



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
DE VIRUS ASOCIADOS A MANCHAS CLORÓTICAS EN
DIFERENTES ESPECIES DE *Opuntia*”**

TESIS

Que para obtener el título de:

BIÓLOGO

Presenta:

RANGEL PRIETO RICARDO DAMIAN

Director de tesis:

DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México (2023)



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis padres, María Concepción Prieto González y Francisco José Rangel Rodríguez, cuya educación, valores y enseñanzas han sido los pilares que me han permitido llegar hasta este punto. Reconozco y valoro profundamente los esfuerzos constantes, tanto físicos como mentales, que han dedicado a lo largo de toda su vida para brindarme una vida de calidad, sin esperar nada a cambio. Por todo esto y mucho más, les agradezco de todo corazón.

A mis hermanos que cada uno de ellos me han dado diferentes enseñanzas:

- Francisco Rangel Prieto por siempre ser un gran hermano mayor y por influir en la elección de mi carrera. Fue gracias a tu apoyo y orientación que decidí convertirme en biólogo. Gracias al nombre que le sugeriste a mis papas te llevo siempre conmigo. El tiempo que compartimos juntos ha sido invaluable, para mi fuiste como un mentor y también un hermano cariñoso y comprensivo. Tu legado perdurará en mi corazón, y te extrañaré profundamente.
- Víctor Manuel Rangel Prieto, durante la secundaria y la preparatoria, fuiste una parte esencial de mi vida y me ayudaste a comprender importantes aspectos de las relaciones personales. Aprecio tus preocupaciones por mi bienestar, incluyendo mi alimentación, vestimenta y salud física. Gracias, Manolo.
- Juan Carlos Rangel Prieto, Tatalos, gracias por formar parte de mi vida. Por darme buenas enseñanzas de vida, por las buenas pláticas que hemos tenido de música, videojuegos y películas, además, de ayudarme económicamente a mantener mis gastos personales y los últimos gastos académicos. Por formar parte de muchos momentos felices y los que faltan.

A mi querida Michelle Carolina Marin Bouchain, gracias por todo el apoyo y amor que me diste durante esta travesía, sobre todo durante los momentos más tensos de mi vida universitaria porque incluso me ayudaste a hacer trabajos que sin tu ayuda no hubiese terminado. Tu paciencia y comprensión han sido fundamentales para mantener mi cordura en los momentos más intensos. Desde el principio hasta el final de mi vida universitaria, has sido una parte esencial de mi vida. Tu amor y apoyo han sido constantes, y por eso quiero agradecerte de corazón. Te amo con todo mi ser, Chinping.

A mi querida familia, incluyendo a mamá Susi, tíos, tías, primos, primas, quiero expresar mi sincero agradecimiento por ser parte integral de mi vida. Estuvieron presentes en mis momentos más felices y tristes, brindándome un apoyo inestimable. Si mencionara a cada uno de ustedes y cada gesto de apoyo que me brindaron, sería una tarea interminable. También quiero agradecer a mi cuñada Eli y, por supuesto, a mis sobrinos Mateo, Gabo y Ángel por ser una parte valiosa de mi vida. Asimismo, deseo recordar a todos aquellos que ya no están con nosotros, quienes también dejaron una huella imborrable en mi camino. Su amor y apoyo han sido fundamentales en mi vida y les agradezco de corazón.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en especial a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por brindarme una educación de calidad que ha sido fundamental para mi formación profesional.

Al CONAHCYT, a través del proyecto A1-S-33379, por la beca otorgada que hizo posible la realización de esta tesis.

Al Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz, por su confianza al permitirme llevar a cabo esta investigación en su laboratorio de fitopatología y por incluirme en su proyecto.

A los miembros del comité evaluador: la Dra. Martha Martínez García, el Dr. Jorge Campos Contreras, el Mtro. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes y el Mtro. David Vargas Peralta. Agradezco su dedicación y tiempo al revisar esta tesis y por sus valiosos comentarios, los cuales han contribuido significativamente al desarrollo de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Al Dr. Rodolfo, quiero expresar mi agradecimiento nuevamente por sus valiosas enseñanzas, el tiempo que dedicó a mi formación, los regaños que me ayudaron a crecer y las enriquecedoras conversaciones que sostuvimos sobre biología y diversos temas. Estoy especialmente agradecido por haberme recibido en su laboratorio, lo cual ha sido una experiencia inestimable en mi desarrollo académico.

A mis amigos del laboratorio: Dave quiero agradecerte por compartir tus conocimientos y por tu gran contribución al desarrollo de esta tesis. También aprecio las conversaciones que teníamos durante la hora de comida y todo lo positivo que experimentamos tanto dentro como fuera del laboratorio. Tu orientación fue de gran ayuda, y te considero un amigo y mentor. A Pepillo, a lo largo de nuestra amistad, has sido un gran amigo ya que contigo he compartido muchas cosas. Agradezco todas las experiencias que compartimos en el laboratorio, tanto las agradables como las desafiantes. Gracias por tu apoyo cuando necesitaba ir a trabajar y por esos deliciosos tacos que me llevabas. A Fanny por formar parte de las buenas vivencias del lab, por las buenas platicas que tuvimos y por la ayuda que me diste. Agradezco mucho tu ayuda en la revisión de esta tesis y tus valiosos comentarios, también por las buenas partidas de billar y de boliche con los demás compas. Los estimo mucho.

A mis amigos biólogos que formaron gran parte de mi vida universitaria: Pedro (mi primer amigo de la uni), Marcos, Charly, Mauricio, Alejandro, Isaac, Michelle, Jean, David, Irving y Carlitos. Les agradezco sinceramente por todos los momentos gratos que compartimos, por el apoyo que me brindaron en cada etapa, y por las reuniones y encuentros en los bares, que dejaron huellas imborrables en mi memoria. Les tengo un gran aprecio y respeto.

INDICE

| | |
|--|----|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| La familia Cactaceae: características, distribución y usos. | 1 |
| Los nopales en México. | 1 |
| Enfermedades en nopal. | 2 |
| Virus reportados en Cactáceas y Nopales. | 2 |
| Técnicas de estudio para el hallazgo de virus. | 3 |
| JUSTIFICACIÓN | 4 |
| OBJETIVOS | 5 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 5 |
| Colecta. | 5 |
| Extracción de ácidos nucleicos totales. | 7 |
| Detección de virus mediante ensayos de Transcriptasa Reversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (rt-PCR) y Secuenciación de productos de RT-PCR. | 7 |
| RESULTADOS | 9 |
| Diagnóstico de virus por ensayos de RT-PCR y Secuenciación Sanger. | 9 |
| Análisis de las secuencias en Blastn. | 15 |
| Dendrogramas de las secuencias Sanger. | 16 |
| DISCUSIÓN | 20 |
| CONCLUSIÓN | 23 |
| REFERENCIAS | 24 |
| ANEXO | 29 |

INTRODUCCIÓN

La familia Cactaceae: características, distribución y usos.

Las plantas de la familia Cactaceae pertenecientes al orden Caryophyllales tienen como características particulares el poseer tallos suculentos, la presencia de espinas, la ausencia de hojas, la presencia de areolas, entre otras. Gracias a las adaptaciones morfológicas, anatómicas, celulares y metabólicas; les ha permitido distribuirse en ambientes áridos debido a la capacidad de almacenar la cantidad necesaria de agua y nutrientes para su sobrevivencia (Terrazas-Salgado y Mauseth, 2002; Guerrero et al. 2019). De esta manera se distribuyen a lo largo del continente americano de donde son nativas, no obstante, la mayor riqueza y endemismo se encuentra en México ya que posee 518 especies endémicas (Guzmán, et al. 2003) de las cuales 104 según Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada (1978), y 93 especies según Guzmán et al. (2003) pertenecen al género *Opuntia*, conocido comúnmente como “Nopal” o “Tuna”.

Desde la antigüedad, las cactáceas han sido utilizadas por culturas antiguas de Mesoamérica y siendo distribuidas a otros continentes por el colonialismo europeo (Casas y Barbera, 2002). Actualmente, continúan siendo parte importante de la cultura, la economía debido a su valor ornamental, alimenticio, y sobre todo ecológico (Nobel, 2002).

Los nopales en México.

En nuestro país, el género *Opuntia* tiene diferentes aprovechamientos, por lo que se divide en tres categorías como: nopal verdura (por sus cladodios), nopal tunero (por su fruto) y nopal forrajero (SAGARPA, 2015); de esta manera, las diferentes especies que son cultivadas para la producción de verdura como *O. ficus-indica*; para la producción de frutos: *O. ficus-indica* y *O. albicarpa*; y para la producción de forraje tenemos a: *O. ficus-indica*, *O. decumbens*, *O. robusta*, *O. stenopétala*, *O. pailana*, entre otras (Flores, 2003; Dubeux Jr., et al. 2018; Jacobo y Gallegos, 2018; Potgieter y D’Aquino, 2018).

Asimismo, en los últimos años el volumen de superficie sembrada, cosechada y de producción ha aumentado tanto para nopal verdura (nopalitos) como para la tuna. En el año 1999 los nopalitos abarcaron una superficie sembrada de 7,326 hectáreas (ha) de la cual se cosechó 39,775 ha y la producción fue de 315,769.35 toneladas (ton), mientras que para la tuna se sembraron 47,854 ha, se cosecharon 39,775 ha y se

produjo 262,620.42 ton. Ahora bien, en el año 2021 para los nopalitos se sembraron 12,596.70 ha, se cosecharon 12,449.65 ha y se produjeron 868,956.28 ton, al mismo tiempo, para tuna se sembraron 45,320.34 ha, se cosecharon 43,416.43 ha y se produjeron 462,209.02 ton (SIAP, 2022). Debido a la importancia económica que representa el nopal en el país, se han investigado las diferentes enfermedades y sus síntomas causadas por diferentes patógenos, los cuales se describen a continuación.

Enfermedades en nopal.

La mayoría de las enfermedades en *Opuntia* son causadas por microorganismos que afectan tanto al cladodio como al fruto; pueden ser causadas principalmente por hongos como la mancha negra (*Pseudocercospora opuntiae*), cáncer gomoso (*Lasiodiplodia theobromae*), mancha del oro (*Alternaria spp.*), entre otras. Las infecciones por bacterias generalmente causan pudrición y formación de agallas en los frutos y cladodios; pudrición blanda (*Pectobacterium carotovorum* antes *Erwinia carotovora*), agalla de la corona (*Rhizobium radiobacter*), etc. (Granata, et. al. 2018).

Otros agentes patógenos que también se han reportado que presentan una sintomatología similar en Opuntias son los fitoplasmas y los virus (parásitos intracelulares obligados de DNA o RNA, envueltos en una cápside proteica (Modrow, et al. 2013), los cuales se han reportado que provocan la aparición de anillos cloróticos, mosaicos, amarillamiento generalizado, adelgazamiento del cladodio y una eventual marchitez, los frutos reducen su tamaño e incluso se han encontrado en muestras asintomáticas (De La Torre, et al. 2007; Hernández-Pérez, et al. 2009; Suaste, et al. 2012; Alonso, et al. 2015; Salgado-Ortíz, et al. 2020).

Virus reportados en Cactáceas y Nopales.

