



Artículo Científico

Viroma del nopal verdura en la zona centro de México

Candelario Ortega-Acosta, *Daniel L. Ochoa-Martínez, Reyna I. Rojas-Martínez, Cristian Nava-Díaz, Fitosanidad Fitopatología, Colegio de Postgraduados. 56264. Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México; Rodrigo A. Valverde, Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University Agricultural Center, Baton Rouge, LA, 70803, USA.

RESUMEN

Objetivo/Antecedentes. En este estudio se aprovechó la capacidad de la secuenciación de alto rendimiento (HTS) para detectar virus en nopal verdura.

Materiales y Métodos. Se analizaron muestras del Estado de México (EDMX), Hidalgo y Morelos, así como de la Ciudad de México (CDMX).

Resultados. En la muestra proveniente de EDMX, se detectaron y recuperaron los genomas de *Opuntia virus 2* (OV2, género *Tobamovirus*) y *Cactus carlavirus 1* (CCV-1, género *Carlavirus*). En la muestra proveniente de CDMX, además de OV2 y CCV-1, se detectó un nuevo viroide y un potexvirus. El primero tiene un genoma RNA circular con 412 nt de longitud para el cual se propone el nombre de “*Opuntia viroid P*” (OVd-I). La estructura primaria de este viroide mostró una identidad de secuencia de nucleótidos de menos del 80 % con cualquiera de los viroides actualmente conocidos y una relación filogenética con el género *Apscaviroid*, (Familia *Pospiviroidae*) con el que comparte motivos estructurales conservados.

Conclusión. El nuevo potexvirus se denominó *Opuntia potexvirus A* (OPV-A), cuya secuencia de la replicasa viral tiene un 77.7 % de identidad de aminoácidos con *Schlumbergera virus X*. Finalmente, en 93 (72 %) de 129 muestras de nopal verdura recolectadas en las cuatro entidades, se detectó al CCV-1.

Palabras claves: Cactáceas, HTS, Viroide, *Potexvirus*, *Tobamovirus*, *Carlavirus*.

*Autor de
correspondencia:

Daniel L. Ochoa-Martínez
ldaniel@colpos.mx

Sección:

Número Especial

Recibido:

31 Julio, 2023

Aceptado:

15 Noviembre, 2023

Publicado:

27 Diciembre, 2023

Cita:

Ortega-Acosta C, Ochoa-Martínez DL, Rojas-Martínez RI, Nava-Díaz C y Valverde RA. 2023. Viroma del nopal verdura en la zona centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología 41(4): 3. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2023-2>



Opuntia ficus-indica es la cactácea de mayor importancia económica en el mundo, se cultiva en América, África, Asia, Europa y Oceanía (Barbera *et al.*,

1992). Esta especie fue domesticada en México (Griffith, 2004), donde se encuentra la mayor diversidad de cultivares (Bravo 1978), y de la cual se utilizan sus frutos y cladodios, dependiendo del cultivar. En México existen aproximadamente 12,618 ha dedicadas para la producción de nopal verdura para consumo humano (SIAP, 2022). Las principales entidades productoras de nopal verdura son Morelos y Ciudad de México, que en conjunto comprenden el 50 % de la superficie total cultivada. De los cladodios se obtienen diversos productos y subproductos que se utilizan para elaborar preparaciones antidiabéticas, sus flores son empleadas para preparar bebidas diuréticas, los frutos son usados para preparar jugos, jaleas, miel, mermeladas y pastas, entre otros, y de sus semillas se extrae aceite; además, esta cactácea también se cultiva como hospedante de la “grana cochinilla” (*Dactylopius coccus*), insecto utilizado para la producción del tinte de ácido carmínico (Barbera *et al.*, 1992).

A nivel mundial se han identificado diferentes virus en cactáceas, la mayoría poseen genoma ARN monocatenario (Sastry *et al.*, 2019). Además, se han descrito dos caulimovirus que infectan *Epiphyllum* spp. (Lan *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2020) y tres geminivirus en varias especies de cactus (Fontenele *et al.*, 2020; 2021).

En México, en los municipios de Axapusco, Otumba y San Martín de las Pirámides (Estado de México), se reportó al tobamovirus *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) en plantas de nopal que mostraban manchas pequeñas y anillos amarillos en los cladodios (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2016a). En esa misma zona, también se encontró un potexvirus *Schlumbergera virus X* (SchVX) en plantas de nopal que presentaban manchas irregulares y deformación de cladodios (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2016a). Además, en cladodios de nopal verdura que mostraban síntomas de halos cloróticos y manchas irregulares, se detectaron un tobamovirus y un potexvirus en las localidades de San Martín de las pirámides (Estado de México) y Cuauhtepic de Hinojosa (Hidalgo), respectivamente, de los cuales no se pudo determinar la especie (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2007; Alonso-Barrera *et al.*, 2015). Por último, un tobamovirus, denominado *Opuntia virus 2* (OV2), se detectó con secuenciación de alto rendimiento (HTS, high-throughput sequencing) en especies del género *Opuntia* (Salgado-Ortíz *et al.*, 2020) en México.

Otros patógenos de plantas importantes son los viroides, pequeñas moléculas de ARN circular monocatenario de aproximadamente 400 nucleótidos (nt) de longitud que pueden replicarse de forma autónoma. A diferencia de los virus, no hay evidencia que los viroides codifiquen alguna proteína y que sus genomas estén protegidos por una cápside (Di Serio *et al.*, 2014). Taxonómicamente, los viroides se dividen en dos familias: a) *Pospiviroidae*, que incluye cinco géneros (*Apscaviroid*, *Coccadviroid*, *Coleviroid*, *Hostuviroid* y *Pospiviroid*) y b) *Avsunviroidae* que incluye tres géneros (*Avsunviroid*, *Pelamoviroid* y *Elaviroid*) (Di Serio *et al.*, 2018; 2021). Algunos viroides pueden afectar severamente la producción de diversos cultivos,

mientras que otros se replican sin provocar síntomas en plantas susceptibles (Di Serio *et al.*, 2014).

Los avances en el campo de la secuenciación han hecho que las tecnologías basadas en HTS sean más asequibles a un mayor número de usuarios (Vučkurović *et al.*, 2021). El empleo de HTS ha revolucionado la virología vegetal y acelerado el descubrimiento de nuevas especies de virus en los ecosistemas, ampliando nuestro conocimiento de la diversidad de estos fitopatógenos (Fontenele *et al.*, 2020; Vučkurović *et al.*, 2021). Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue conocer el viroma del nopal verdura y determinar la distribución de *Cactus carlavirus 1* (CCV-1) en cuatro estados productores de nopal verdura en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Secuenciación de alto rendimiento (HTS). Dos muestras que mostraban síntomas putativos a virus, denominadas CDMX-1 y EM-1 se sometieron a HTS. CDMX-1 estuvo conformada con cladodios (n=4) que presentaban patrones amarillos irregulares, anillos amarillos y mosaico, procedentes de la alcaldía Milpa Alta de la Ciudad de México (Figura 1A-D); la muestra EM-1 (n=1) fue una planta proveniente de Oxtotipac, Municipio de Otumba, con manchas cloróticas alrededor de las espinas, este síntoma se denomina localmente por los productores “pinto” (Figura 1E). En ambos casos, se extrajo ARN con el kit SV Total RNA Isolation System (Promega, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La muestra EM-1 se envió a Macrogen Inc. (Corea) en donde se preparó la librería usando TruSeq stranded total ARN, tratado previamente con Ribo-Zero Plant. La secuenciación se realizó en un equipo Illumina NovaSeq6000, con 150-bp PE. La muestra CDMX-1 se envió a BGI Genomics (China), donde se construyó la librería Eukaryotic Strand-specific mRNA y la secuenciación se realizó en la plataforma DNBSEQ, con 150-bp PE.

