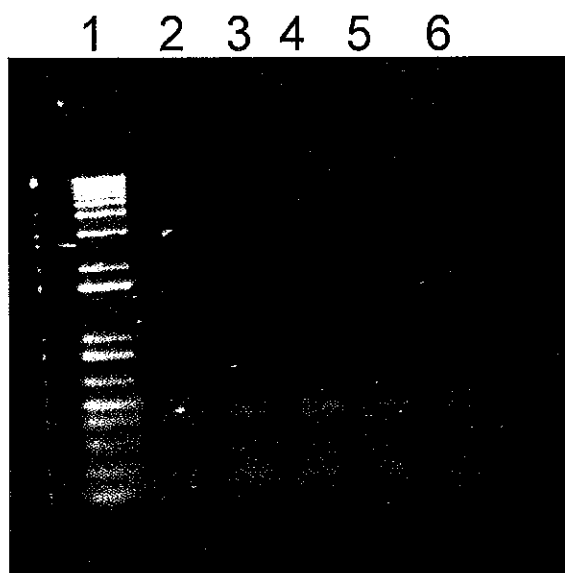


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de productos secuenciados de la rt-PCR del gen de la proteína de la cápside del carmovirus separado de cladodios de nopal. carril 1) Marcador de peso molecular 1 Kb., 2), y 3), *Chenopodium amaranticolor* 4), 5) y 6 *O. ficus indica*.

```

1 ctcaagctgg nnagtccatg acgatgagta cgaccgaact gctaagcacc gtcaaaggta
61 ccacgggtgt tatccaagc ttgaagact gggtcgttc ccccgaaac gtagccgtct
121 tccctcaact ctgctgctg gcgacgaact tcaacaagna ccgcattact gcgctcactg
181 tgaagtactc acccgctgt agctcgaga ccaatgggag ggtggctctg ggatcaatg
241 atgacgcttc ggacacacca ccaaccacca aggntggatt ctacgatctg ggcaaacacn
301 tgnaaactgc tgcacagaat agtcnaggna tctantgata ccagtagacg gntaaacnn
361 ggtnatcng gt//

```

EF584754

```

1 cngcccacca angnggtca gccttggtca aaccccgat gttgacaaga ctattcgtcc
61 aaaatcgact agacnngcn tcgtcnctag ncgagtcctt gatgaaccgg gtttgccgt
121 ctacnggtat cactagatcc ttggctgtct gtgcagcagt ttccacgtgt ttgccagat
181 cgtagaatcc aaccttggtg gttggtggg tgtccgaagc gtcatcattg aatcccagag
241 ccaccctccc attggtctcg aagctacacg cgggtgagnt acttcacagt gagcgagta
301 atcggtact tgtgaagtn cggcgnacgc nngagagtt gagggaagan nggtacnttt
361 cgtnggggaa ata

```

EF584755

Figura 9. Secuencias obtenidas de la rt-PCR y alineadas en el NCBI/GenBank.

4.2. Cultivo *in vitro* del nopal (*O. ficus-indica*)

4.2.1. Desinfección y establecimiento *in vitro* de inóculos o explantes.

En esta etapa se pudo observar que la contaminación de los explantes producida por la presencia de hongos y bacterias durante las primeras semanas del cultivo *in vitro* del nopal, así como el necrozamiento de los tejidos, reducen altamente el potencial de multiplicación del nopal.

Ault y Blackmon (1987) y Balch *et al.* (1998) mencionan que la contaminación que ocurre en la mayoría de los explantes de cactáceas cultivadas *in vitro* es un problema serio de la propagación de algunos miembros de esta familia. Mauseth y Halperin (1975) y Havell y Zolar (1983) describen que la dificultad en la desinfección de estos explantes se debe, en parte, a la estructura morfológica de la mayoría de las cactáceas, las cuales tienen una yema compuesta por un eje extremadamente corto que tiene espinas.

Los porcentajes de contaminación observados en el presente trabajo fueron muy altos, se perdió el 56 % del total de explantes sembrados. También se pudo observar que la contaminación se manifestó principalmente en las primeras cuatro semanas del cultivo; aunque en las primeras dos ocurrió con mayor frecuencia. Los hongos se presentaron en mayor proporción que las bacterias. Sin embargo, en un explante se detectó la presencia de un hongo después de 12 semanas de establecido (Figura 10). La identificación de este hongo se hizo mediante claves taxonómicas, la especie encontrada fue *Colletotrichum sp* reportado como causante de la antracnosis de la penca y del fruto (Figura 11).