Sumado a lo anterior, algunos virus de RNA se han reportado, tanto en otras especies de cactáceas como en Opuntias cultivadas o silvestres, como causantes de diferentes síntomas en las plantas como la presencia de un moteado amarillento provocado por *Cactus virus X* (CVX) en *Hylocereus undatus* (Liou, et al. 2004) y en *Echinopsis macrogona* (Maliarenko y Mudrak, 2013), *Opuntia virus X* (OpVX), *Schlumbergera virus X* (SchVX) y *Zygocactus virus X* (ZyVX) en *Opuntia albicarpa*, *Schlumbergera truncata* y *Hylocereus undatus* (Duarte, et al., 2008), pertenecientes al género Potexvirus;

Cactus mild mottle virus (CMMoV) en *O. amyclae* (De la Torre, et al. 2007), *Chamaereus silvestrii f. cristata*, *Echinopsis sp. f. cristata* y *Mammillaria elongata f. cristata* (Maliarenko y Mudrak, 2013), *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) en *Aporcactus flagelliformis* (Kim et al. 2012), *O. albicarpa* (De La Torre et al. 2016a) y *Notocactus leninghausii f. cristatus* (Park et al. 2018), *Opuntia virus 2* (OV2) en *O. streptacantha*, *O. pilifera*, *O. depressa*, *O. robusta* y *O. ficus-indica* (Salgado-Ortíz, et al. 2020), pertenecientes al género *Tobamovirus*; *Cactus virus 2* (CV2) en *Echinopsis chamaecereus f. cristata*, *Echinocereus pectinatus f. cristata*, *Mammillaria elongata f. cristata* y *Eriocereus jusbertii* (Maliarenko y Mudrak, 2013), perteneciente al género *Carlavirus*.

Por otro lado, también se han reportado virus de DNA detectados en diferentes especies de la familia Cactaceae, además de ser causantes de diferentes síntomas, como *Epiphyllum mottle-associated virus* (EpMoaV) en *Epiphyllum spp.*, *Discocactus spp.*, *Schlumbergera spp.* y *Opuntia spp.*, perteneciente al género *Badnavirus* (Lan, et al. 2019); *Epiphyllum virus 4* (EpV-4) en *Epiphyllum spp.*, perteneciente al género *Cavemovirus* (Zheng, et al. 2020); *Opuntia virus 1* (OpV1) en diferentes especies de *Opuntia spp.*, perteneciente al género *Opunvirus*; *Opuntia Virus 2* (OpV2) en diferentes especies de *Opuntia spp.*, sin género definido; y *Opuntia becurtovirus* en *Opuntia spp.*, perteneciente al género *Becurtovirus* (Fontenele, et al. 2020 y 2021).

Técnicas de estudio para el hallazgo de virus.

En fitopatología y en el diagnóstico de virus, se emplean múltiples técnicas que requieren una excelente precisión. Generalmente, se emplean pruebas serológicas, las cuales se basan en la detección de anticuerpos específicos contra el virus en cuestión. Estas pruebas utilizan antisueros que se unen a los antígenos virales, permitiendo así su detección, como el caso de los ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA). También se emplean pruebas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que permite amplificar y detectar secuencias específicas del genoma viral, y la retrotranscriptasa reversa ligada a la PCR (rt-PCR), que permite la detección de virus de ARN mediante la transcripción reversa a ADN complementario (cDNA) y la amplificación mediante PCR. Estas técnicas utilizan el uso de *primers* específicos que amplifican regiones del genoma viral (también conocido como *viroma*) (Mumford, et al. 2006; Jeong, et al. 2014). Aunque las pruebas serológicas son ampliamente utilizadas en el diagnóstico de virus, tienen una menor sensibilidad en la

detección de virus en comparación con las pruebas moleculares, como la PCR y la rt-PCR (Lacroix, et al. 2016).

A pesar de que las técnicas moleculares como la PCR y la rt-PCR son muy efectivas en la detección de virus, tienen limitaciones en cuanto a la cantidad de información que pueden obtener. Debido a que solo amplifican una porción del genoma viral, generalmente las regiones conservadas, y no el genoma completo. Además, solo son aplicables a virus previamente conocidos, lo que implica una limitación en la detección de nuevos virus (Jones, et al. 2017). Por lo tanto, diferentes estudios recientes utilizan la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) como la (RNA-Seq) la cual permite tener una amplia perspectiva en cuanto al genoma viral y el descubrimiento de nuevos virus (Pecman, et al. 2017), donde también el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) destaca el uso de esta tecnología en el diagnóstico y caracterización de virus (Simmonds, et al. 2017)

En resumen, las técnicas moleculares y serológicas son herramientas importantes en el diagnóstico y caracterización de virus en plantas. A pesar de las limitantes que cuentan las técnicas moleculares (PCR y rt-PCR) continúan siendo usadas para detectar de manera rápida y eficaz los virus presentes en las diferentes especies de plantas, además de representar un bajo costo a comparación del costo que tiene la RNA-Seq.

JUSTIFICACIÓN

Dada la importancia económica, sociocultural y ecológica que representa el género *Opuntia* en el país, es importante conocer la etiología de síntomas de moteado amarillento (Figura 1), haciendo uso de las tecnologías de detección de virus anteriormente descritas como los análisis de rt-PCR y la secuenciación Sanger para la detección de virus en especies silvestres y cultivadas.

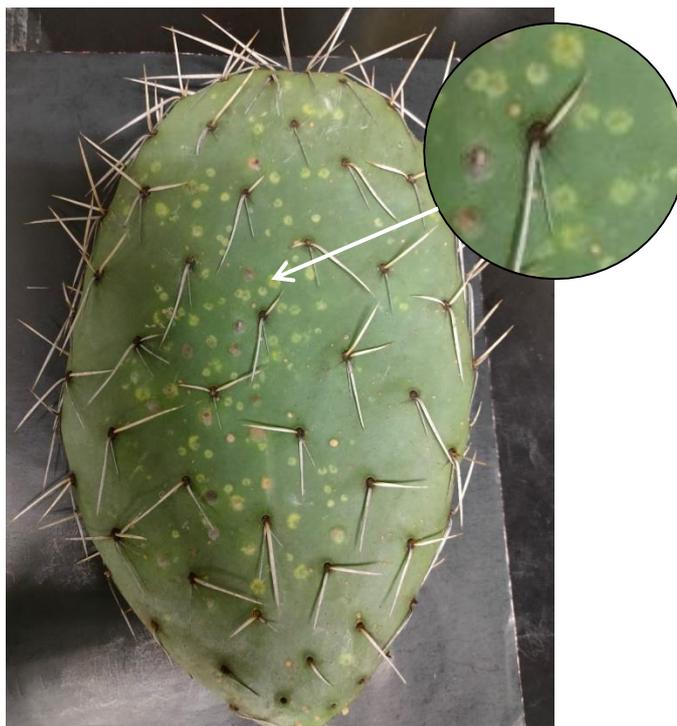


Figura 1. Síntomas de manchas circulares cloróticas (indicadas por la flecha blanca) presentes en el cladodio de nopal.

OBJETIVOS

Identificar y caracterizar molecularmente a los posibles virus asociados a daños ya descritos en diferentes especies del género *Opuntia*: *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. tehuapanensis*, *O. robusta*, *O. lasiacantha*, *O. engelmannii*, *O. tomentosa*, *Nopal bavito*, *O. streptacantha* y *Opuntia sp.* del jardín botánico de C.U.

MATERIALES Y MÉTODOS

Colecta.

Se colectaron los cladodios de diferentes especies del género *Opuntia* con presencia de anillos cloróticos irregulares, provenientes del jardín botánico de Ciudad Universitaria las cuales son procedentes de los diferentes Estados de la República Mexicana (Tabla 1). Las muestras se llevaron al Laboratorio de Fitopatología de la UBIPRO de la FES Iztacala, las cuales se almacenaron a -10°C para su posterior procesamiento.

Tabla 1. Distribución de las especies silvestres recolectadas de *Opuntia* en los diferentes estados de la República Mexicana según Guzmán, et al. 2003.*

| Estado | Especie |
|------------------|---|
| Aguascalientes | <i>O. megacantha</i> , <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. engelmannii</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| Guanajuato | <i>O. megacantha</i> , <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| Jalisco | <i>O. megacantha</i> , <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| San Luis Potosí | <i>O. megacantha</i> , <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> , <i>O. engelmannii</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| Zacatecas | <i>O. megacantha</i> , <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> , <i>O. engelmannii</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| Hidalgo | <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> |
| México | <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> |
| Oaxaca | <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. lasiacantha</i> |
| Puebla | <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. tehuapanensis</i> , <i>O. lasiacantha</i> |
| Querétaro | <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| Tlaxcala | <i>O. hyptiacantha</i> , <i>O. lasiacantha</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| Chihuahua | <i>O. robusta</i> , <i>O. engelmannii</i> |
| Ciudad de México | <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> , <i>O. tomentosa</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| Durango | <i>O. robusta</i> , <i>O. engelmannii</i> , <i>O. streptacantha</i> |
| Michoacán | <i>O. robusta</i> , <i>O. lasiacantha</i> , <i>O. tomentosa</i> |
| Sonora | <i>O. robusta</i> |
| Coahuila | <i>O. engelmannii</i> |
| Nuevo León | <i>O. engelmannii</i> |
| Tamaulipas | <i>O. engelmannii</i> |
| Guerrero | <i>O. tomentosa</i> |
| Morelos | <i>O. tomentosa</i> |
| Gudalajara | <i>O. tomentosa</i> |

* La especie *O. ficus-indica* no se incluyó en la tabla debido a que es una especie cultivada.

Extracción de ácidos nucleicos totales.

Se extrajo una porción de 1 cm² de epidermis en las regiones con presencia de anillos cloróticos de cada una de las muestras colectadas, con el fin de disminuir la presencia de polisacáridos. Algunas muestras de la misma especie se mezclaron para realizar la extracción en mix. La extracción se realizó mediante el método modificado de Dellaporta y colaboradores (1983), que consiste en el macerado de la epidermis con buffer de extracción (Urea 7M, NaCl 0.35M, Tris-base 0.05M, EDTA 0.02M y Lauryl-sarcosina 1%) para la lisis celular. Posteriormente, se separó la fase orgánica mediante la adición de fenol-cloroformo (v/v), agitando la solución para después centrifugar a 12,000 rpm por 3min. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con acetato de amonio 10M e isopropanol y se centrifugó a 12,000 rpm por 10min. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%, y se resuspendió en 30µL de agua Milli-Q.

Detección de virus mediante ensayos de Transcriptasa Reversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (rt-PCR) y Secuenciación de productos de RT-PCR.

Para determinar la presencia de diferentes virus reportados en cactáceas se realizaron ensayos de rt-PCR con el kit SuperScript™ III One-Step rt-PCR System with Platinum™ Taq DNA (ThermoFisher Scientific), utilizando como templado las extracciones de las diez especies de *Opuntia* obtenidas por el método modificado de Dellaporta y colaboradores (1983), además, el uso de ocho juegos de oligonucleótidos específicos para los virus: *Opuntia virus 2* (OV2) (Salgado-Ortiz, et al. 2020; Salgado-Ortiz, 2020), *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) (De La Torre, et al. 2016a), *Schlumbergera virus X* (SchVX) (De La Torre, et al. 2016b) y *Opuntia virus H* (OpVH) (Salgado-Ortiz, 2020). Posteriormente, las mezclas se colocaron en un termociclador (BIORAD T100 Thermal Cycler) con las condiciones térmicas específicas para cada reacción (Tabla 1). Los productos obtenidos se corrieron en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) durante 30 min a 100V. El tamaño de los productos se calculó comparando las bandas obtenidas por el marcador de peso molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

Tabla 2. Oligos usados en los análisis de RT-PC para la detección de virus.

| Virus | Género | Amplicón (pb) | Gen Objetivo | Tm (°C) | Ref. |
|---|--------------------|---------------|--------------|---------|---------------------------|
| <i>Opuntia virus 2</i> (OV2) | <i>Tobamovirus</i> | 1,000 | CP | 55 | Salgado-Ortíz, 2020 |
| <i>Rattail cactus necrosis-associated virus</i> (RCNaV) | <i>Tobamovirus</i> | 850 | CP | 55 | De La Torre, et al. 2016a |
| <i>Schlumbergera virus X</i> (SchVX) | <i>Potexvirus</i> | 850 | CP | 55 | De La Torre, et al. 2016b |
| <i>Opuntia virus H</i> (OpVH) | <i>Carlavirus</i> | 2,000 | CP | 52 | Salgado-Ortíz, 2020 |

- **Tm:** Temperatura de *melting* o Temperatura de fusión.
- **CP:** *Capsid Protein* o proteína de la cápside.