Análisis bioinformático. Los adaptadores y las secuencias de baja calidad de los datos obtenidos de Macrogen fueron removidos usando Fastp (Chen *et al.*, 2018). Por su parte, las secuencias de BGI, se recibieron limpias y sin adaptadores, por lo cual se verificaron en FastQC (Andrews, 2010). Las lecturas limpias fueron ensambladas *de novo* con el software SPAdes (Prjibelski *et al.*, 2020). Los contigs obtenidos fueron sometidos a una búsqueda BLASTx y BLASTn en una base de datos local de virus/viroides. Posteriormente, la lista reducida de hits virales se comparó con la base de datos completa no redundante (nr) del GenBank utilizando BLASTx y BLASTn (Vučkurović *et al.*, 2021).

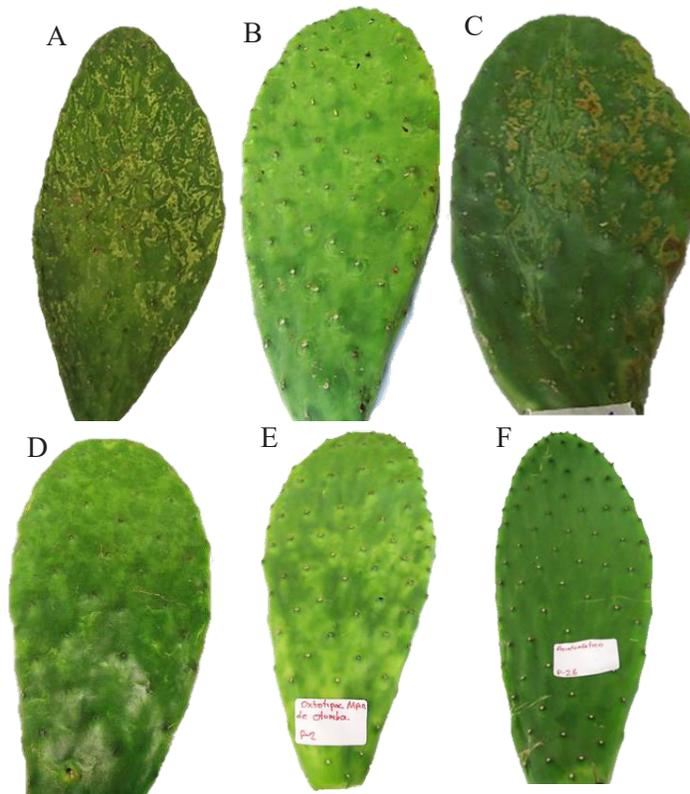


Figura 1. Síntomas asociados a virosis en cladodios de nopal verdura. (A-D) Muestras de nopal colectadas en la Ciudad de México, Alcaldía Milpa Alta, (E) Muestra de nopal colectado en el estado de México, Municipio de Otumba, (F) Muestra de nopal sana del Estado de México.

Para la reconstrucción de los genomas, se utilizó Bowtie2 (Langmead y Salzberg, 2012), Samtools (Li *et al.*, 2009) e Integrative Genomic Viewer (IGV) versión 2.3 (Thorvaldsdóttir *et al.*, 2013). Las características del ensamble de los genomas obtenidos se obtuvieron en Qualimap (Okonechnikov *et al.*, 2016), donde se calculó la cobertura promedio por nucleótido de cada genoma. Finalmente, los genomas obtenidos se anotaron con ORFinder del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (por sus siglas en inglés, NCBI) y se depositaron en el GenBank.

Análisis filogenético. Los genomas obtenidos se alinearon con especies representativas del género *Tobamovirus* obtenidas en la base de datos del NCBI. Se utilizó el modelo GTR+F+R5 de sustituciones de nucleótidos. Por otro lado, se elaboró un árbol filogenético alineando secuencias de genomas completos de miembros representativos del género *Carlavirus* (familia: *Betaflexiviridae*),

obtenidos del NCBI, así como un aislamiento del virus obtenido en este estudio. El modelo evolutivo estimado fue GTR+F+R5. Para el caso de nuevos virus, se construyeron dos árboles filogenéticos alineando secuencias de aminoácidos de la replicasa viral y de la cápside proteica pertenecientes a diferentes especies de la familia correspondiente obtenidas del ICTV (Kreuze *et al.*, 2020) y la secuencia obtenida en este estudio. El modelo evolutivo para la replicasa viral fue LG+F+R7 y para la cápside proteica LG+F+R5. Para el análisis filogenético del nuevo viroide, se utilizaron secuencias de especies representativas de ambas familias de estos patógenos obtenidas del NCBI y el modelo evolutivo utilizado fue HKY+F+G4.

En todos los casos, los árboles se generaron con el método de Máxima Verosimilitud utilizando IQTREE 2 (Minh *et al.*, 2020), el alineamiento múltiple de secuencias en MAFFT (Katoh *et al.*, 2019), y el modelo evolutivo según el Criterio de Información Bayesiano implementado en ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017). El soporte nodal se estimó con el bootstrap ultrarrápido (UFBoot) ejecutando un total de 1000 réplicas. Finalmente, la visualización y edición de los árboles se realizó en iTOL (Letunic y Bork, 2021).

Análisis de identidad por pares. Para reforzar la clasificación de las nuevas especies, se estimó la identidad por pares con SDT v1.2 (Muhire *et al.*, 2014) comparando la replicasa y cápside proteica de los virus más cercanos, así como de diferentes genomas de la familia *Pospiviroidae* para el caso del viroide.

Predicción de estructura secundaria del nuevo viroide. Se obtuvo utilizando el servidor web UNAFold (www.mfold.org consultada el 18 de noviembre de 2022) (Zuker, 2003).

Validación de la detección de los nuevos virus y viroide. Parte del ARN extraído de los cladodios con síntomas que se envió a HTS, se sometió a RT-PCR para confirmar la presencia del viroide y virus encontrados. Se diseñaron diferentes iniciadores (Cuadro 1) a partir de las secuencias obtenidas. Adicionalmente, se realizaron análisis de RT-PCR para la detección de uno de los virus en cuatro muestras independientes recolectadas en la Ciudad de México (n=1, asintomática), Estado de México (n=2), Hidalgo (n=2) y Morelos (n=2).

En todos los casos, la síntesis de cADN se realizó con la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (200 U μL^{-1}) (Promega, USA) a partir de 1 μL de ARN total y 1 μL (10 mM) del iniciador antisentido, siguiendo las instrucciones del fabricante. El cADN obtenido se utilizó como cadena molde para la PCR cuya mezcla consistió en 2 μL de amortiguador de reacción (5X Green GoTaq®), 0.6 μL de MgCl_2 (25 mM), 0.2 μL de dNTPs Mix (10 mM), 0.6 μL (10 μM) de cada iniciador, (sentido y antisentido) 4.9 μL de agua ultrapura, 0.1 μL de GoTaq® DNA Polymerase (5 U μL^{-1}) (Promega, USA) y 1 μL de cDNA en un volumen final de 10 μL . Las

Cuadro 1. Iniciadores utilizados en los ensayos de RT-PCR para la validación de los virus/viroide detectados en los datos de HTS de las dos bibliotecas de nopal.