Vargas y de García (1999), mencionan que la metodología de desinfección de los explantes de *Opuntia elatior*, empleada en su investigación fue exitosa, obteniendo un 95% de explantes libres de agentes contaminantes.

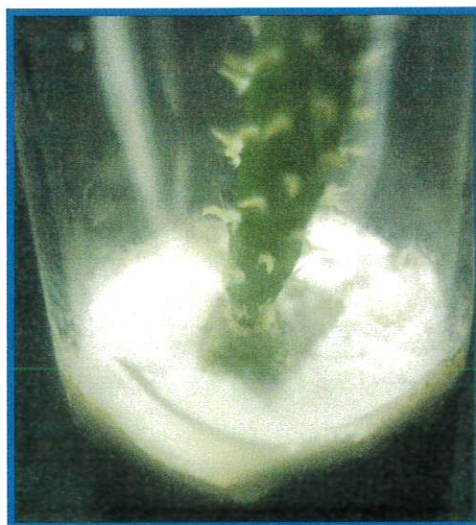


Figura 10. Presencia de hongos en el desarrollo *in vitro* de brotes de nopal.

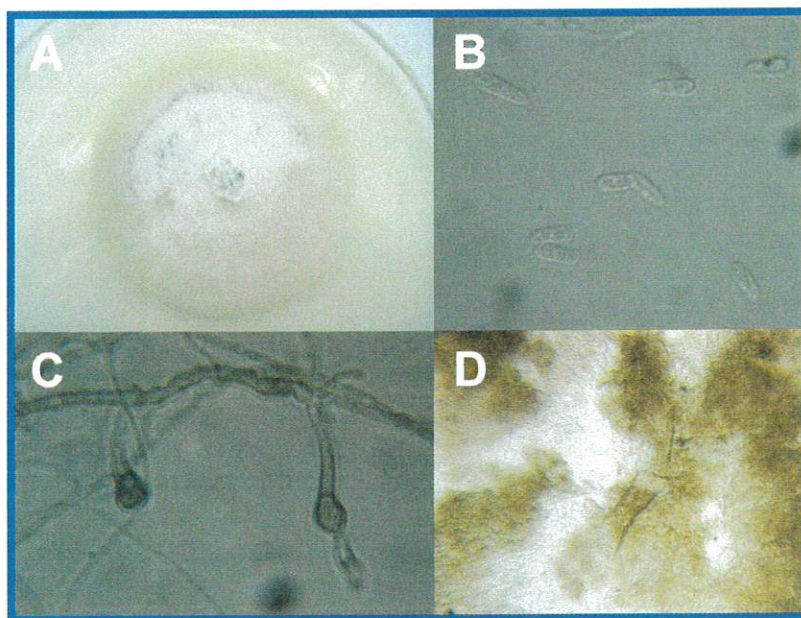


Figura 11 . *Colletotrichum* sp. A) Crecimiento en medio de cultivo, B) Conidios hialinos, C) Clamidosporas y D) Presencia de espinas o setas.

4.2.2. Inducción de brotes

En *O. ficus-indica* se encontró que las yemas se desarrollaron sólo en el medio de cultivo (tratamiento 26) que contenía BA y Kinetina en una concentración de 3.0 mg.L^{-1} y 2,4-D en una concentración de 0.5 mg.L^{-1} , respectivamente. A los cuarenta y dos días de cultivo se detectó el efecto de esta concentración de BA, K y 2,4-D que produjo brotación de yemas en los explantes (Figura 12). De un total de 10 unidades experimentales que recibieron el tratamiento 26, con un brote por explante; con un promedio de 1.31 cm, además tenían una raíz con una longitud promedio de 1.13 cm; todos presentaban un color verde intenso y lucían vigorosos. Debido a que sólo el tratamiento 26 indujo la brotación se descartó su análisis de varianza. En cambio, se realizó la prueba no paramétrica, de la hipótesis nula que establece que el porcentaje de brotes inducidos por el tratamiento 26 es 50 %. Con $\alpha = 0.05$ no se rechazó.