Los productos de la rt-PCR del tamaño esperado, se cortaron de los geles de agarosa y se purificaron utilizando el GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher Scientific). Las secuencias de los amplicones esperados se obtuvieron utilizando secuenciación Sanger (Sanger, et al. 1977), para confirmar la identidad de los supuestos virus en las muestras de *Opuntia*.

Análisis y comparación de secuencias nucleotídicas obtenidas por secuenciación Sanger.

Se obtuvieron 26 secuencias Sanger en total de las especies de *Opuntia* que habrían correspondido con un resultado positivo para cada uno de los virus identificados en los ensayos de rt-PCR. Después, se compararon contra la base de datos del NCBI por medio de la herramienta en línea BLASTn donde se usó Megablast (secuencias de alta similitud) para la obtención de valores certeros (Altschul et al., 1997). De esta manera, se buscó el marco abierto de lectura (ORF) de la proteína de la Capside (*capsid protein*, CP) para cada secuencia obtenida para los virus OV2, RCNaV, SchVX y *Carlavirus*; sin embargo, las secuencias obtenidas de *Carlavirus* solamente tenían completo el ORF del *Triple Gene Block 3* (TGB-3) y el ORF de la CP estaba incompleto. Una vez delimitado el ORF de la CP, las secuencias repetidas de un virus que pertenecían a la misma especie se alinearon con el programa Geneious versión 11.0.2 (Biomatters Ltd) para obtener la secuencia

consenso; no obstante, no se realizó ninguna secuencia consenso para aquellas especies donde solo se tenía para una sola secuencia.

Así mismo, para corroborar la especie y determinar las relaciones que existen entre nuestras secuencias obtenidas se construyeron dendrogramas con secuencias de la CP para *Tobamovirus* y *Potexvirus*. Se hizo uso del programa Mafft v 7.407 para construir el alineamiento con la estrategia L-INS-i (Kato, 2019). Una vez obtenido el alineamiento se utilizó el programa MEGA 11 (Tamura, et al., 2021) donde construyó el dendrograma con “Neighbor-Joining” usando el modelo “Kimura 2-parameter” con 1,000 repeticiones.

RESULTADOS

Diagnóstico de virus por ensayos de RT-PCR y Secuenciación Sanger.

Tabla 3. Especies positivas para los diferentes virus en ensayos de RT-PCR.

| Muestra | Virus | | | |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|
| | OV2 | RCNaV | SchVX | OpVH |
| <i>O. ficus-indica</i> | POSITIVO | POSITIVO | POSITIVO | POSITIVO |
| <i>O. megacantha</i> | POSITIVO | POSITIVO | POSITIVO | POSITIVO |
| <i>O. hyptiacantha</i> | POSITIVO | POSITIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| <i>O. tehuapanensis</i> | POSITIVO | POSITIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| <i>O. robusta</i> | NEGATIVO | POSITIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| <i>O. lasiacantha</i> | POSITIVO | POSITIVO | POSITIVO | NEGATIVO |
| <i>O. engelmannii</i> | POSITIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| <i>O. tomentosa</i> | POSITIVO | POSITIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| <i>O. streptacantha</i> | POSITIVO | POSITIVO | POSITIVO | POSITIVO |
| <i>Opuntia sp.</i> | POSITIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |
| Nopal bavito | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO | NEGATIVO |

A partir de los ensayos de rt-PCR, se obtuvieron productos acordes al tamaño esperado (1,000 pb) para *Opuntia virus 2* en las muestras de *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. tehuapanensis*, *O. lasiacantha*, *O. engelmannii*, *O. tomentosa*, *Opuntia sp.* y *O. streptacantha* (Figuras 1, 2, 3; Tabla 3; ANEXO: Figura suplementaria 1 y 2) y las secuencias mostraron porcentajes de identidad de nucleótidos mayores al 95% con la CP del virus OV2 (No. de acceso GenBank: NC_040685.2 y OQ240440.1; Tabla 4).

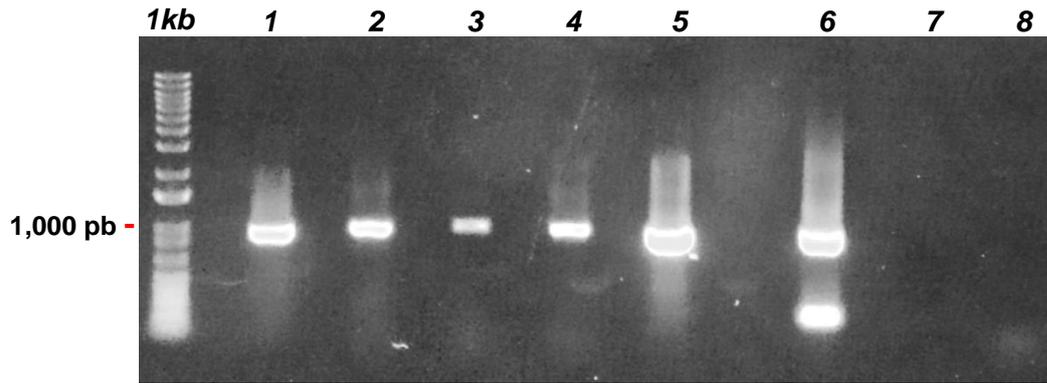


Figura 1. Ensayos de rt-PCR para *Opuntia virus 2*: Carril 1. *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. hyptiacantha*; Carril 3. *O. tehuapanensis*; Carril 4. *O. lasiacantha*; Carril 5. *O. megacantha*; Carril 6: *O. megacantha* (+); Carril 7: *Datura sp.* (-); Carril 8: Agua destilada (-). Se observan productos de tamaño esperado de 1,000 pb.

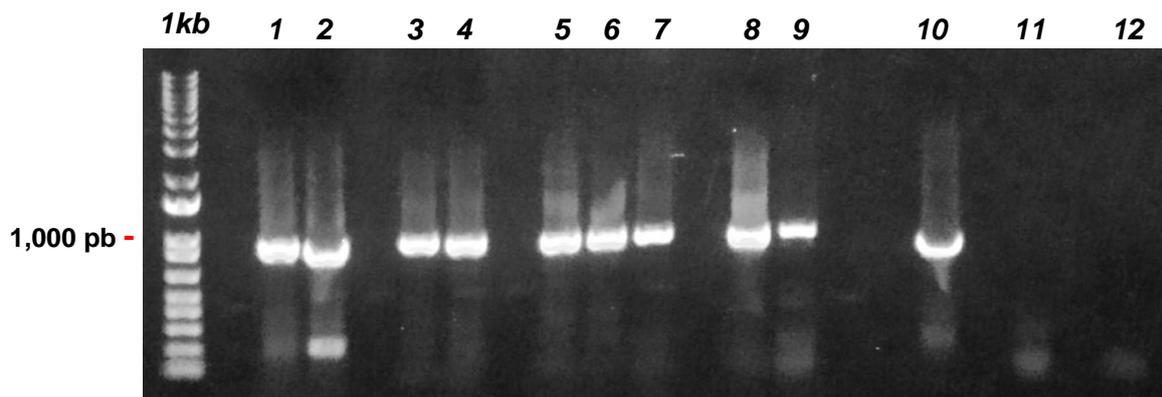


Figura 2. Ensayos de rt-PCR para *Opuntia virus 2*: Carril 1. *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. ficus-indica*; Carril 3. *O. engelmannii*; Carril 4. *O. engelmannii*; Carril 5. *O. streptacantha*; Carril 6. *O. streptacantha*; Carril 7. *O. streptacantha*; Carril 8. *O. tormentosa*; Carril 9. *O. tormentosa*; Carril 10. *O. megacantha* (+); Carril 11: *Datura sp.* (-); Carril 12: Agua destilada (-). Se observan productos de tamaño esperado de 1,000 pb.

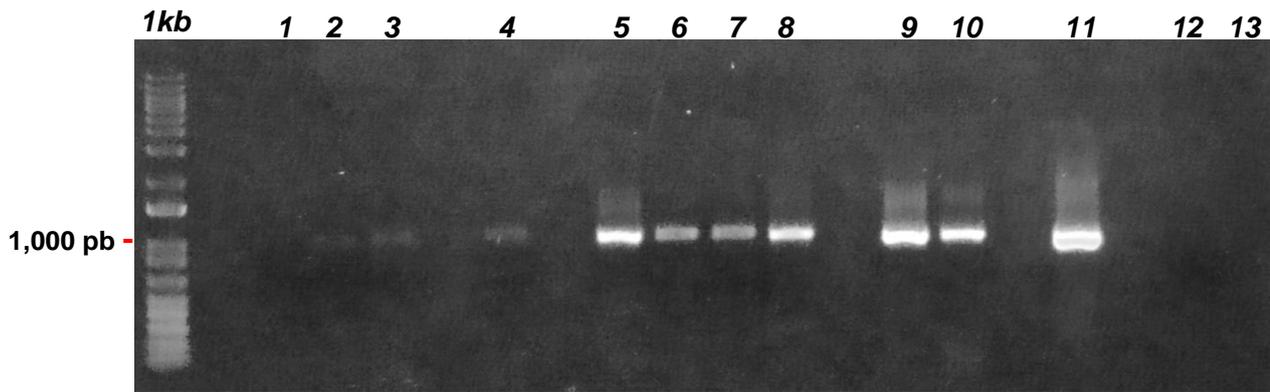


Figura 3. Ensayos de rt-PCR para *Opuntia virus 2*: Carril 1. *Nopal Bavito*; Carril 2. *Nopal Bavito*; Carril 3. *Nopal Bavito*; Carril 4. *Opuntia sp.*; Carril 5. *Opuntia sp.*; Carril 6. *Opuntia sp.*; Carril 7. *Opuntia sp.*; Carril 8. *Opuntia sp.*; Carril 9. *O. megacantha*; Carril 10. *O. megacantha*; Carril 11. *O. megacantha (+)*; Carril 12: *Datura sp.* (-); Carril 13: Agua destilada (-). Se observan productos de tamaño esperado de 1,000 pb, los carriles 2 al 4 se observan productos de baja calidad mientras que los carriles 5 al 10 se observan productos de buena calidad.

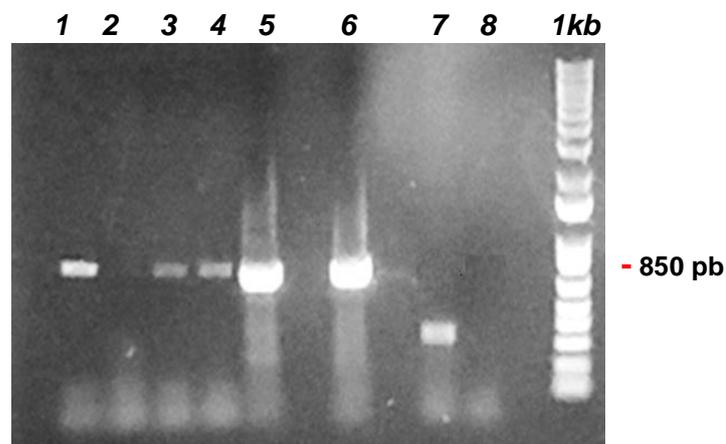


Figura 4. Ensayos de rt-PCR para *Rattail cactus necrosis-associated virus*: Carril 1 *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. engelmannii*; Carril 3. *O. streptacantha*; Carril 4. *O. tomentosa*; Carril 5. *O. robusta*.; Carril 6. *O. parvyclada (+)*; Carril 7: *Irisine sp.* (-); Carril 8: Agua destilada (-). Se observan productos de buena calidad del tamaño esperado para los carriles 1 y 5.