Nombre del iniciador	Virus/Viroide (Región)	Secuencia (5'→3')	Amplicón (pb)	Temperatura de alineamiento (°C)
OV2-F	<i>Opuntia virus</i> 2 (Proteína de movimiento)	CGG GTC CTT TTC CTT TTG TCT GTC	667	55
OV2-R		GAGAGCGAGTAGAAACTCCAACG		
CCV1-F	<i>Cactus carlavirus</i> 1 (Replicasa viral)	GAAGCGCATGGGCTGTATTG	459	55
CCV1-R		GTCTGCGCAGCTTTAGCATC		
Opuntia_Potex-F(RdRp)	<i>Opuntia potexvirus</i> A (Replicasa viral)	ACCCACTAGCCATTGAAGCC	580	55
Opuntia_Potex-R(RdRp)		AGGTGGTTGGCACCTTTTGA		
Caulimovirus_F	Caulimovirus (Retro transcriptasa)	TCCTCACACTAGTCCTGCCT	846	55
Caulimovirus_R		TTGAGGACGGCACTCCAATG		
Alphavirus-F(RdRp)	Alphavirus (Cápside)	CACTGGCGTGTTTTAGCCAC	579	55
Alphavirus-R(RdRp)		TCAGCCTCCAGCCACAAAAT		
Tymovirus-F	Tymovirus (Proteína del triple bloque de genes)	CTGGAGCGCCTTGGAATAA	745	55
Tymovirus-R		TTTGCCAACCCCTACCATGA		
Vityvirus-F	Vityvirus (Proteína de movimiento)	GAACTGCTTGATATGCGCCG	229	55
Vityvirus-R		CCTGACGGACCACACTCATC		
Banmivirus_Opun-F	Banmivirus (Replicasa viral)	CAGAGCGCCAATTAACCTGC	707	55
Banmivirus_Opun-R		CGCTCTTGAAGGTTAGCCCA		
OPV-I-1F	<i>Opuntia viroid I</i> (Parte del genoma)	TTGACCTAGGTTGGCTCTCG	362	55
OPV-I-1R		GCAGGAGAAGGCCAGGAAG		
OPV-I-2F	<i>Opuntia viroid I</i> (Parte del genoma)	GGGATCAACCTTGTGGTTTCCT	351	55
OPV-I-2R		GAAAGAAAAGCACCTGTGGGC		

condiciones de PCR incluyeron una incubación inicial a 95 °C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 30 s, alineamiento a 55 °C durante 30 s, extensión a 72 °C durante 40 s y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos de PCR se secuenciaron por el método Sanger en MacroGen Inc.

Detección de CCV-1. Se analizaron mediante RT-PCR 129 muestras provenientes de cladodios recolectados del Estado de México, Hidalgo, Morelos y Ciudad de México para la detección de CCV-1 con los oligonucleótidos CCV1-F/R con la finalidad de conocer su presencia o ausencia.

Microscopía electrónica de transmisión. Con el propósito de conocer si se encontraban viriones de los virus determinados en los resultados de HTS, plantas de nopal sintomático fueron utilizadas para preparar rejillas de cobre de 300 mallas cubiertas con Formvar para su observación. Para esto, se realizó la técnica “leaf dip” y se utilizó ácido fosfotúngstico 2 % como contrastante. Las rejillas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G² Spirit TWIN, de la Unidad de Microscopía Electrónica del Colegio de Postgraduados.

RESULTADOS

Detección de virus por HTS. Se obtuvieron 32,921,232 lecturas en la muestra EM-1 y 48,292,940 lecturas para la muestra CDMX-1. Las lecturas sin procesar se depositaron en el NCBI con el número de bio-proyecto PRJNA922236. El análisis de estas lecturas mostró la presencia de secuencias de diferentes virus y un viroide en nopal (Cuadro 2), los cuales se describen a continuación:

Cuadro 2. Comparación del genoma completo o parcial de los virus encontrados por HTS en las dos bibliotecas de nopal, con la secuencia de referencia más similar del GenBank.

Muestra	Aislamiento de Virus detectado/Viroide	Número de acceso GenBank	Parte del genoma	Número de acceso de la secuencia de referencia	Porcentaje de similitud de nucleótido
EM-1	CCV-1-Edo-MeX	OQ240442	Completo	KU854930.4	87.71
	OV2-Edo-Mex	OQ240440	Completo	NC_040685.2	97.67
	CCV-1-CD-MX	OQ240444	Parcial	KU854930.4	97.5
CDMX-1	OV2-CDMX	OQ240441	Completo	NC_040685.2	97.61
	<i>Opuntia virus A</i>	OQ240443	Completo	LC654699.2	74.42
	<i>Opuntia viroid I</i>	OQ240445	Completo	X95292.1	88.52*

*Cobertura de consulta 14%

Opuntia virus 2. Se detectó y confirmó su presencia en las dos muestras sometidas a HTS, obteniendo dos genomas completos denominados OV2-Edo-Mex y OV2-CDMX; la cobertura promedio por nucleótido fue de 634,104.1X y 500.5X, respectivamente (Figura 2A, 3A). El genoma OV2-Edo-Mex de 6,453 nt tiene la organización típica de los tobamovirus (Figura 2B) con una región no traducible (UTR) 5' (nt 1-57), un marco de lectura abierto (ORF) que codifica la replicasa viral (RdRp) de 183 kDa (nt 58 -4,854), metiltransferasa/helicasa de 128 kDa (nt 67-3,360), una proteína de movimiento (MP) (nt 4,844-5,608), cubierta proteica (CP) (nt 5,514-6,167) y la UTR 3' (nt 6,168-6,453). El genoma de OV2-Edo-Mex tiene una identidad de nucleótidos del 97.6 % con el aislamiento NC_040685.2 de OV2 (Cuadro 2).

El genoma del aislamiento OV2-CDMX tuvo una longitud de 6,453 nt, con una organización típica de tobamovirus (Figura 3B) consistente en una región 5' no traducible (nt 1-61), un ORF que codifica la RdRp de 183 kDa (nt 62-4,858), metiltransferasa/helicasa de 128 kDa (nt 62-3,364), MP (nt 4,848-5,612) y CP (nt 5,632-6,171) así como una UTR 3' (nt 6,172-6,453). La secuencia del genoma de este aislamiento compartió una identidad de nucleótidos del 97.61% con el aislamiento NC_040685.2 de OV2 (Cuadro 2). El análisis filogenético ubicó a ambos

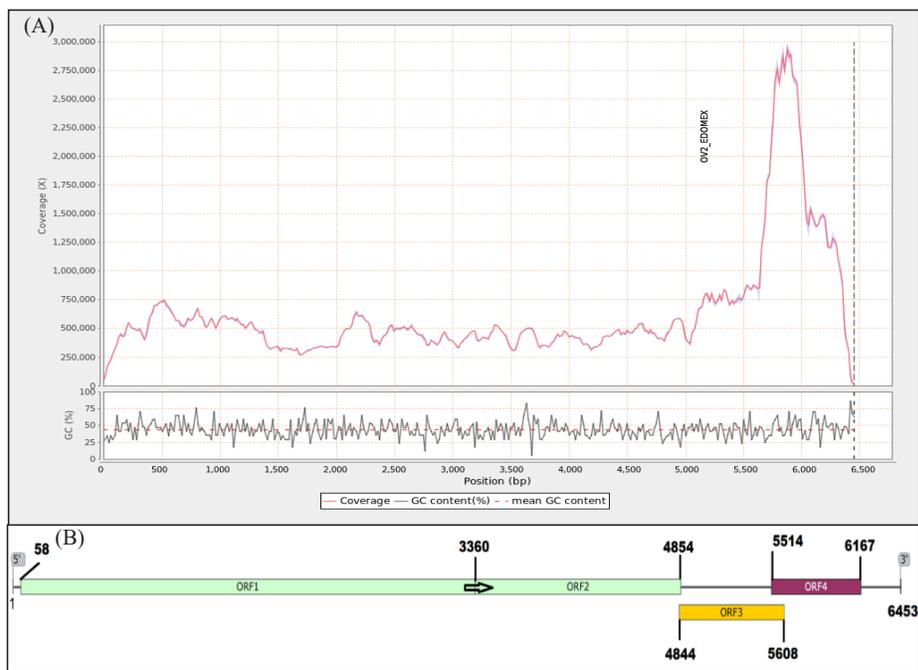


Figura 2. (A) Cobertura de lecturas a lo largo del genoma del aislamiento OV2-Edo-Mex y porcentaje del contenido de guanina citosina, (B) Mapa genómico del OV2-Edo-Mex. La flecha indica el sitio del codón de terminación de la proteína de 128 kDa completa, con fugas de lectura.