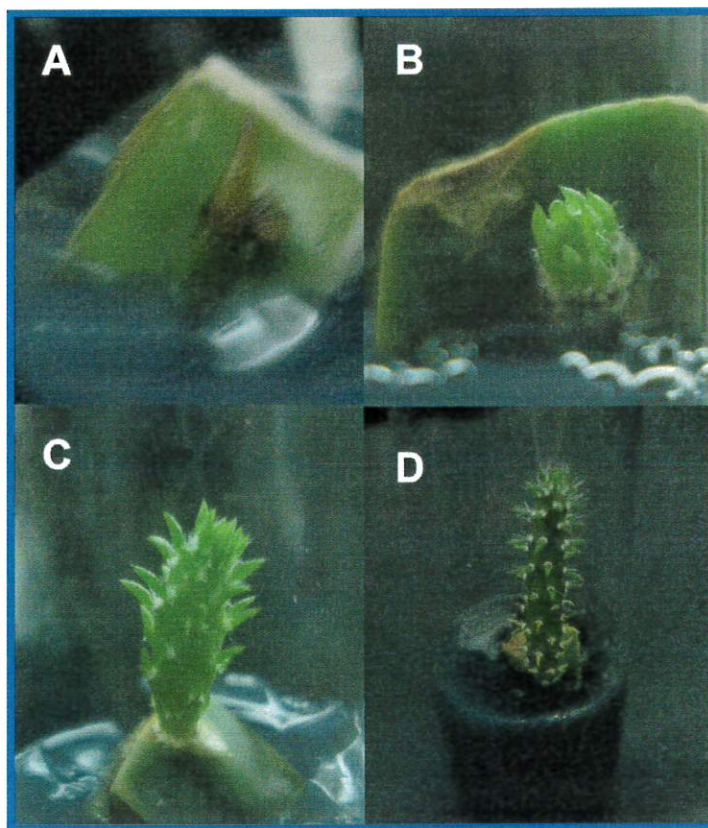


Figura 12. Brotación *in vitro* de *O. ficus-indica* A) Explante en medio de cultivo MS al 100 % complementado con Inositol y Tiamina y vitaminas WS y los reguladores BA y Kinetina en concentraciones de 3.0 mg.L⁻¹ y 2,4-D 0.5 mg/l , B) Explante después de 7 semanas en medio de cultivo, C y D) Explantes después de 3 meses en el mismo medio de cultivo.

Balch *et al.* (1998), trabajaron en la propagación *in vitro* de 21 especies de cactáceas, encontraron que en algunas de éstas se produce una alta proliferación de yemas con el uso de BA, mientras que en las especies estudiadas de los géneros *Equinoceraus* y *Ferocactus* para que se observe este proceso se requiere el uso combinado de BA y ácido Indolacético. Así mismo, en muchos géneros de cactáceas, el medio sin hormonas genera una tasa baja de proliferación de yemas (Infante, 1992; Balch *et al.* (1998).

Mohamed-Yasseen *et al.*, (1995), trabajó con la propagación *in vitro* de *Opuntia ficus-indica*, observaron que con explantes de la zona intermedia de la planta, un incremento de la concentración de BA de 4.4 a 8.8 μ M resultaba en un incremento significativo del

número de brotes producidos por explante, pero concentraciones superiores a $8.8 \mu\text{M}$, no produjeron más brotes. Mientras que en explantes proximales y distales, un incremento de BA superior a $4.4 \mu\text{M}$, no causó una mayor producción de brotes. Además, la longitud de los brotes fue menor con el incremento de la concentración de BA y la diferencia en crecimiento fue similar en todos los explantes, evidenciándose que la respuesta de éstos en cultivo *in vitro* y con adición de BA depende mucho de la zona de la planta donde se tome dicho material vegetal.

4.2.3. Multiplicación de brotes.

Algunos de los brotes obtenidos *in vitro* en la etapa anterior, fueron cortados transversalmente y otros longitudinalmente. Las secciones resultantes contenían yemas y se cultivaron en el mismo medio de cultivo (MS al 100% + 3.0 mg.L^{-1} BA, 3.0 mg.L^{-1} K y 0.5 mg.L^{-1} 2,4-D)(Figura 13). El análisis de varianza (Anexo 3 cuadros 1, 2 y 3) detectó diferencias significativas entre las medias de los dos tipos de corte. Las mejores respuestas correspondieron al tratamiento donde los explantes fueron cortados transversalmente. Éstos se desarrollaron más rápidamente que los que fueron cortados longitudinalmente que mostraron inhibición en el crecimiento y producción de callo (Figura 14). Éstos fueron transferidos a otro medio de cultivo para inhibir el crecimiento del callo y después de una semana se regresaron al medio de cultivo utilizado inicialmente. Por esta razón su longitud promedio del brote y de raíces fue menor.

Cuadro 4. Comparación de las medias de tres caracteres de brotes que provienen de cortes transversales y longitudinales según los análisis de varianza de estas variables (cuadros 1, 2 y 3 del anexo).