Para el *Rattail cactus necrosis-associated virus* se obtuvieron productos esperados (850 pb) solamente en las *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. tehuapanensis*, *O. lasiacantha*, *O. tomentosa*, *O. robusta* y *O. streptacantha* (Figuras 4 y 5; Tabla 3;

ANEXO: Figura suplementaria 3, 4, 5 y 6); sin embargo, solamente los productos de las muestras *O. hyptiakantha*, *O. robusta*, *O. lasiakantha* y *O. tomentosa* fueron secuenciadas debido a que se obtuvieron limpiezas de mejor calidad. De esta manera, las secuencias obtenidas mostraron porcentajes de identidad de nucleótidos mayores al 90% con la CP del virus RCNaV (No. de acceso GenBank: KY348773.1 y NC_016442.1; Tabla 5).

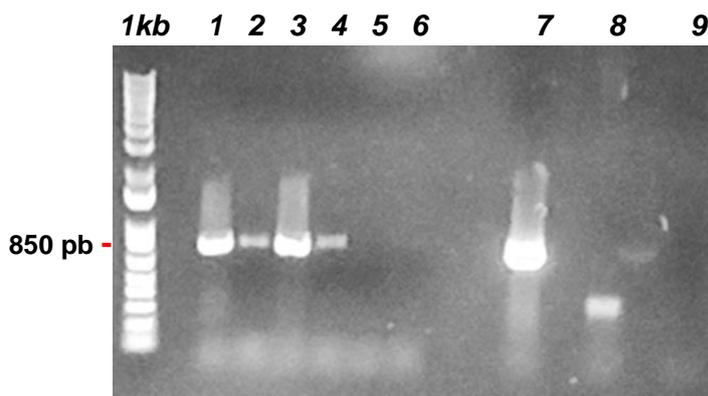


Figura 5. Ensayos de rt-PCR para *Rattail cactus necrosis-associated virus*: Carril 1 *O. hyptiakantha*; Carril 2. *O. tehuapanensis*; Carril 3. *O. lasiakantha*; Carril 4. *O. megakantha*; Carril 5. *Opuntia sp.*; Carril 6. *Nopal bavito*; Carril 7. *O. parviclada* (+); Carril 8: *Irisine sp.* (-); Carril 9: Agua destilada (-). Se observan productos de buena calidad en los carriles 1 y 3.

Para *Schlumbergera virus X* se obtuvieron productos esperados (850 pb) para las muestras *O. ficus-indica*, *O. streptakantha*, *O. lasiakantha* y *O. megakantha* (Figuras 6 y 7; Tabla 3; ANEXO: Figura suplementaria 3 y 4); no obstante, la muestra *O. lasiakantha* fue la única que no cumplió con los productos de la calidad esperada. Por lo tanto, las secuencias obtenidas tuvieron porcentajes de identidad de nucleótidos mayores al 95% con la CP del virus SchVX (No. de acceso GenBank: MH532288.1; Tabla 6).

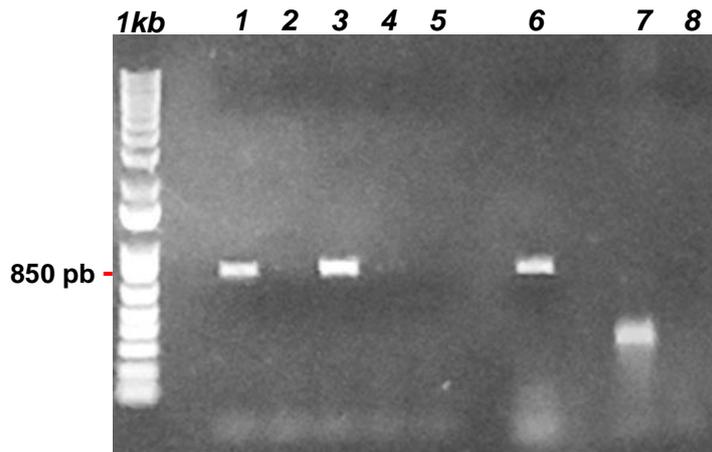


Figura 6. Ensayos de rt-PCR para *Schlumbergera virus X*: Carril 1 *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. engelmannii*; Carril 3. *O. streptacantha*; Carril 4. *O. tomentosa*; Carril 5. *O. robusta*.; Carril 6. *O. megacantha* (+); Carril 7: *Irisine sp.* (-); Carril 8: Agua destilada (-). Se observan tamaños del producto esperado para los carriles 1 y 3.

Por último, los ensayos para *Opuntia virus H* se obtuvieron productos esperados (2,000 pb) para las muestras *O. ficus-indica*, *O. streptacantha* y *O. megacantha* (Figuras 8 y 9; Tabla 3; ANEXO: Figura suplementaria 3, 4 y 6) y las secuencias obtenidas obtuvieron porcentajes de identidad de nucleótidos mayores al 80% con el Triple Gene Block 3 (TGB-3) y la CP del virus OpVH (No. de acceso GenBank: KU854930.4; Tabla 7).

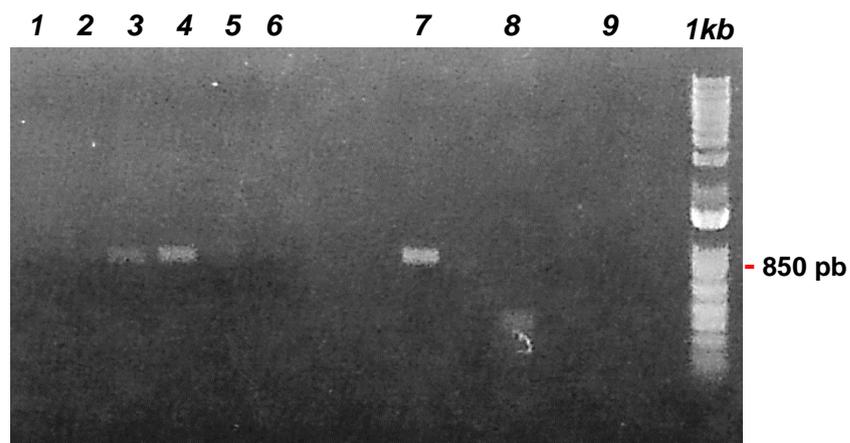


Figura 7. Ensayos de rt-PCR para *Schlumbergera virus X*: Carril 1 *O. hyptiacantha*; Carril 2. *O. tehuapanensis*; Carril 3. *O. lasiacantha*; Carril 4. *O. megacantha*; Carril 5. *Opuntia sp.*; Carril 6. *Nopal bavito*; Carril 7. *O. megacantha* (+); Carril 8: *Irisine sp.* (-); Carril 9: Agua destilada (-).

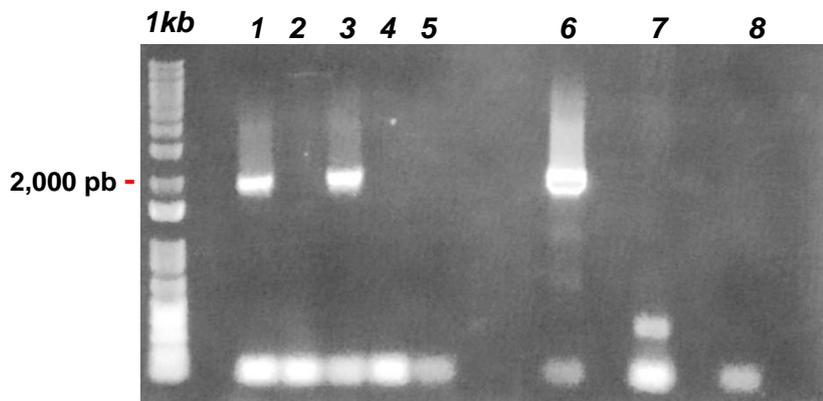


Figura 8. Ensayos de rt-PCR para *Opuntia virus H*: Carril 1 *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. engelmannii*; Carril 3. *O. streptacantha*; Carril 4. *O. tomentosa*; Carril 5. *O. robusta*; Carril 6. *O. parviclada* (+); Carril 7: *Irisine sp.* (-); Carril 8: Agua destilada (-).

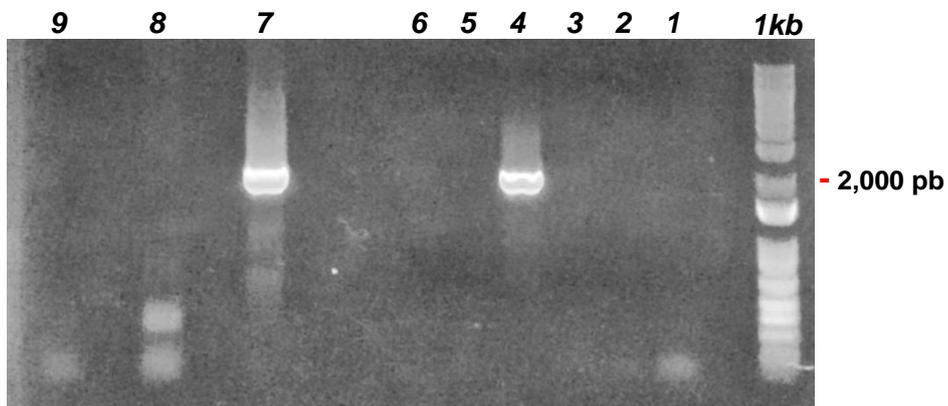


Figura 9. Ensayos de rt-PCR para *Opuntia virus H*: Carril 1 *O. hyptiacantha*; Carril 2. *O. tehuapanensis*; Carril 3. *O. lasiacantha*; Carril 4. *O. megacantha*; Carril 5. *Opuntia sp.*; Carril 6. *Nopal bavito*; Carril 7. *O. parviclada* (+); Carril 8: *Irisine sp.* (-); Carril 9: Agua destilada (-).

Análisis de las secuencias en Blastn.

Tabla 4. Análisis en Blastn de las secuencias obtenidas para OV2.

| Muestras | Cobertura (%) | Identidad nucleótidos (nt) (%) | Total score | Valor del error | No. de acceso |
|-------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|-----------------|---------------|
| <i>O. hyptiakantha</i> | 100 | 98.88 | 1443 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>O. streptakantha</i> | 100 | 99.88 | 1493 | 0 | OQ240440.1 |
| <i>O. engelmannii</i> | 100 | 99.75 | 1482 | 0 | OQ240440.1 |
| <i>O. tehuapanensis</i> | 100 | 99.01 | 1448 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>O. lasiakantha</i> | 100 | 98.76 | 1443 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>O. ficus-indica</i> | 100 | 99.14 | 1467 | 0 | OK428619.1 |
| <i>O. ficus-indica</i> | 100 | 99.88 | 1504 | 0 | OQ240440.1 |
| <i>O. megakantha</i> | 100 | 98.76 | 1439 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>O. engelmannii</i> | 100 | 99.88 | 1483 | 0 | OQ240440.1 |
| <i>O. tomentosa</i> | 100 | 98.04 | 1448 | 0 | OQ240440.1 |
| <i>O. hyptiakantha</i> | 100 | 98.76 | 1441 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>Opuntia sp.</i> | 100 | 98.53 | 1456 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>O. megakantha</i> | 100 | 98.88 | 1430 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>Opuntia sp.</i> | 100 | 99.51 | 1483 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>O. lasiakantha</i> | 100 | 98.88 | 1443 | 0 | NC_040685.2 |
| <i>O. streptakantha</i> | 100 | 99.26 | 1465 | 0 | OQ240440.1 |
| <i>O. ficus-indica</i> | 100 | 97.75 | 1367 | 0 | NC_040685.2 |

Tabla 5. Análisis en Blastn de las secuencias obtenidas para RCNaV.

| Muestras | Cobertura (%) | Identidad nucleótidos (nt) (%) | Total score | Valor del error | No. de acceso |
|------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|-----------------|---------------|
| <i>O. hyptiakantha</i> | 100 | 95.73 | 1131 | 0 | KY348773.1 |
| <i>O. robusta</i> | 100 | 94.06 | 1074 | 0 | NC_016442.1 |
| <i>O. hyptiakantha</i> | 100 | 94.03 | 1068 | 0 | NC_016442.1 |
| <i>O. lasiakantha</i> | 100 | 95.45 | 1125 | 0 | KY348773.1 |
| <i>O. tomentosa</i> | 89 | 93.29 | 673 | 0 | NC_016442.1 |

Tabla 6. Análisis en Blastn de las secuencias obtenidas para SchVX.

| Muestras | Cobertura (%) | Identidad nucleótidos (nt) (%) | Total score | Valor del error | No. de acceso |
|-------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|-----------------|---------------|
| <i>O. ficus-indica</i> | 100 | 99.86 | 1271 | 0 | MH532288.1 |
| <i>O. streptakantha</i> | 100 | 99.85 | 1266 | 0 | MH532288.1 |
| <i>O. megakantha</i> | 100 | 98.71 | 1245 | 0 | MH532287.1 |

Tabla 7. Análisis en Blastn de las secuencias obtenidas para *Carlavirus*.

| Muestras | Cobertura (%) | Identidad nucleótidos (nt) (%) | Total score | Valor del error | No. de acceso |
|------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|-----------------|---------------|
| <i>O. megacantha</i> | 99 | 86.03 | 832 | 0 | KU854930.4 |
| <i>O. ficus-indica</i> | 99 | 93.85 | 852 | 0 | OQ240442.1 |

Dendrogramas de las secuencias Sanger.