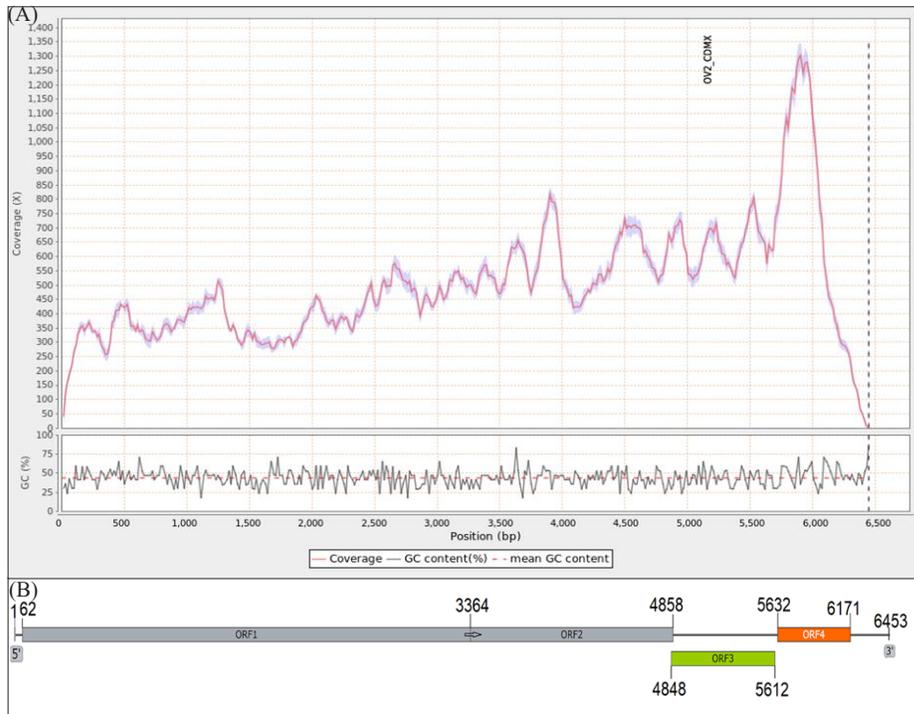


Figura 3. (A) Cobertura de lecturas a lo largo del genoma del aislamiento OV2-CDMX y porcentaje del contenido de guanina citosina (B) Mapa genómico de OV2-CDMX. La flecha indica el sitio del codón de terminación de la proteína de 128 kDa completa, con fugas de lectura.

aislamientos de OV2 obtenidos en este estudio, en el subgrupo de tobamovirus que infectan cactáceas (Figura 4).

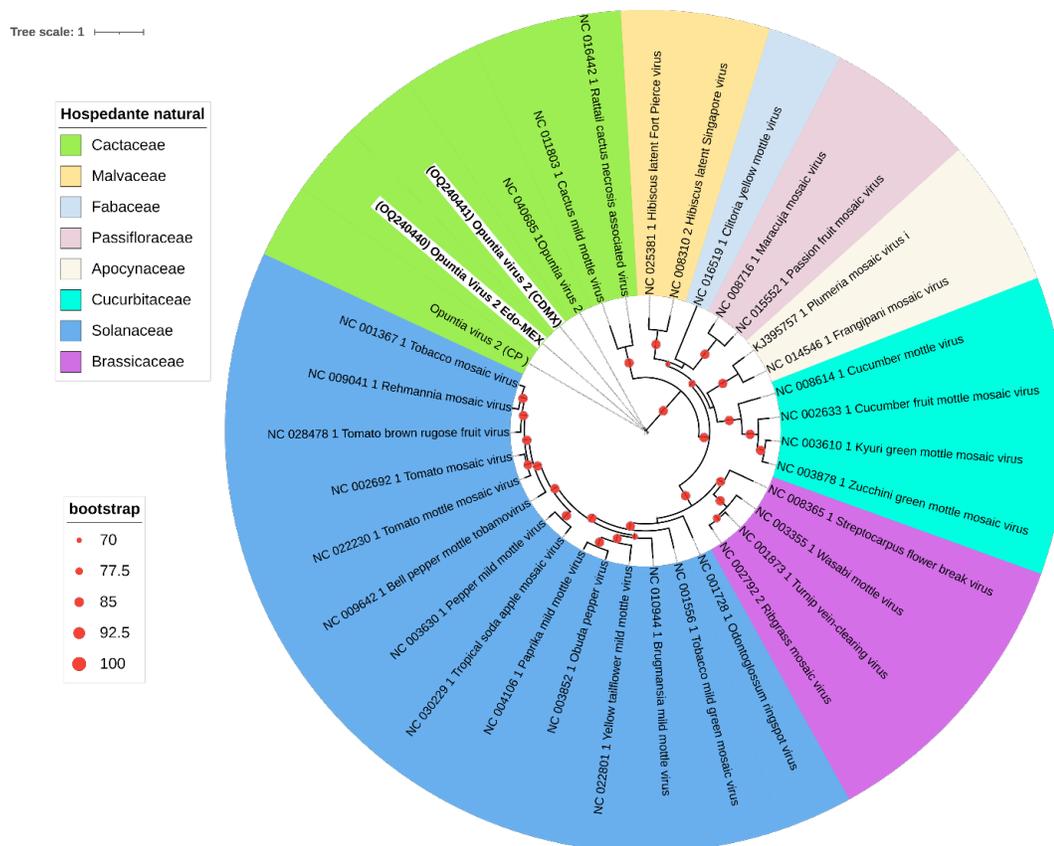


Figura 4. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud del género *Tobamovirus* que muestra las relaciones entre los genomas obtenidas en este estudio (en negrita) del OV2 y la de aislamientos previamente reportados. Los diferentes colores representan las familias botánicas como hospedantes naturales donde se ha reportado cada virus. Los círculos en las ramas muestran valores de soporte UFBoot > 70%.

Cactus carlavirus 1 (CCV-1). Este virus se detectó en las dos muestras que se sometieron a HTS. Sin embargo, el genoma completo solo se recuperó en la muestra del Estado de México. El genoma obtenido estuvo soportado por una cobertura promedio por nucleótido de 15,516X (Figura 5A). La organización del genoma de CCV-1 es similar a la de otros carlavirus conocidos, con seis ORFs (Figura 5B): el ORF1 (nt 61-5,880) codifica una poliproteína (220 kDa) involucrada en la replicación viral; ORF2 (TGB1) (nt 5,910-6,599), ORF3 (TGB2) (nt 6,577-6,897) y ORF4 (TGB3) (nt 6,879-7,067) codifican tres proteínas de 26 kDa, 11 kDa y 7 kDa, respectivamente, que son las proteínas del triple bloque de genes (TGB) asociadas al movimiento de célula a célula ‘tipo potex’ (Morozov y Solovyev, 2003); ORF5

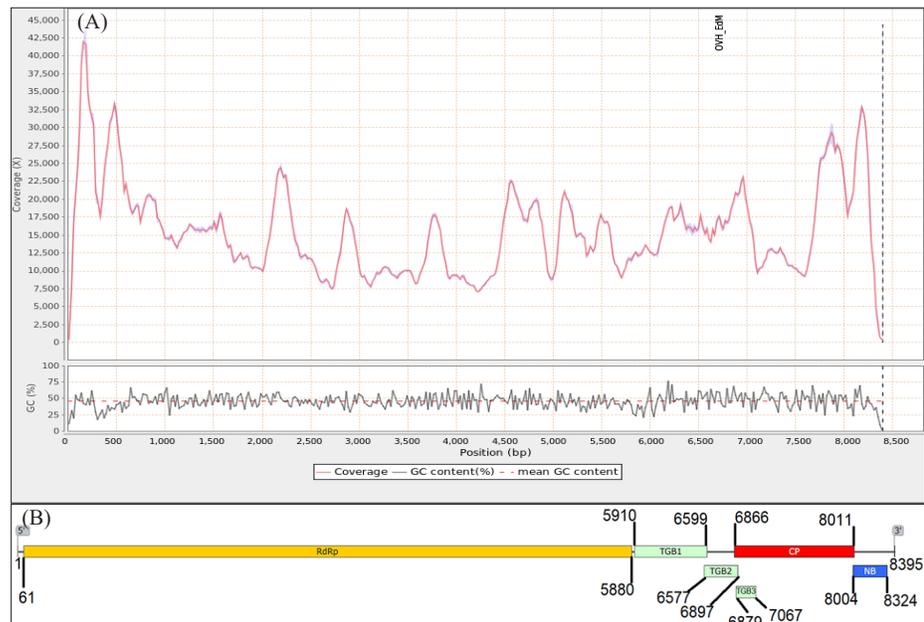


Figura 5. (A) Cobertura de lecturas a lo largo del genoma del aislamiento CCV-1-Edo-Mex y porcentaje del contenido de guanina citosina, (B) Organización del genoma de CCV1-Edo-Mex, que muestra seis marcos de lectura abiertos y sus productos correspondientes. RNA-dependiente RNA-polimerasa, (RdRp); cubierta proteica, (CP); proteína de unión al ácido nucleico, (NB); bloque de tres genes, (TGB).