Tratamiento	Longitud de brote (cm)	Número de raíces (cm)	Longitud de raíces (cm)
Corte transversal	2.0222 A*	3.333A*	1.7111 A*
Corte longitudinal	1.3889 B	1.222 B	0.7111 B

*Las medias de una variable con la misma letra son estadísticamente iguales ($\alpha \leq 0.05$).

En algunos casos, las plantas regeneradas a partir de callo pueden exhibir variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981), mientras que las plantas regeneradas a partir de yemas axilares suelen ser genéticamente estables (Murashige, 1974; Hu and Wang, 1983; Meins, 1986, citados por De Oliveira *et al.* (1995).

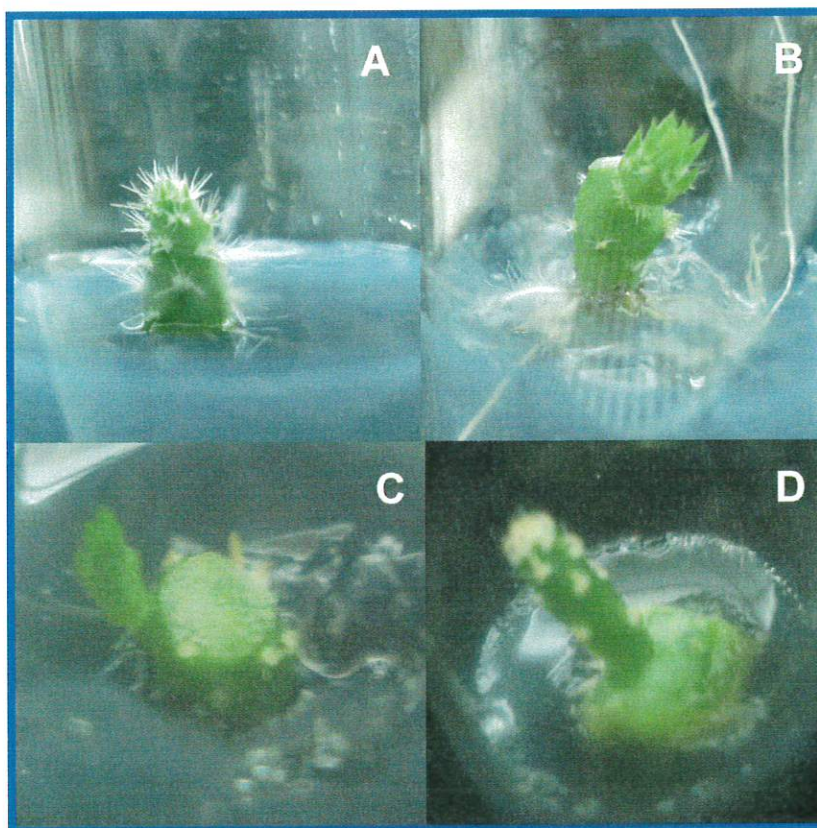


Figura 13. Multiplicación de brotes de *O. ficus-indica* libres de contaminantes *in vitro*. A) Brote de la parte apical B) Brote a partir de la parte basal del nopal. C) Brotación a partir de corte transversal y D) Brotación a partir de corte longitudinal



Figura 14. Producción de callo en cortes longitudinales después de una semana en medio de cultivo (MS al 100% + 3.0 mg.L⁻¹ BA, 3.0 mg.L⁻¹ K y 0.5 mg.L⁻¹ 2,4-D).

4.2.4. Enraizamiento de brotes.

El nopal (*O. ficus-indica*) no requirió un medio especial para enraizar los brotes obtenidos debido a su capacidad de enraizamiento. Se observó generación de raíces al mismo tiempo que los brotes se desarrollaban en los medios con reguladores de crecimiento (MS al 100% + 3.0 mg.L⁻¹ BA, 3.0 mg.L⁻¹ K y 0.5 mg.L⁻¹ 2,4-D). Las raíces de dichos brotes se empezaron a formar en la parte basal (Figura 15).

Cheng and Zhou (2001) mencionan que el enraizamiento de *Opuntia dillenii* ocurrió en medio MS. En cambio, García *et al.*, (2005) mencionan que para obtener un óptimo desarrollo de raíces fue necesario adicionar al medio IBA (ácido indolbutírico).

Téllez (2007) encontró que *Schlumbergera truncata* produjo raíces mientras se encontraban en los tratamientos hormonales, y que este fenómeno se incrementa cuando los brotes se subcultivan en medio MS sin reguladores.