Los dendrogramas formados a partir de las secuencias Sanger de la CP para OV2 y RCNaV formaron dos subgrupos de cactáceas, en donde las secuencias de opuntia para OV2 se agruparon correctamente con *Opuntia virus 2* (NC_040685.2) con un valor de soporte (Bootstrap) de 100, sin embargo, el grupo formado por OV2 no se agrupa con el otro subgrupo de RCNaV y CMMoV, donde las secuencias Sanger para RCNaV se agruparon correctamente con *Rattail cactus necrosis-associated virus* (KU854932.1 y NC_016442.1) con un valor de soporte de 100, los cuales también se agrupan con las secuencias de *Cactus mild mottle virus* (EU043335.1 y NC_011803.1), el grupo tuvo un valor del soporte de 99 (Figura 10). A manera de acercamiento, se realizó un dendrograma únicamente para los *tobamovirus* de cactáceas donde se observa a detalle el agrupamiento de las secuencias (Figura 11).

Por otro lado, el dendrograma de las secuencias de la CP para SchVX forman un subgrupo de cactáceas con un valor de soporte de 100, las cuales tuvieron una mayor homología con la secuencia del Pitay virus X (NC_024458.1) (Figura 12). Sin embargo, para las secuencias de *Carlavirus* donde se habían obtenido la secuencia del TGB-3 y la secuencia parcial de la CP no se realizaron dendrogramas debido a que no se obtuvo la secuencia de la CP completa.

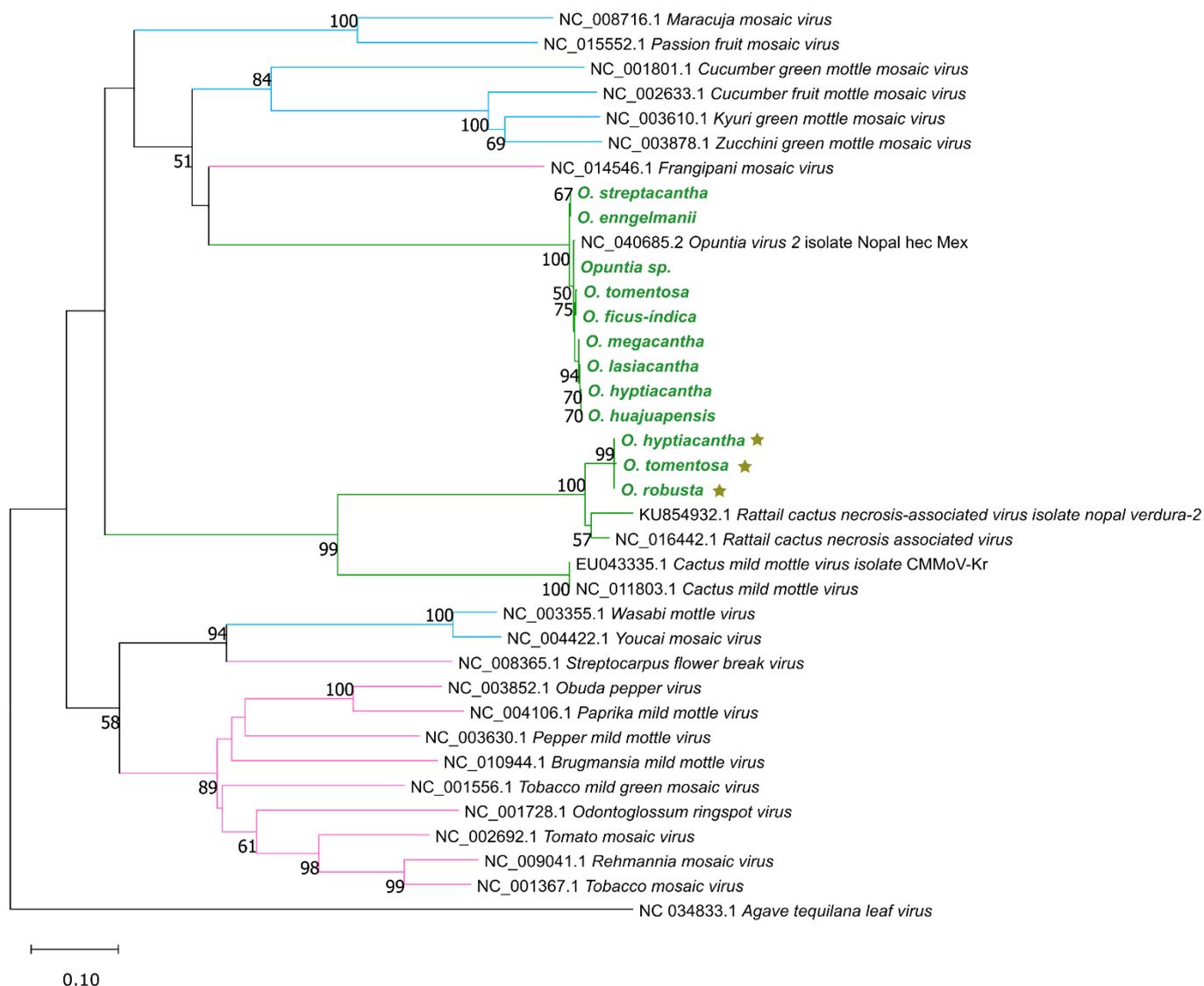


Figura 10. Dendrograma de miembros del género *Tobamovirus*. Usando la secuencia de la cápside de 24 especies disponibles en la base de datos del GenBank más las secuencias Sanger de las muestras de *Opuntia* que se encuentran marcadas de color verde y en cursivas; las secuencias para RCNaV se señalan con una estrella. Los agrupamientos de los *tobamovirus* se corresponden de acuerdo la división en tres principales grupos de eudicotiledoneas: Asteridae (Astéridas) ramas de color rosa, Rosidae (Rósidas) de color azul y Caryophyllidae (Cactaceas) de color verde de acuerdo con Gibbs et al. 2015. Los números indican el valor de Bootstrap de 1,000 repeticiones. Se usó como grupo externo a la secuencia NC 034833.1 *Agave tequilana leaf virus* que pertenece al género *Vitivirus*.

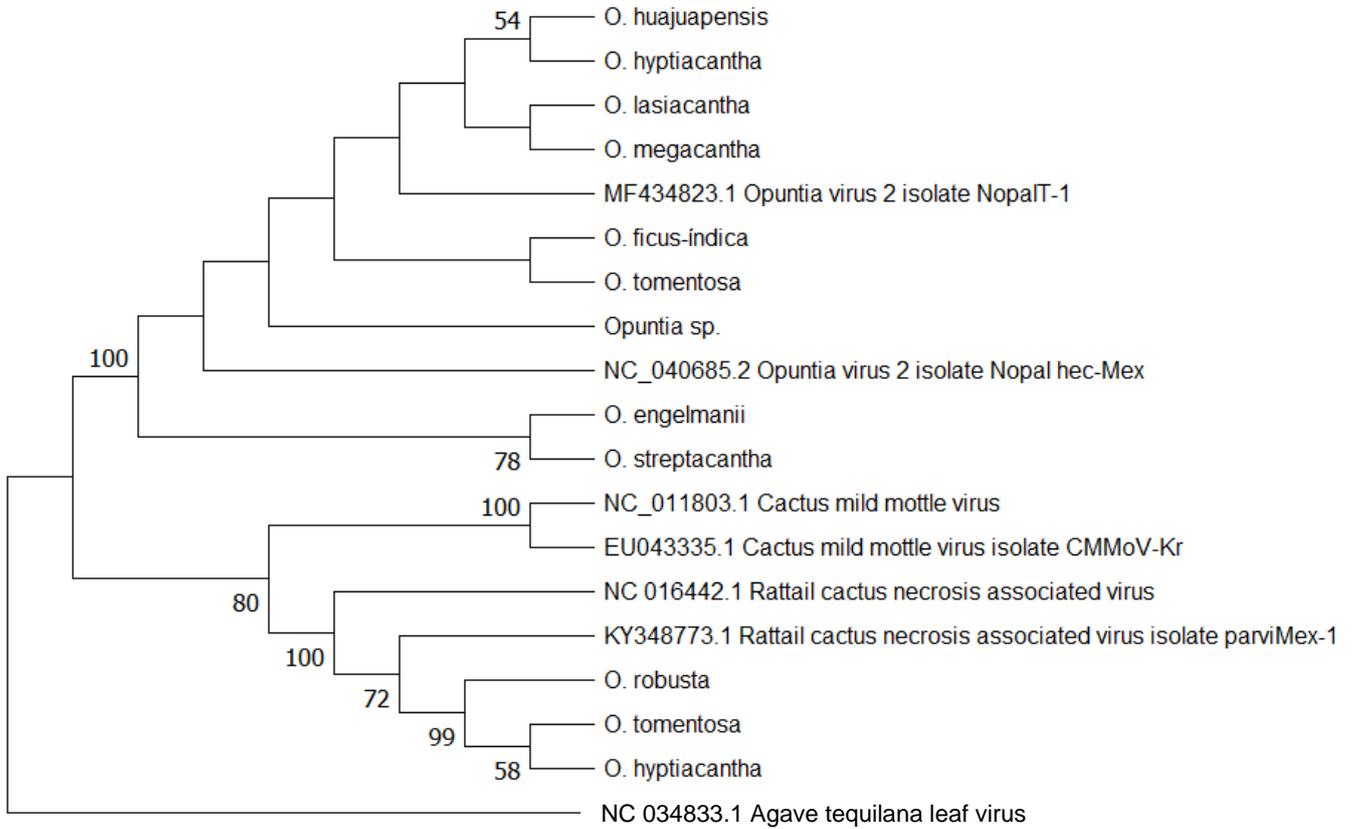


Figura 11. Dendrograma de miembros de *Tobamovirus* de Cactaceas. Usando la secuencia de la cápside de 6 especies disponibles en la base de datos del GenBank más las secuencias Sanger de las muestras de *Opuntia*. Los números indican el valor de Bootstrap de 1,000 iteraciones. Grupo externo se refiere a miembros del género *Vitivirus*.