(nt 6,866-8,011) codifica una proteína con un dominio de cubierta proteica (CP) típica de carlavirus y un dominio Flexi_CP; ORF6 (nt 8,004-8,324) codifica una proteína de unión a ácidos nucleicos (NB) de 12 kDa; y por último las regiones UTR 5' (nt 1-60) y 3' (8,325-8,395). El análisis filogenético agrupó al CCV-1-Edo-Mex, junto a los dos únicos genomas que se tienen disponibles en el GenBank de este virus (Figura 6) con un porcentaje de similitud a nivel de nucleótidos del 87.86 y 90.41 %.

Opuntia potexvirus A (OPV-A). En la muestra compuesta de la Ciudad de México se detectó un contig de 6,671 nt, que en la búsqueda BLASTx tuvo 77.5 % de identidad con *Schlumbergera virus X* (SchVX). La inspección adicional de la transcripción del genoma viral y la curación mediante el mapeo interactivo de las lecturas filtradas dio como resultado una secuencia viral consolidada de 6,644 nt respaldada por 10,536,601 lecturas con una cobertura promedio por nucleótido de 238,206.9X (Figura 7A). El genoma se encuentra organizado en cinco ORFs (Figura 7B). Al igual que otros potexvirus, el ORF1 (nt 85-4737) codifica la replicasa viral

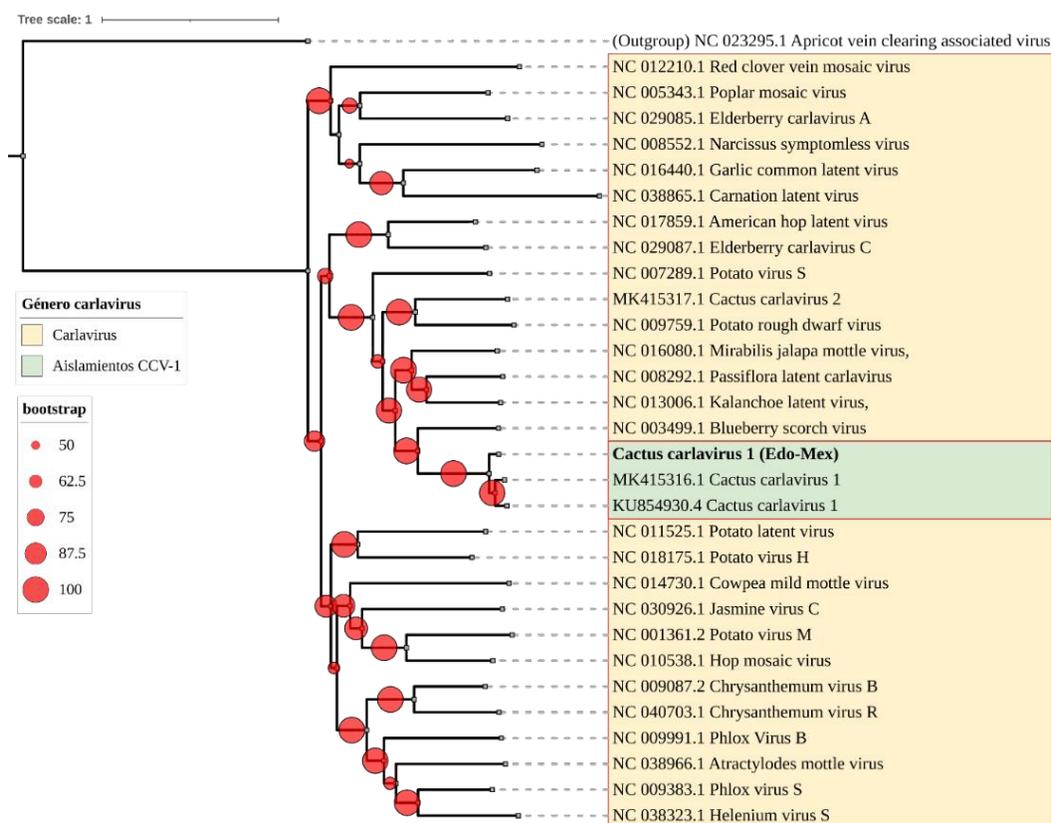


Figura 6. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de genomas completos de secuencias de nucleótidos de CCV-1 de este estudio (en negrita), así como otros aislamientos, y diferentes especies del género *Carlavirus*. Como grupo externo se utilizó al *Apricot vein clearing associated virus*, género *Prunivirus*. Los círculos en las ramas muestran valores de soporte UFBoot > 50%.

que consta de 1,550 aminoácidos (aa). Asimismo, posee un conjunto de tres ORFs parcialmente superpuestos: ORF2 (4,737–5,426 nt), ORF3 (5,389–5,721 nt) y ORF4 (5,651–5,842 nt), que muestran la configuración típica del bloque de tres genes (TGB) de los potexvirus. El ORF5 (5,854–6,531 nt) codifica la proteína de la cápside (CP). Finalmente, se detectaron las regiones UTR de 84 y 113 nt en los extremos 5' y 3', respectivamente.

Los motivos conservados de aa QDGAML, HQQAKDE y TFDANTE se identificaron en la región C-terminal de la replicasa viral (Van der Vlugt y Berendsen 2002). Por otra parte, un dominio replicasa catalítico, que contiene el motivo central de consenso característico TGX3TX3NTX22GDD encontrado en potexvirus (Martelli *et al.*, 2007), estaba presente cerca del extremo C de la replicasa. También, se encontró el motivo hexanucleótido 5'-GGAAA-3', en el extremo 5'-

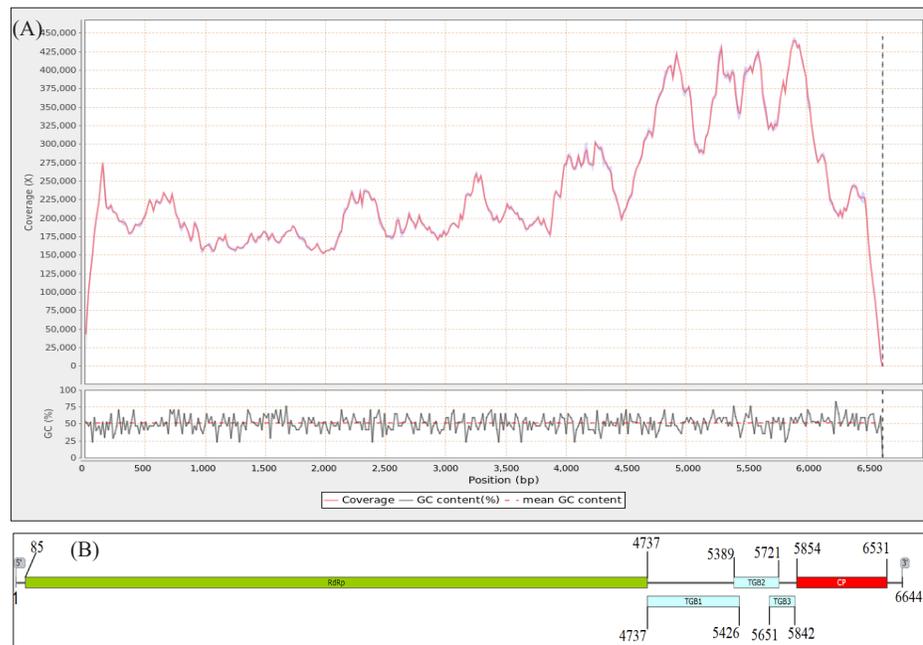


Figura 7. (A) Cobertura de lecturas a lo largo del genoma de *Opuntia potexvirus A* (OPV-A) y porcentaje de guanina/citosina, (B) Organización del genoma de OPV-A, que muestra cinco marcos de lectura abiertos y sus productos correspondientes: RdRp, replicasa viral; TGB, bloque de tres genes. CP, cubierta proteica.