Figura 15. Generación de raíces de *Opuntia ficus-indica* en mismo medio de cultivo de brotación (MS al 100% + 3.0 mg.L⁻¹ BA, 3.0 mg.L⁻¹ K y 0.5 mg.L⁻¹ 2,4-D) después de 3 meses.

4.2.5. Aclimatación de plantas a suelo

La aclimatación de las plantas al suelo es una de las principales limitantes en el cultivo *in vitro*, en muchas especies. Sin embargo, en este caso se logró el establecimiento de las plantas, regeneradas y enraizadas *in vitro* en el suelo, ya que de un total de 19 plantas obtenidas, sólo se transfirieron ocho a sustrato. De éstas a un mes de haber sido transferidas, el porcentaje de sobrevivencia fue 100 % (Figura 16).

Escobar *et al.* (1986) obtuvieron el 100 % de supervivencia en el transplante de *Opuntia amyclaea* a suelo.

Vargas y de García (1999), encontraron que la aclimatación de las plantas de *Opuntia elatior*, en condiciones de vivero resultó exitosa.

Zhuang *et al.* (2004) registraron un 90 % de sobrevivencia en la etapa de aclimatación de *Opuntia ficus-indica*.

Brasil *et al.* (2005) encontraron que la aclimatación de plántulas de *Opuntia cochenillifera* fue exitosa.

De acuerdo con Escobar *et al.* (1986), la alta supervivencia puede ser el resultado de una adaptación natural de este grupo de plantas a las variaciones de humedad del ambiente, así como también a la formación del sistema radicular conectado directamente a los haces vasculares del tallo.

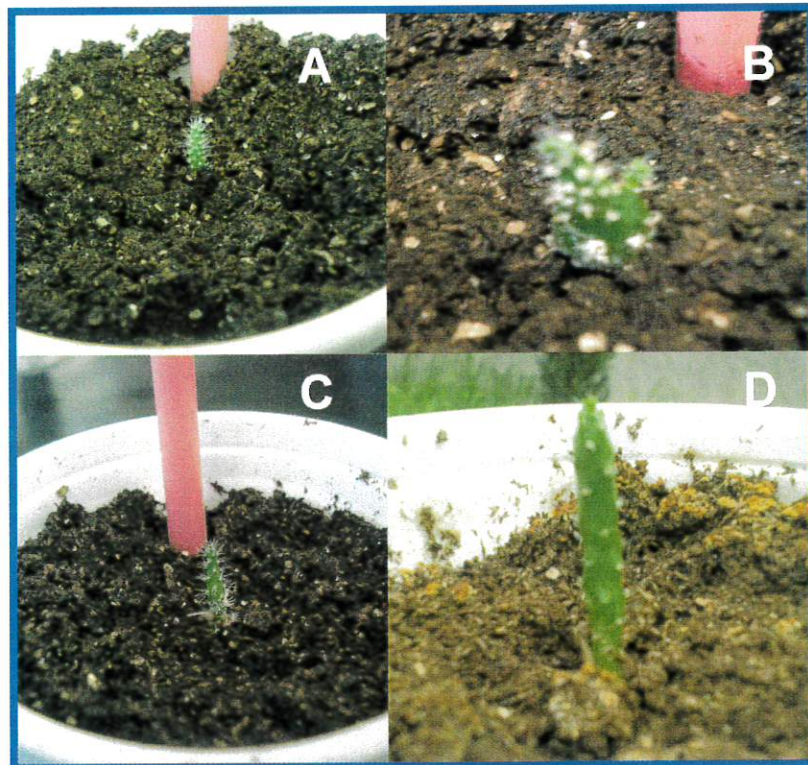


Figura 16. A) Transferencia de plantas de nopal *in vitro* a suelo, B) Planta transferida con dos brotes C) Plantas recién transferidas, y D) Planta después de 2 meses de transferida a suelo.

5. CONCLUSIONES

La deformación de los cladodios del nopal (*O. ficus-indica* L. Mill) colectados en la zona de San Martín de las Pirámides, Estado de México, se relaciona con la infección de un virus de cadena sencilla, mecánicamente transmisible a un pequeño número de especies de plantas indicadoras, con morfología de la partícula viral del tipo de icosahedros, semejante a los Carmovirus. Sin embargo, el virus separado del nopal verdura no mostró relaciones serológicas con el antisuero CarMV.

Se confirmó la identidad del Carmovirus por transcripción inversa ligada a la PCR (rt-PCR) y secuenciación directa de sus productos. Las secuencias obtenidas, alineadas y comparadas con las disponibles en el NCBI/GenBank databases mostraron una alta identidad nucleotídica con el *Carnation mottle virus* (Carmovirus). Éste sería el primer reporte de un Carmovirus en *Opuntia ficus-indica* en México, aunque se desconoce el parentesco de este virus con otros aislados que afectan a otras cactáceas.