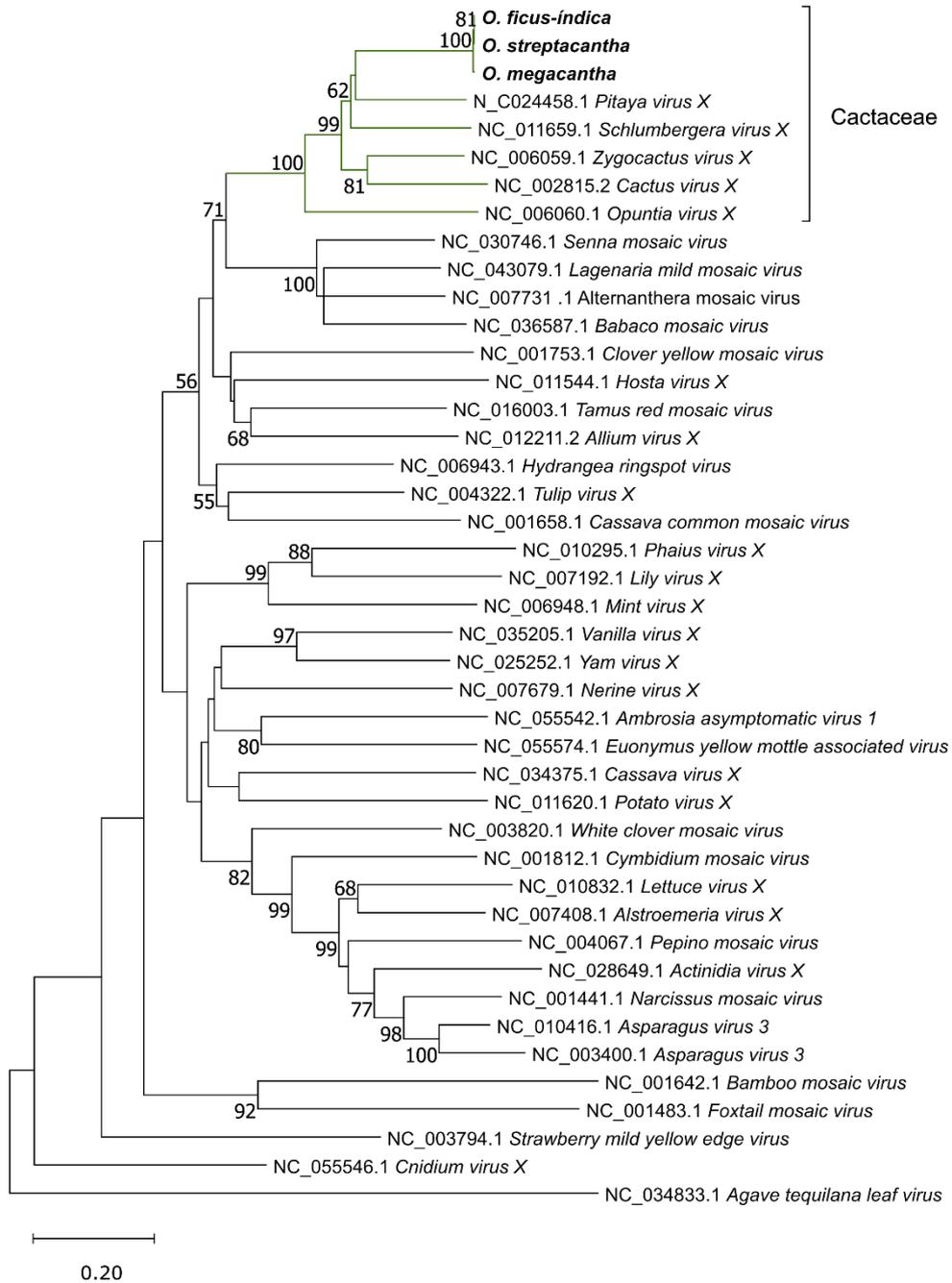


Figura 12. Dendrograma de miembros del género *Potexvirus*. Usando la secuencia de la cápside de 39 especies disponibles en la base de datos del GenBank más las secuencias Sanger de las muestras de *Opuntia* que se encuentran marcadas en negritas. Se señala el grupo donde se encuentran los virus que infectan Cactáceas. Los números indican el soporte de rama de 1,000 repeticiones. Se usó como grupo externo a la secuencia NC_034833.1 *Agave tequilana leaf virus* que pertenece al género *Vitivirus*.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se identificaron y caracterizaron molecularmente a los virus *Rattail cactus necrosis-associated virus* y *Opuntia virus 2* del género *Tobamovirus*; *Opuntia virus H* y *Schlumbergera virus X* pertenecientes a los géneros *Carlavirus* y *Potexvirus*, respectivamente; como posibles causantes de síntomas de manchas cloróticas en diferentes especies de *Opuntia*.

Aunado a esto, en el presente trabajo se detectó mediante rt-PCR la presencia de OV2 en nueve especies; la presencia de RCNaV en tres especies, con otras cinco especies como posibles portadoras; la presencia de SchVX en tres especies y una como probable portadora; y OpVH en dos especies, una de ellas como probable portadora (Tabla 3). Dichos resultados se confirmaron por medio de secuenciación Sanger en donde las secuencias obtenidas se identificaron mediante el uso de la herramienta Blastn, lo que nos indicó que las muestras de *Tobamovirus* identificadas como OV2 obtuvieron un porcentaje de identidad de nucleótidos mayor al 95% (Tabla 4) y para las muestras de RCNaV se obtuvo un porcentaje de identidad de nucleótidos mayor al 90% (Tabla 5); mientras que para las muestras de *Potexvirus* identificadas como SchVX obtuvieron un porcentaje de identidad de nucleótidos mayor al 95% (Tabla 6) y para las muestras de *Carlavirus* identificadas como OpVH obtuvieron porcentajes de identidad mayores al 80% y 90% (Tabla 7).

De acuerdo con el comité internacional de taxonomía de virus (International Committee on Taxonomy Viruses o ICTV por sus siglas en inglés), las secuencias de *Tobamovirus* presentes en las muestras de *Opuntia* analizadas para OV2 y RCNaV pertenecen a la misma especie, respectivamente; ya que se menciona que secuencias con valores de similitud de nucleótidos mayores al 90% son la misma especie (Adams et al. 2017); para las secuencias de *Potexvirus* se menciona que aquellos aislados de la CP con porcentajes de similitud de nucleótidos mayores al 72% son la misma especie, por lo tanto las secuencias corresponden a SchVX (Jan, et al., 2020). Por último, para las secuencias de *Carlavirus* se menciona que para los aislados de la CP o la RdRp la similitud de nucleótidos mayor al 72% se considera la misma especie (Adams et al. 2009), sin embargo, al tener parcialmente la secuencia de la CP en ambas muestras, es recomendable obtener la secuencia completa para delimitar la especie OpVH. Sin embargo, al elaborar un dendrograma del TGB-3 con las secuencias de OpVH y *Carlavirus cactus 1* del GeneBank estas tienen una gran similitud con las secuencias sanger obtenidas (datos no mostrados).

Como se observa en el dendrograma de *Tobamovirus* (Figura 10) las secuencias de OV2, forman un solo subgrupo con la secuencia de *Opuntia virus 2* (NC_040685.2), a diferencia de las secuencias de RCNaV las cuales se agrupan con *Rattail cactus necrosis-associated virus* (KU854932.1 y NC_016442.1) y CMMoV (EU043335.1 y NC_011803), por lo que se generan dos subgrupos de virus de cactáceas para OV2 y RCNaV con CMMoV con un valor de soporte de las ramas del 100% en ambos subgrupos. De acuerdo con Gibbs et al. (2015), el género *Tobamovirus* se clasifica en tres grupos principales correspondientes a las tres subdivisiones de plantas eudicotiledóneas: Asteridae (Astéridas), Rosidae (Rósidas) y Caryophyllidae, excluyendo 29 especies. Por lo tanto, ambos subgrupos de cactáceas se incluyen en el grupo de las caryophyllales. Sin embargo, no se agrupan en uno solo, posiblemente debido al uso de secuencias del ORF de la CP. En contraste, Salgado-Ortiz (2020) empleó secuencias de genomas completos, lo que resultó en la formación de un solo grupo de virus de cactáceas.

En el dendrograma de Potexvirus (Figura 12) las secuencias de SchVX fueron asignadas al subgrupo que corresponde a las Cactáceas con un valor de soporte de ramas del 100%, sin embargo, las secuencias de SchVX tuvieron una mayor homología con la secuencia del *Pitaya virus X* (PiVX)(NC_045458.1) que con la secuencia de SchVX (NC_011659.1). No obstante, Salgado-Ortiz (2016) y Park et al. (2018) obtuvieron resultados similares, donde también las secuencias de SchVX se agrupan con el PiVX.

Como ya se habló anteriormente, la familia Cactaceace es nativa del continente americano donde hay una gran biodiversidad, no obstante, algunos ejemplares han sido desplazados a otros continentes por el humano. Además, también se ha resaltado que en nuestro país tiene un gran número de especies endémicas. Los virus que infectan a cactáceas de los géneros *Tobamovirus*, *Carlavirus* y *Potexvirus* han demostrado una amplia distribución ya que infectan a diferentes especies de la familia Cactacea. Por lo tanto, podemos inferir que virus como RCNaV, CMMoV, OV2, SchVX y OpVH pueden encontrarse en otras especies de la familia, así como en el género *Opuntia* de acuerdo en la información que se tiene de la distribución de las diferentes especies utilizadas en este trabajo, así como otras especies descritas en otros trabajos como *O. albicarpa* (De La Torre et al. 2016a) del Estado de México, *O. pilífera* y *O. depressa* del estado de Puebla (Salgado-Ortiz, 2020), entre otras; aunque CMMoV aún no ha sido detectado en nopal.

Por otra parte, tenemos que en la mayoría de las especies se detectó la presencia OV2, seguido de RCNaV, SchVX y OpVH, sin embargo, estos virus no fueron detectados en todas las especies, únicamente las especies a las cuales se les detectaron todos los virus buscados en esta investigación fueron *O. ficus-indica*, *O. megacantha* y *O. streptacantha*

lo cual podría indicar que la mezcla de diferentes virus puede provocar los síntomas de manchas cloróticas, no obstante, aún no se puede determinar el agente causal hasta no hacer ensayos de transmisión en plantas sanas y verificar los postulados de Koch. Estos resultados contrastan con los presentados por Salgado-Ortiz (2016) en donde menciona que en especies cultivadas con síntomas similares como *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* identificó seis especies de virus que a comparación de las especies silvestres se identificaron menos especies virales, lo que concuerda con la hipótesis del efecto de dilución donde existe un menor riesgo de infección al haber una mayor diversidad que es igual a una mayor variación genética donde generalmente ocurre en especies silvestres a comparación de las especies cultivadas con menor variación genética y el manejo humano intensifica el riesgo de infección (Pagán et al. 2012), lo que generalmente ocurre en los nopales cultivados donde se hace uso de la propagación vegetativa. Continuando con los resultados de este trabajo, a pesar de que en las dos especies silvestres y la especie cultivada se hayan detectado los mismos virus, esto podría cambiar si detectáramos un mayor número de virus en las especies de este trabajo, como lo hizo Salgado-Ortiz en el 2016.

Aunque en ambos trabajos *O. ficus-indica* sea la especie en donde se han identificado más o los mismos virus que en las especies silvestres; los virus detectados en las especies silvestres nos dan un indicativo de que probablemente estos virus tengan una zona de origen en común como ocurre con la especie del género *Nucleorhabdovirus* detectada en Nopales de Zapotitlán Puebla donde hasta el momento no se ha detectado en otras especies de nopal, lo que indicó que podría estar restringido a esa región (Salgado-Ortiz, 2020). Además, otra especie en la cual también se han identificado seis especies de virus fue *Notocactus leninghausii* f. *cristatus* la cual fue cultivada en Corea del Sur (Park et al. 2018) lo mismo que ocurre en las especies de *Opuntia* ya reportadas y presentadas en este trabajo.

Cabe destacar, que al hacer la comparación de la diversidad de virus en las especies de *Opuntia* se encontraron diferencias notables, ya que en la detección los *Tobamovirus* tuvieron una mayor presencia a diferencia de los *Potexvirus* y *Carlavirus* que no se detectaron en todas las especies. Por lo tanto, la evolución de los *Tobamovirus* se encuentra asociada directamente a su hospedero (Gibbs et al. 2015), es decir, cuando el antepasado de las *Opuntias* evolucionó los virus asociados a este también lo hicieron; sin embargo, no podemos decir lo mismo de los *Potexvirus* y los *Carlavirus* ya que aun no se han hecho estudios similares.