UTR, el cual se tiene presente en algunos potexvirus (Chen *et al.*, 2005), al igual que una putativa señal de poliadenilación en el extremo 3'-UTR.

La comparación por pares reveló identidades a nivel de aminoácidos que oscilaron del 59.8 al 82.2 % para la CP, y del 53.6 al 77.7 % para la replicasa viral (Figura 8a, b). El criterio de demarcación de especies para potexvirus, establece que especies distintas tienen <72 % nt o <80 % aa de identidad para los genes de la replicasa o cubierta proteica, respectivamente (Adams *et al.*, 2004). Por lo anterior, el virus detectado en nopal se considera una nueva especie del género *Potexvirus* para el cual se propone el nombre de "*Opuntia potexvirus A*" (OPV-A). La secuencia del genoma de OPV-A se depositó en el GenBank con el número de acceso OQ240443.

Los árboles filogenéticos basados en secuencias de aminoácidos de la replicasa viral y cubierta proteica de los virus pertenecientes a la familia *Alfalflexiviridae* muestran que OPV-A se agrupa con los potexvirus: *Pitaya virus X* (PiVX), *Zygocactus virus X* (ZyVX), *Cactus virus X* (CVX), SchVX y *Opuntia virus X* (OpVX), en un clado altamente respaldado (Figura 9 y 10).

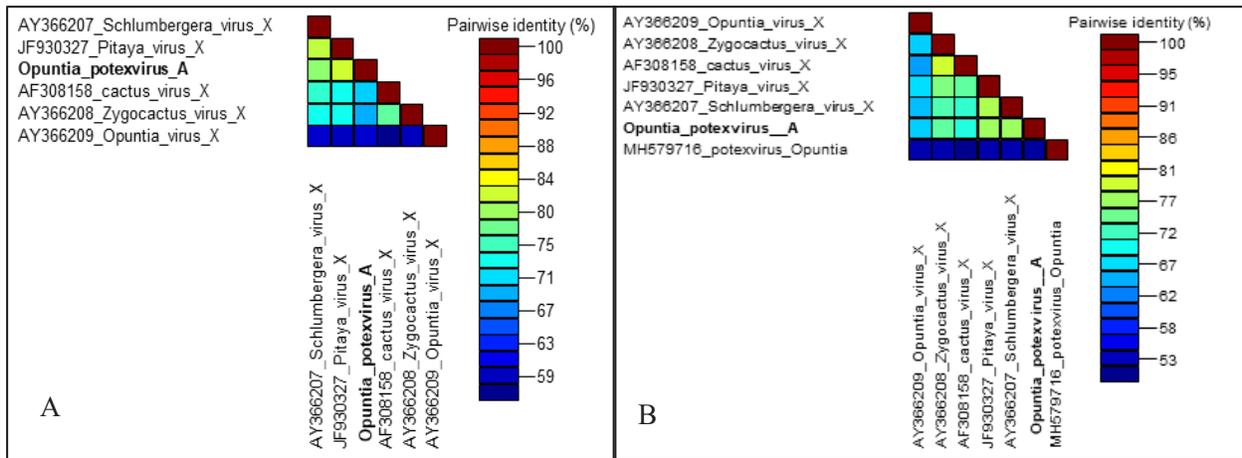


Figura 8. Matriz de identidad del porcentaje de aminoácidos de la cápside proteica (A) y la replicasa viral, (B) de las especies del género *Potexvirus* más cercanas al *Opuntia potexvirus A* (en negrita).

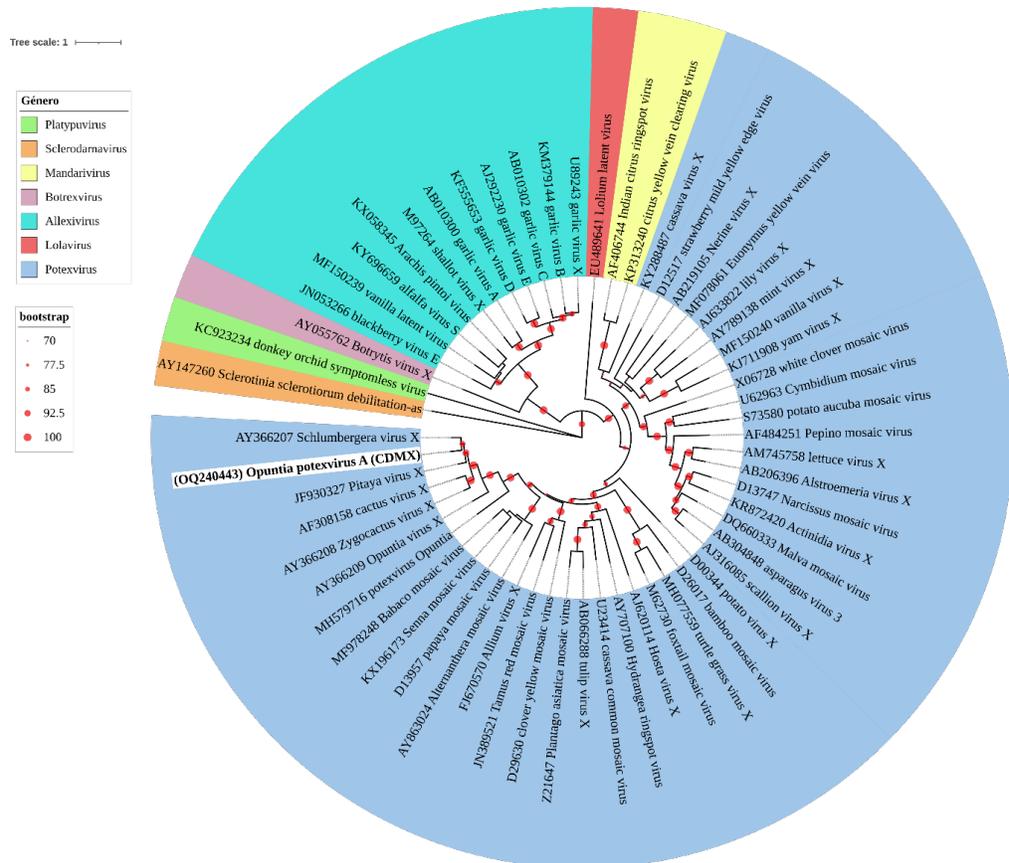


Figura 9. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de la familia *Alphaflexviridae* basado en las secuencias de aminoácidos de la replicasa viral; la secuencia del *Opuntia virus A* se encuentra en negrita. Los colores del árbol representan los diferentes géneros de esta familia. Los círculos en las ramas muestran valores de soporte UFBoot >70%.