El esquema establecido en cultivo de tejidos permite regenerar o recuperar plantas *in vitro* a partir de explantes contaminados con hongos o bacterias; así mismo se logró establecer un sistema de propagación para *O. ficus-indica* que podría ser utilizado como una herramienta con un alto potencial para la propagación de esta especie. Además este proceso puede servir de base para investigar sobre la obtención de plantas sanas a partir de material infectado con virus.

6. LITERATURA CITADA

Anónimo. 2001. El Nopal. Claridades Agropecuarias No. 98. Disponible en:

<http://www.infoaserca.gob.mx/claridades/revistas/098/ca098.pdf#page=1>.

Anónimo. 2005. Anuario Estadístico de la producción agrícola 2005. Disponible en:

<http://www.siap.gob.mx/>.

Agrios, G. N. 2001. Fitopatología. Segunda edición. Editorial Limusa. S.A. de C.V.

México, D.F. 838 p.

Astier S., J. Albouy., Y. Maury., C. Robaglia. and H. Lecoq. 2006. Principles of plant virology genome, pathogenicity, virus ecology. Science Publishers. E.U. 472 p.

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.

- Ault, J. R., W, Blackmon. 1987. In vitro propagation of *Ferocactus acanthodes* (Cactaceae). *HorScience*. 22: 126-127.
- Balch, E. P., M, Pérez., E, Villalobos., E, Meza., L, Morones., H, Lizalde. 1998. Micropropagation of 21 species of mexican cactus by axillary proliferation. In vitro *Cell. Dev. Biol. Plant*. 34: 131-136.
- Bhojmani, S.S. y M.K. Razdan. 1983. *Plant tissue culture: theory and practice*. Ed. Elsevier Science Publishers. Netherlands.
- Borrego, E. F. y N. Burgos V. 1986. *El Nopal*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo. Coahuila, Saltillo, México.
- Brasil, J. N.; Jereissati, E.S.; Santos, M.R.A.; Campos, F.A.P. 2005. In vitro micropropagation of *Nopalea cochenillifera* (Cactaceae). *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 79: 160 – 162 pp.
- Bravo-Hollis, H. 1978. *Las cactáceas de México*. Vol. 1 Universidad Nacional Autónoma de México. Pp. 1-83.
- 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.

Conabio 2007. <http://www.conabio.gob.mx>. (Febrero 2008)

Conci, V. C. 2004. Obtención de plantas libres de virus editado en: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal editores: Editores: Echenique V., Rubinstein C. y Mroginski L. Ediciones INTA.

Conger, B, V. 1984. Cloning Agricultural plants via in vitro techniques. Ed. CRS Press Inc. U.S.A.

Conti, M., Galltelli. D., Lisa. V., Lovisolo. O. Martelli. G. P., Razzino. A., Luigi. R. G. y Vovlas. C. 2000. Principales virus de las plantas hortícolas. Ediciones Mundi prensa. Pp.

Cruz, F. M. y Frias, T. G. A. 1997. Guía ilustrada de la prueba de inmunoadsorción con enzimas ligadas para La detección de fitopatógenos. SAGAR. México, D.F. 23 p.

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.

Cheng, L. and Zhou, G. 2001. Preliminary experiment on in vitro propagation of *Opuntia dillenii*. Journal of Shanghai Agricultural College 19(2):145-147.

Chessin M., and D. E. Lesemann. 1972. Distribution of cactus viruses in wild plants.
Phytopathology 62: 97-99.

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.

Debergh, P.C. y L.J. Maene. 1981. A sheme for commercial propagation for ornamental
Plant by Tissue Culture. Scientia Horticulturae. 14: 335 – 345 pp.

De la Rosa. H. P. y Santamaría. A. D. 1998. El nopal: usos, manejo agronómico y costos
de producción en México. UACH. México.

De la Torre. A. R. Salazar. S. M. y Ruiz. M. R. 2007. Ocurrencia de un Tobamovirus
asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México.
Agrociencia. 41: 763 -773.

Dijkstra J., and P. C. De Pater. 1998. Practical Plant Virology. Protocols and Exercises.
Edit. Springer, Berlin. 459. p.

De Oliveira S. A., M, Machado., A, Prioli., C, Mangolin. 1995. *In vitro* propagation of
Cereus peruvianus Mill. (Cactaceae). In vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 31: 47-51.