En adición a esto, se ha demostrado la complementación entre diferentes virus que sean de la misma especie o no durante infecciones en mezcla, donde la infección por un virus permite o potencia la infección de otro, ya sea por mutaciones o el reordenamiento del genoma entre dos virus o por la expresión de proteína de un virus que puede mejorar o sirve de soporte para la infección de otro virus (Bazzini, et al. 2006; Latham y Wilson, 2008; Bag, et al. 2012). De esta manera, que en las especies de nopal o cactus se hayan encontrado a las diferentes especies de virus en una sola especie nos puede dar el indicativo de que dicho efecto podría estar presente al menos en las especies de *Opuntia* silvestres donde aún se desconoce la dispersión de las especies virales, ya que estas no son utilizadas para el cultivo de nopal verdura donde se usa la propagación vegetativa.

Así mismo, sería factible continuar esta investigación con apoyo de la Secuenciación masiva de RNA (RNA-Seq) de las especies de *Opuntia* de este trabajo ya que permitiría profundizar más sobre si dichos virus en cada especie para conocer si son o no variantes, además, de cómo podría verse afectada la planta a nivel transcriptómico en la presencia de uno o varios virus. También, ya no se tendría la problemática de OV2 en el agrupamiento del grupo Caryophyllidae (Cactaceas) como si se tuvo al tener únicamente el fragmento de la CP, no obstante, el fragmento de la CP nos sirvió para el diagnóstico de estas especies virales.

CONCLUSIÓN

Se identificaron en especies silvestres y cultivada del género *Opuntia* colectadas del jardín botánico de C. U. las cuales son originarias de distintos estados de la República Mexicana con síntomas de manchas circulares cloróticas la presencia de diferentes especies de virus pertenecientes a los grupos *Tobamovirus* (OV2 y RCNaV), *Potexvirus* (SchVX) y *Carlavirus* (OpVH) por medio de ensayos de RT-PCR usando oligonucleótidos específicos para el gen de la CP y la secuenciación Sanger de productos de la RT-PCR; donde también se pudo identificar que en *O. ficus-indica*, *O. megacantha* y *O. hypthiakantha* se encuentran los cuatro virus detectados en este trabajo.

REFERENCIAS

- Adams, M. J., Adkins, S., Blagard, C. et al. (2009). International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) 9th Report on the taxonomy of the Betaflexiviridae. Disponible en https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae. Recuperado el 20/06/2023.
- Adams, M.J., Adkins, S., Bragard, C., Gilmer, D., Li, D., MacFarlane, S.A., Wong, S-M., Melcher, U., Ratti, C., Ryu, K.H., y ICTV Report Consortium. (2017), [ICTV Virus Taxonomy Profile: Virgaviridae](#). Journal of General Virology, 98: 1999–2000.
- Alonso, B. B., Mora, A. G., Valdovinos, P. G., Ochoa M. D. L., Rodríguez L. E., Tlapal B. B., y De La Torre-Almaraz, R. (2015). Asociación de un Potexvirus como Agente Causal de Manchas Cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 75-86.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Bag, S., Mitter, N., Eid, S., & Pappu, H. R. (2012). Complementation between two tospoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. *PloS one*, 7(10), e44803. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044803>
- Bazzini, A. A., Asurmendi, S., Hopp, H. E., & Beachy, R. N. (2006). Tobacco mosaic virus (TMV) and potato virus X (PVX) coat proteins confer heterologous interference to PVX and TMV infection, respectively. *The Journal of general virology*, 87(Pt 4), 1005–1012. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81396-0>
- Bravo-Hollis, H. y Sánchez-Mejorada, H. (1978). *Las Cactáceas de México*. Vols I y III. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México.
- Casas, A. y Barbera, G. (2002). Chapter 9: Mesoamerican domestication and Diffusion. En Nobel, P. S. *Cacti: Biology and Uses*. (pp. 143-162). Los Angeles, California: University of California Press.
- De La Torre, A. R., Salazar, S. M., Ruiz, M. R. (2007). Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41: 763-773.
- De La Torre, A. R.; Salgado, O. H.; Salazar, S. M.; Pallás, V.; Sánchez, N. J. A. y Valverde, R. A. (2016) (a). First Report of Rattail cactus necrosis-associated virus in Prickly Pear Fruit (*Opuntia albicarpa* Scheinvar) in Mexico. *Plant Disease* 100 (11): 2339.

- De La Torre, A. R., Salgado, O. H.; Salazar, S. M., Pallás, V.; Sánchez, N. J. A. y Valverde, R. A. (2016) (b). First Report of Schlumbergera virus X in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico. *Plant Disease* 100 (8): 1799.
- Dellaporta, S., Wood, J., Hicks, J. (1983). A plant minipreparation: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-20. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02712670>
- Duarte, L. M. L., Alexandre, M. A. V., Rivas, E. B., Harakava, R., Galleti, S. R., Barradas, M. M. (2008). Potexvirus Diversity in Cactaceae from Sao Paulo state in Brazil. *Journal of Plant Pathology* 90(3): 545-551.
- Dubeux Jr, J. C. B., Salem, H. B. y Nefzaoui, A. (2018). Producción y utilización de nopal forrajero en la nutrición animal. En Inglesse, P., Jacobo, C. M., Nefzaoui, A. y Sáenz, C. *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*, pp. 77 – 95. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma (ICARDA).
- Flores, C. A. V. (2003). Importancia del nopal. En Flores, C.A.V. (1ra Ed.) *Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización*. Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM, México, pp. 1 – 18.
- Fontenele, R. S., Salywon, A. M., Majure, L. C., Cobb, I. N., Bhaskara, A., Avalos-Calleros, J. A., Argüello-Astorga, G. R., Schmidlin, K., Khalifeh, A., Smith, K., Schreck, J., Lund, M. C., Köhler, M., Wojciechowski, M. F., Hodgson, W. C., Puente-Martinez, R., Van Doorslaer, K., Kumari, S., Vernière, C., Filloux, D., ... Varsani, A. (2020). A Novel Divergent Geminivirus Identified in Asymptomatic New World Cactaceae Plants. *Viruses*, 12(4), 398. DOI: <https://doi.org/10.3390/v12040398>
- Fontenele, R. S., Salywon, A. M., Majure, L. C., Cobb, I. N., Bhaskara, A., Avalos-Calleros, J. A., Argüello-Astorga, G. R., Schmidlin, K., Khalifeh, A., Smith, K., Schreck, J., Lund, M. C., Köhler, M., Wojciechowski, M. F., Hodgson, W. C., Puente-Martinez, R., Van Doorslaer, K., Kumari, S., Oyeniran, K. A., Vernière, C., ... Varsani, A. (2021). New World Cactaceae Plants Harbor Diverse Geminiviruses. *Viruses*, 13(4), 694. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13040694>
- Gibbs, A. J., Wood, J., Garcia-Arenal, F., Ohshima, K., & Armstrong, J. S. (2015). Tobamoviruses have probably co-diverged with their eudicotyledonous hosts for at least 110 million years. *Virus evolution*, 1(1), vev019. <https://doi.org/10.1093/ve/vev019>
- Granata, G., Faedda, R. y Ochoa, M. J. (2018). Enfermedades del nopal. En Inglesse, P., Jacobo, C. M., Nefzaoui, A. y Sáenz, C. *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*, pp. 97 – 107. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma (ICARDA).

- Guerrero, P. C., Majure, L. C., Cornejo-Romero, A., & Hernández-Hernández, T. (2019). Phylogenetic Relationships and Evolutionary Trends in the Cactus Family. *The Journal of heredity*, 110(1), 4–21. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/esy064>
- Guzmán, U., Arias, S., Dávila, P. (2003). *Catálogo de cactáceas mexicanas*. UNAM, CONABIO, México, 315 pags.
- Hernández-Pérez, R., Noa-Carrazana, J. C., Gaspar, R., Mata, P. y Flores-Estévez, N. (2009). Detection of Phytoplasma on Indian Fig (*Opuntia ficus-indica* Mill) in Mexico Central Region. *OnLine Journal of Biological Sciences*, 9 (3): 62-66 pp.
- Jacobo, C. M. y Gallegos, S. J. M. (2018). Producción y utilización de nopalitos. En Inglese, P., Jacobo, C. M., Nefzaoui, A. y Sáenz, C. *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*, pp. 97 – 107. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma (ICARDA).
- Jan F. Kreuze, Anna Maria Vaira, Wulf Menzel, Thierry Candresse, Sergei K. Zavriev, John Hammond, Ki Hyun Ryu, y ICTV Report Consortium. (2020), [ICTV Virus Taxonomy Profile: *Alphaflexiviridae*](#), *Journal of General Virology*, 101, 699–700.
- Jeong, J.-J., Ju, H.-J., y Noh, J. (2014). A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. *Research in Plant Disease*. Korean Society of Plant Pathology, 20(3) : 173-181. <https://doi.org/10.5423/rpd.2014.20.3.173>
- Jones, S., Baizan-Edge, A., MacFarlane, S. y Torrance, L. (2017). Viral Diagnostics in Plants Using Next Generation Sequencing: Computational Analysis in Practice. *Front. Plant Sci.* 8:1770. doi: 10.3389/fpls.2017.01770
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kim, N. R., Hong, J. S., Song, Y. S., Chung, B. N., Park, J. W., & Ryu, K. H. (2012). The complete genome sequence of a member of a new species of tobamovirus (rattail cactus necrosis-associated virus) isolated from *Aporcactus flagelliformis*. *Archives of virology*, 157(1), 185–187. <https://doi.org/10.1007/s00705-011-1142-5>
- Lacroix, C., Renner, K., Cole, E., Seabloom, E. W., Borer, E. T. y Malmstrom, C.M. (2016). Methodological guidelines for accurate detection of viruses in wild plant species. *Appl Environ Microbiol*, 82:1966 –1975. doi: 10.1128/AEM.03538-15.
- Lan, P., Tian, T., Pu, L., Rao, W., Li, F., y Li, R. (2019). Characterization and detection of a new badnavirus infecting *Epiphyllum* spp. *Archives of virology*, 164(7), 1837–1841. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04237-6>

- Latham, J. R., y Wilson, A. K. (2008). Transcomplementation and synergism in plants: implications for viral transgenes?. *Molecular plant pathology*, 9(1), 85–103. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00441.x>
- Liou, M. R., Chen, Y. R., y Liou, R. F. (2004). Complete nucleotide sequence and genome organization of a Cactus virus X strain from *Hylocereus undatus* (Cactaceae). *Archives of virology*, 149(5), 1037–1043. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0251-1>
- Maliarenko, V. M. y Mudrak, T. P. (2013). Cactus viruses in fasciated plants. *BIOLOGIJA*. 59 (2), 213–218 pp. DOI: [10.6001/biologija.v59i2.2754](https://doi.org/10.6001/biologija.v59i2.2754)
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., y Schätzl, H. (2013). *Molecular virology*. Springer.
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., y Barker, I. (2006). Advances in molecular phytodiagnosics - new solutions for old problems. *European journal of plant pathology*, 116(1), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9037-0>
- Nobel, P. S. (2002). *Cacti: Biology and Uses*. (pp. 143-162). Los Angeles, California: University of California Press.
- Pagán, I., González-Jara, P., Moreno-Letelier, A., Rodelo-Urrego, M., Fraile, A., Piñero, D., & García-Arenal, F. (2012). Effect of biodiversity changes in disease risk: exploring disease emergence in a plant-virus system. *PLoS pathogens*, 8(7), e1002796. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002796>
- Park, C. H., Song, E. G., & Ryu, K. H. (2018). Detection of Co-Infection of *Notocactus leninghausii* f. *cristatus* with Six Virus Species in South Korea. *The plant pathology journal*, 34(1), 65–70. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.08.2017.0187>
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N., & Ravnikar, M. (2017). Next Generation Sequencing for Detection and Discovery of Plant Viruses and Viroids: Comparison of Two Approaches. *Frontiers in microbiology*, 8: 1998. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01998>
- Potgieter, J. y D'Aquino, S. (2018). Producción de tuna y manejo postcosecha. En Inglese, P., Jacobo, C. M., Nefzaoui, A. y Sáenz, C. *Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*, pp. 53 – 73. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma (ICARDA).
- Salgado-Ortiz, H. (2016). Caracterización molecular de virus asociados a manchas anulares en nopal verdura (*Opuntia ficus-índica* (L.) Mill.) en México. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 71 pags.