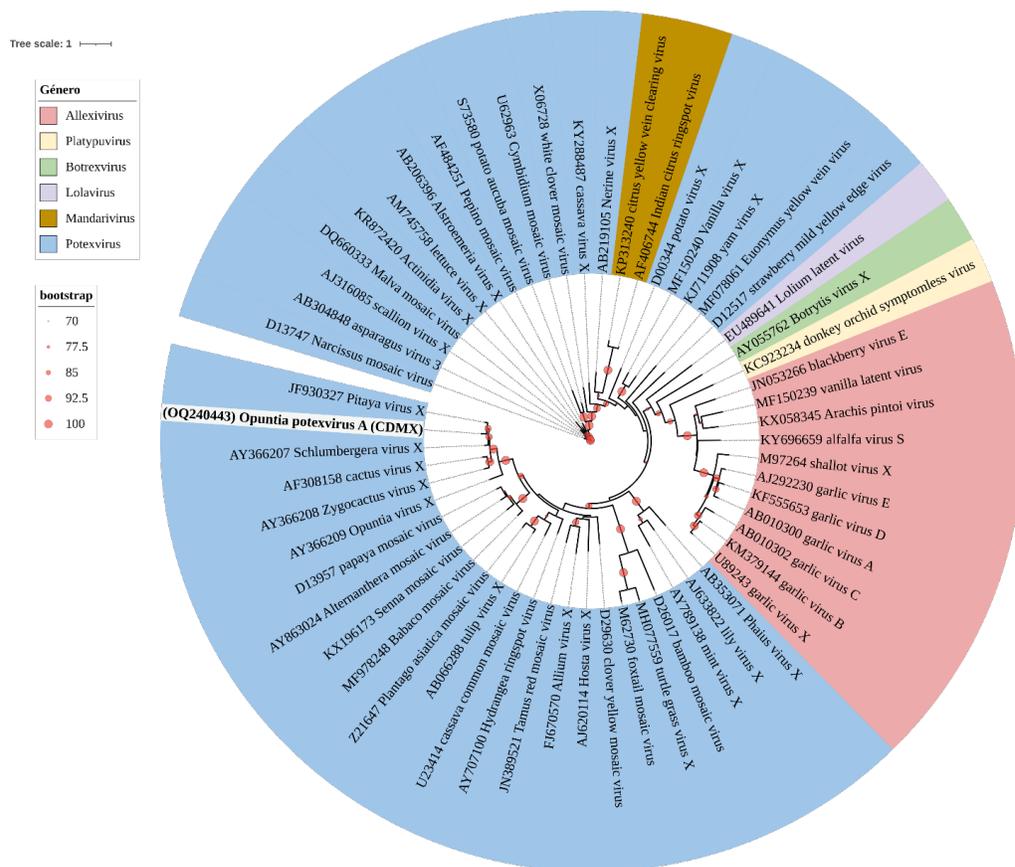


Figura 10. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de la familia Alphaflexiviridae basado en las secuencias de aminoácidos de la cápside proteica; la secuencia de Opuntia virus A se encuentra en negrita. Los colores del árbol representan los diferentes géneros de esta familia. Los círculos en las ramas muestran valores de soporte UFBoot > 70 %.

Opuntia viroid I. En la muestra CDMX-1 se encontró un contig similar al de los viroides de la familia *Pospiviroidae*, al cual se denominó “*Opuntia viroid I*” (Ovd-I). Los resultados del análisis BLASTn mostraron una similitud con *Columnnea latent viroid-B*, con 14 % de cobertura de consulta y un E value = 4e-08. Para determinar el género al que pertenece el Ovd-I, se realizó la inspección manual y curado de la secuencia. Se obtuvo un contig final de 412 pb con el cual se realizó un mapeo en los datos de HTS corroborando su presencia, con una cobertura promedio por nucleótido de 1,492X. La confirmación de Ovd-I se realizó por RT-PCR y secuenciación Sanger.

La predicción de la estructura secundaria del Ovd-I, mostró una molécula en forma de bastón con una región central conservada (CCR) (Figura 11), criterio principal para clasificar a un viroide como nuevo miembro de la familia *Pospiviroidae*. La presencia de la CCR y de una región conservada terminal (TCR) se tomaron en

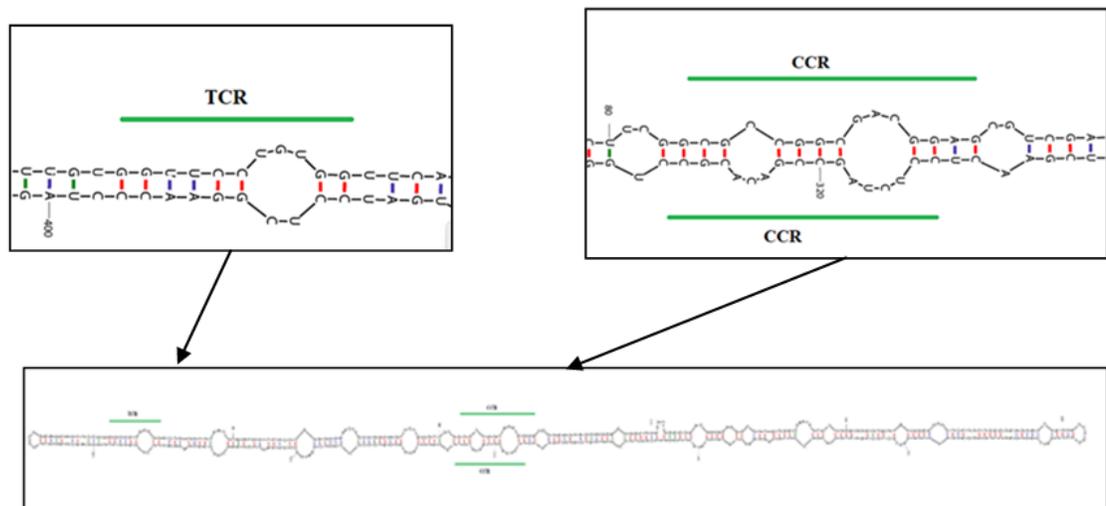


Figura 11. Estructura secundaria predicha utilizando el servidor web UNAFold (Herramienta UNAFold disponible online: www.mfold.org) para OVD-I. Se resaltan los sitios que forman la región conservada terminal (TCR) en las posiciones 16 a 26 y la región conservada central (CCR) en las posiciones 84 a 100 y 313 a 329.

cuenta para ubicar al OVD-I dentro del género *Apscaviroid* (Di Serio *et al.*, 2014). En la TCR no se detectaron cambios; sin embargo, en la CCR superior se detectaron cinco cambios (T/G, T/C, T/G, A/G, G/C) y en la CCR inferior se detectaron seis cambios (G/T, T/C, G/C, C/A, G/C, A/C) debidos probablemente a la divergencia del OVD-I con el género *Apscaviroid*.

Los resultados del análisis filogenético de Máxima Verosimilitud (Figura 12) ubicaron al OVD-I en el clado del género *Apscaviroid* de la familia *Pospiviroidae*. El análisis SDT, basado en comparaciones por pares, muestra que ninguna de las secuencias de viroides analizadas presenta más del 80 % de similitud con el genoma de OVD-I (Figura 13). Finalmente, OVD-I se detectó en las cuatro muestras independientes de la Ciudad de México y en una muestra de Morelos.

Otros virus detectados. Adicionalmente, en la muestra CDMX-1 se detectaron contigs virales adicionales (Cuadro 3). Sin embargo, solo se confirmó un caulimovirus y un vityvirus por RT-PCR. Por lo tanto, es necesario continuar con trabajos adicionales que permitan recuperar los genomas completos de estas potenciales nuevas especies de virus.

Detección de CCV-1. Se detectó en las cuatro entidades en estudio en el 72 % de muestras analizadas (Cuadro 4); se trata del primer reporte de la presencia de CCV-1 en plantaciones comerciales de nopal verdura en México.