- Escobar, A. H.A.; Villalobos, A. V. M. y Villegas, M. A. 1986. Opuntia micropropagation by axillary proliferation. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 7: 269 – 277 pp.
- Esparza F.G., R. D. Valdez C., S Mendez G. 2004. El Nopal tópicos de actualidad. UACH.
- Estrada L., A. A. 1988. Producción de brotes e injertación *in vitro* de seis especies de nopal (Opuntia spp) originarias del Altiplano Potosino-Zacatecano. Tesis MC. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México 160 p.
- Ferreira, G. F. L. A.; Fernandes, H. F.; Barbeta, S.P.; Faço, O. and de Paiva, C. F. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in Opuntia ficus-indica (L.) Mill. (Cactaceae). Scientia Horticulturae. 108: 15 – 21.
- Fuldl-Allah, A. E.-S. A., L. G. Weathers, and F. C. Greer, Jr. 1983. Characterization of a potexvirus isolated from nightblooming cactus. Plant Dis. 67: 438-440.
- Garcia, A., C. F. 1990. Prevención y control de las principales enfermedades que atacan el nopal tunero (Opuntia amyclea Tenore) IV Reunión Nacional Sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal . II Congreso Internacional. Zacatecas, México. 98 p.

García S., P. A.; Valdez M., M.; Valverde, M. E.; Cruz H., A. y Paredes L., O. 2005.

Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 80 (3): 215-219.

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. Trillas. México. pp: 11- 19

Hausbeck M. K., and F. E. Gildow, 1991. First report of Tomato spotted wilt virus on

Thanksgiving cactus. *Plant Dis.* 75: 215

Havell, L., Z, Zolar. 1983. Microexplant isolation from Cactaceae. *Plant Cell, Tissue*

and Organ Culture. 31: 155 -159.

Hernández G. L., 1993. Plagas y enfermedades del nopal en México. Reporte de

investigación. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial. UACH. 52 p.

Hughes, K.W. 1981. Ornamental Species. In: Cloning agricultural plants via in vitro

techniques. Conger, B. V. Ed. Press. Boca Raton, Florida, U.S.A.

- Infante, R. 1992. In vitro axillary shoot proliferation and somatic embryogenesis of yellow pitaya *Mediocactus coccineus* (Salm Dyck). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 31: 155 -159.
- Juárez, M. C. and Passera, C. B. 2002. In vitro of *Opuntia ellisiana* Griff. And acclimatization to field conditions. *Biocell*. 26 (3): 319 – 324.
- Kemeny, D. M., and S. J. Challacombe. 1988. ELISA and other Solid Phase Immunoassays. J. Wiley and Sons. New York. 367 p.
- Kurstak, E. 1981. Handbook of Plant Virus Infections. Comparative Diagnosis. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. 935 p.
- Larkin, P., W. R., Scowcroft. 1981. Somaclonal variation a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60:197-204.
- Llamoca- Zarate, R. M.; Aguiar, L.F.; Landsmann, J.; Campos, F. A. P. 1999. Whole plant regeneration from the shoot apical meristem of *Opuntia ficus-indica* Mill. (Cactaceae). *Jorunal of Applied Botany*. 73 (3-4): 83 -85.
- Mauseth, J. D. 1977. Citokinin and gibberellic acid-induced effects on the determination ad morphogenesis of leaf primordial in *Opuntia polycantha* (cactaceae). *American Journal Botanical*. 337 -346.

Mauseth, J., and W. Halperin. 1975. Hormonal control of organogenesis in *Opuntia polycantha* (Cactaceae). *American Journal of Botany*. 62: 869 – 878.

Milbrath, M. G., and M. R. Nelson. 1972. Isolation and characterization of a virus from saguaro cactus. *Phytopathology* 62: 739-742.

Murashige, T. 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiology*. 25: 135 – 166.

Murashige, T. 1977. Clonal crops through tissue culture. In: *Plant Tissue Culture and its Bio-Tecnological Application*. W Bars, E. Reinhard, MH Zenk (Eds.) Springer-Verlag, Berlin, 392- 403.

Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassaya with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473 – 497

NCBI. 2002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>(May 2007).

Osorio A. F. 1989. Estudio sobre el engrosamiento del cladodios en nopal (*Opuntia* spp).