- Salgado-Ortiz, H. (2020). Diversidad de virus en algunas especies del género *Opuntia* en México. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 61 pags.
- Salgado-Ortiz, H., De La Torre-Almaraz, R., Sánchez-Navarro, J. Á., y Pallás, V. (2020). Identification and genomic characterization of a novel tobamovirus from prickly pear cactus. *Archives of virology*, 165(3), 781–784. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04528-3>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Secretaría de Agricultura, ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2015). Estudio de factibilidad para el establecimiento de cultivo de nopal (opuntia) en tierras ociosas en los estados de Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato y Zacatecas con fines alimenticios, energéticos y ambientales. Universidad Autónoma de Zacatecas. Folio: 211PP062.
- SIAP. (2022). Cierre de la producción anual agrícola (1999-2021). Recuperado el 28 de noviembre de 2022 de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Simmonds, P., Adams, M. J., Benkő, M., Breitbart, M., Brister, J. R., Carstens, E. B., Davison, A. J., Delwart, E., Gorbalenya, A. E., Harrach, B., Hull, R., King, A. M., Koonin, E. V., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Lefkowitz, E. J., Nibert, M. L., Orton, R., Roossinck, M. J., Sabanadzovic, S., ... Zerbini, F. M. (2017). Consensus statement: Virus taxonomy in the age of metagenomics. *Nature reviews. Microbiology*, 15(3), 161–168. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.177>
- Suaste, D., Rojas, M. A., Reyna, I., Zavaleta, M. E., y Pérez, B. D. (2012). Detección Molecular de Fitoplasmas en Nopal Tunero (*Opuntia ficus-indica*) con Síntomas de Engrosamiento del Cladodio. *Revista mexicana de fitopatología*, 30 (1), 81-85.
- Tamura, K., Stecher, G., y Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 38, Issue 7, pp. 3022–3027, <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Terrazas-Salgado, T. y Mauseth, J. D. (2002). Chapter 2: Shoot Anatomy and Morphology. En Nobel, P. S. *Cacti: Biology and Uses*. (pp. 23-40). Los Angeles, California: University of California Press.
- Zheng, L., Cao, M., Wu, L., Liu, H., Chen, M., y Li, R. (2020). First identification and molecular characterization of a novel cavemovirus infecting *Epiphyllum* spp. *Archives of virology*, 165(9), 2083–2086. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04688-2>

ANEXO

Calidad de los productos de RT-PCR.

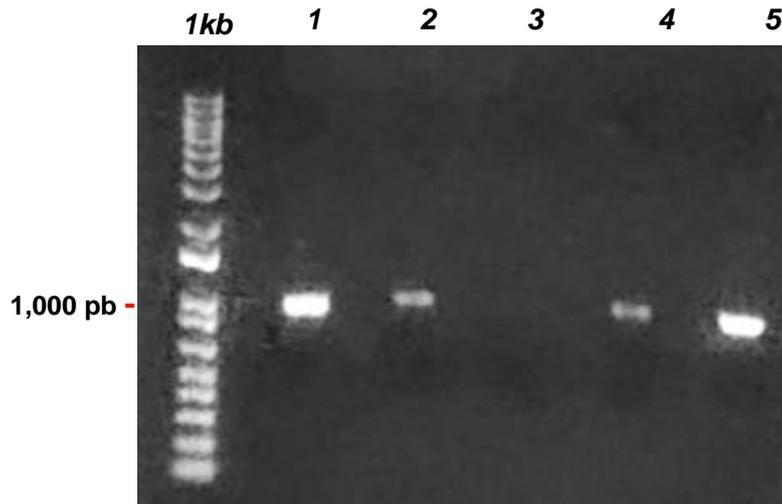


Figura suplementaria 1. Calidad de limpieza de productos de RT-PCR para OV2 (Figura 1). Carril 1. *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. hyptiacantha*; Carril 3. *O. tehuapanensis*; Carril 4. *O. lasiacantha*; Carril 5.: *O. megacantha*. Se observan productos de peso esperado de 1,000 pb para los carriles 1, 2, 4 y 5.

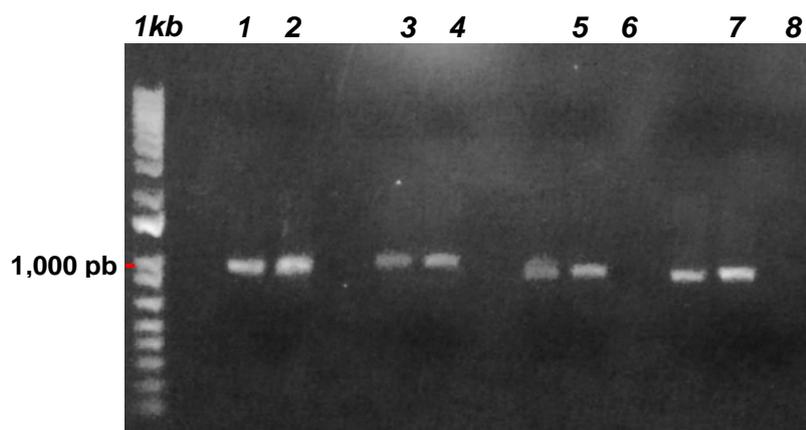


Figura suplementaria 2. Calidad de limpieza de productos de RT-PCR para OV2 (Figura 2). Carril 1. *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. ficus-indica*; Carril 3. *O. engelmannii*; Carril 4. *O. engelmannii*; Carril 5. *O. streptacantha*; Carril 6. *O. streptacantha*; Carril 7. *O. streptacantha*; Carril 8. *O. tormentosa*; Carril 9. *O. tormentosa*. Se observan productos de peso esperado de 1,000 pb, con excepción del carril 9.

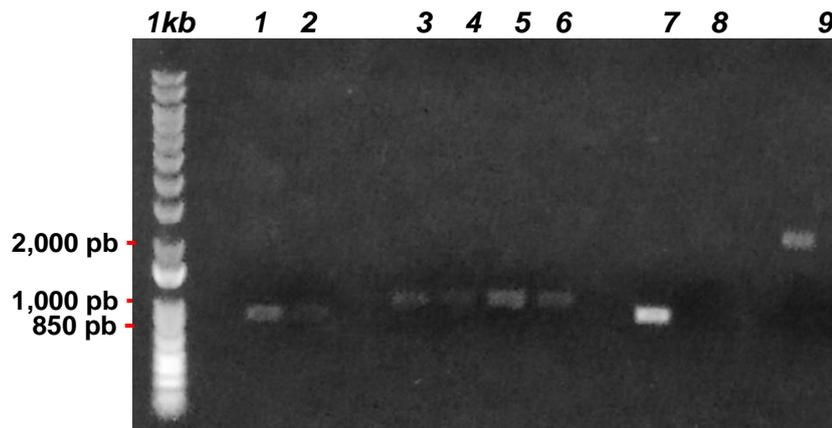


Figura suplementaria 3. Calidad de limpieza de productos de RT-PCR (Figura 3; Figura 8). Productos para SchVX: Carril 1. *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. streptacantha*; Productos para OV2: Carril 3. *Opuntia* sp.; Carril 4. *Opuntia* sp.; Carril 5. *O. megacantha*; Carril 6. *O. megacantha*; Productos para RCNaV: Carril 7. *O. hyptiacantha*; Carril 8. *O. tehuapanensis*; Productos para OpVH: Carril 9. *O. ficus-indica*.

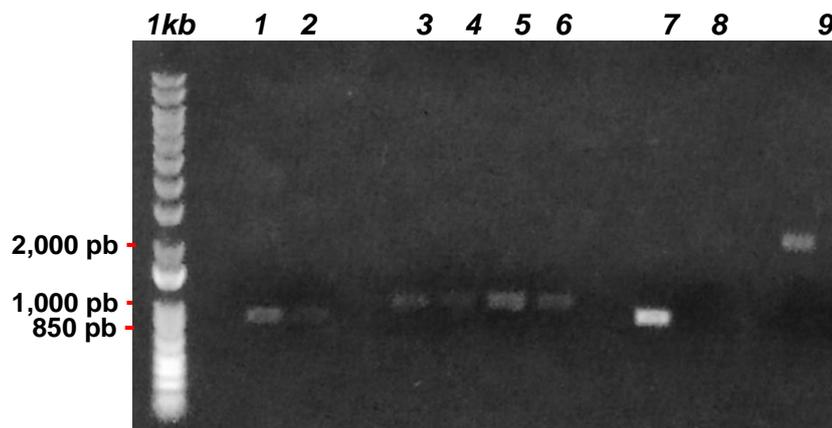


Figura suplementaria 4. Calidad de limpieza de productos de RT-PCR (Figura 3; Figura 8). Productos para SchVX: Carril 1. *O. ficus-indica*; Carril 2. *O. streptacantha*; Productos para OV2: Carril 3. *Opuntia* sp.; Carril 4. *Opuntia* sp.; Carril 5. *O. megacantha*; Carril 6. *O. megacantha*; Productos para RCNaV: Carril 7. *O. hyptiacantha*; Carril 8. *O. tehuapanensis*; Productos para OpVH: Carril 9. *O. ficus-indica*.

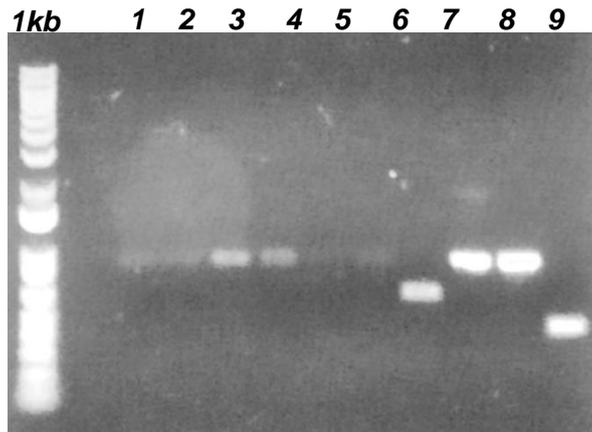


Figura suplementaria 5. Calidad de limpieza de productos de RT-PCR (Figura 5). Productos para RCNaV: Carril 8. *O. hyptiacantha*; Carril 9. *O. parviclada*.

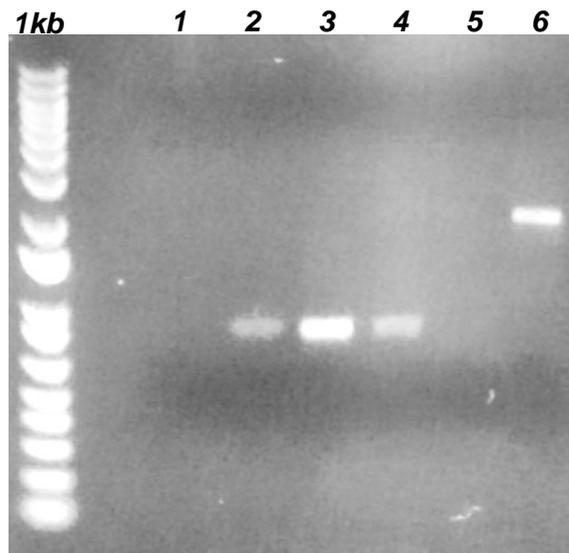


Figura suplementaria 6. Calidad de limpieza de productos de RT-PCR (Figuras 4, 5 y 7). Productos para RCNaV: Carril 1. *O. streptacantha*; Carril 2. *O. tomentosa*; Carril 3: *O. robusta*; Carril 4. *O. lasiacantha*; Productos para OpVH: Carril 5. *O. streptacantha*; Carril 6. *O. megacantha*.