Osorio A., F. y Soto, E. A. 1994. Enfermedades del nopal. Centro regional para estudios de zonas aridas y semiaridas CREZAS-CP. En: *Aportaciones técnicas y*

- experiencias de la producción de tuna en Zacatecas. Memorias CECCAM. Morelos, Zacatecas, México. 46 p.
- Pierik, R. M. 1990. Cultivo in Vitro de plantas superiores. Ed. Mundi-prensa. Madrid, España. 325 p.
- Sommer, H. E. y L. S. Caldas. 1981. In Vitro methods applied to forest trees. In: Plant Tissue Culture Methods and applications in agriculture. Acad. Press. New York. 349-358 pp.
- Téllez, S. M. A. 2007. Regeneración in vitro y aclimatación del cactus de navidad *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran. Tesis de licenciatura. Depto. De Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. 66 p.
- Vargas, T. E. y de García, E. 1999. Propagación clonal de *Opuntia elatior* (Miller) a partir de aureolas. Anales de Botánica Agrícola. 6: 67 – 71 pp.
- Villalobos A., V.M. y T. A. Thorpe, 1985. La micropropagación: Conceptos, Metodología y Resultados. En Fundamentos y aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura . Roca W. Ed. CIAT. Colombia.
- Wetter, C. 1989. *Opuntia* Sammons' Tobamovirus In: Brunt A. A., K. Crabtree, I. 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 (Febrero 2008)

Yasseen, M. Y.; Barringer, S. A.; Plittstoesser W. E.; Schnell.; 1995. Rapid propagation of tuna (*Opuntia ficus-indica*) and plant establishment in soil. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 42: 117 – 119 pp.

Zhuang, T., Zhang, J.; Yu, J. 2004. Studies on the rapid propagation of *Opuntia ficus-indica* Mill via tissue culture. *Journal of Shanghai Jiaotong University-Agricultural Science* 22 (3): 313-315.

7. ANEXOS

Anexo 1: Técnica de ELISA

1.- Sensibilización de la placa: Adicionar 100 μ l del anticuerpo diluido en buffer de cubrimiento en una placa de microtitulación, e incubar en una cámara húmeda durante toda la noche a 4°C o bien durante 4 hrs a temperatura ambiente.

Lavar la placa con buffer de lavado de 3 a 5 veces.

2.- Adición de la muestra (antígeno): Adicionar 100 μ l de la muestra previamente macerada en buffer de extracción e incubar la placa durante 2 horas a temperatura ambiente dentro de una cámara húmeda.

Lavar la placa con buffer de lavado de 3 a 5 veces.

3.- Adición de la enzima conjugada: Adicionar 100 μ l de la enzima conjugada a cada pozo utilizado de la placa de microtitulación e incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.

Lavar la placa con buffer de lavado de 3 a 5 veces.

4.- Adición del sustrato. Adicionar 100 µl del sustrato de la enzima diluido el para-nitrofenil fosfato en buffer de revelado e incubar la placa en cámara húmeda a temperatura ambiente y obscuridad de 30 a 60 min. para observar la reacción.

Anexo 2. EXTRACCIÓN DE RNA CON TRIAZOL^{MR}

- 1.- Pesar 0.1g de tejido
- 2.- Macerar con 250 µl de Triazol
- 3.- Agregar 750 µl de Triazol
- 4.- Incubar 5 min. A 30°C
- 5.- Agregar 200 µl de cloroformo por cada ml de Triazol
- 6.- Mezclar por agitación e incubar 2 a 3 min. a 30°C
- 7.- Centrifugar 15 min. a 10000 rpm a 2-8°C
- 8.- Pasar el sobrenadante a otro tubo
- 9.- Precipitar con 500 µl de Isopropanol
- 10.- Incubar 10 min a 30°C
- 11.- Centrifugar 10 min a 10000 rpm a 2 – 8 °C
- 12.- Desechar el sobrenadante
- 13.- Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%
- 14.- Centrifugar 5 min. a 8000 rpm a 2 – 8°C
- 15.- Desechar el sobrenadante
- 16.- Secar la pastilla a Temperatura ambiente sobre una servitoalla
- 17.- Resuspender el RNA en 40 – 50 µl de agua libre de nucleadas
- 18.- Almacenar a – 70°C.

Anexo 3. Análisis de varianza realizados para las variables evaluadas en la etapa de multiplicación

Cuadro 1. Análisis de varianza para las variables longitud de brote, Número de raíces y Longitud de raíces.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios de L.B.	Cuadrados medios de N. R	Cuadrados medios de L.R
Tratamientos	1	1.80**	2.31**	4.50**
Error	16	0.16	0.13	0.23
Total	17			

L.B.= Longitud de brote, N.R.= Número de raíces L.R.= Longitud de raíces

** Significativo al 5 %.