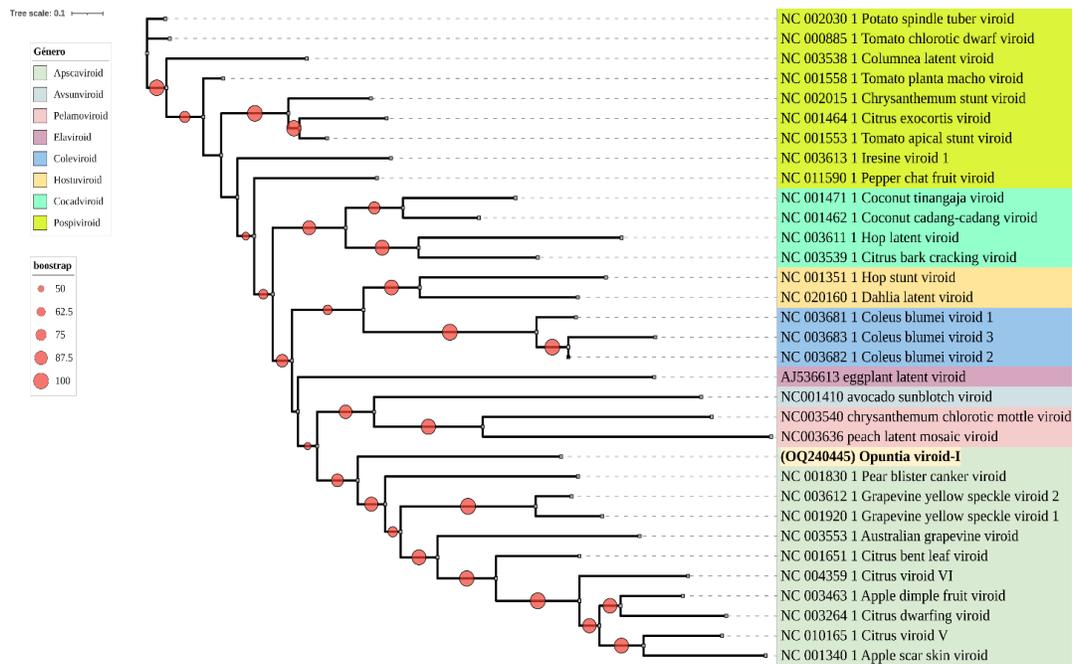


Figura 12. Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud de la familia *Pospiviroidae* y *Avsunviroidae* basado en secuencias de nucleótidos de genomas completos de las especies representativas de los diferentes géneros. La secuencia obtenida del Ovd-I se encuentra en negrita. Los diferentes colores representan los géneros de viroides. Los círculos en las ramas muestran valores de soporte UFBoot > 50 %.

Microscopía electrónica. En las muestras analizadas se observaron viriones de diferentes tamaños y formas (Figura 14). Se observaron partículas en forma de varilla rígida de aproximadamente 300 nm de longitud y 18 nm de diámetro, típicas de tobamovirus. Asimismo, se encontraron viriones en forma de varilla flexible, con una longitud promedio de 700 nm y 15 nm de diámetro, las cuales podrían pertenecer al CCV-1. También se observaron partículas virales flexibles de aproximadamente 500 nm de longitud.

DISCUSIÓN

En los últimos años, la secuenciación de alto rendimiento (HTS) ha permitido el descubrimiento de nuevas especies virales (Maliogka *et al.*, 2018; Villamor *et al.*, 2019), y con ello también se ha evidenciado la complejidad de los viromas (Al Rwahnih *et al.*, 2011; Vučurović *et al.*, 2021).

En México se han realizado investigaciones para conocer los virus asociados al nopal con síntomas putativos a virosis. Sin embargo, con el uso de técnicas

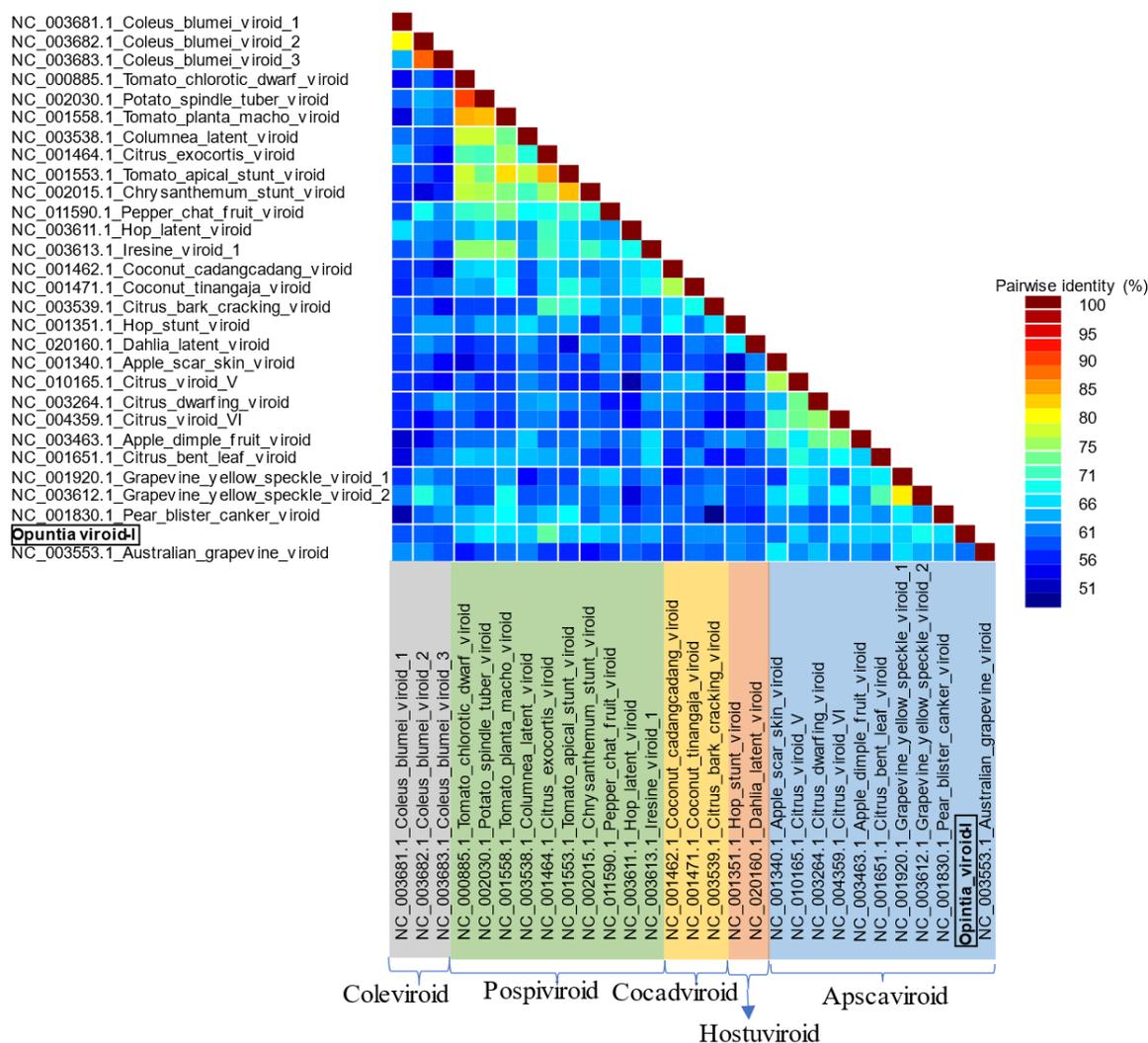


Figura 13. Distribución de frecuencia de identidades por pares obtenida con la herramienta de demarcación de secuencias SDT (Muhire *et al.*, 2014) a partir de secuencias de genomas completos de especies de la familia *Pospiviroidae* para respaldar la demarcación del *Opuntia viroid I*, como una nueva especie.

especies para este género (Jan *et al.*, 2020). Los potexvirus tienen partículas elongadas de aproximadamente 700 nm de longitud, infectan hospedantes herbáceos, no tienen vectores conocidos y se transmiten principalmente de manera mecánica (Jan *et al.*, 2020). Filogenéticamente el OPV-A se encuentra estrechamente relacionado con PiVX y SchVX que infectan naturalmente cactáceas (Figura 9 y 10).

Recientemente, en cactáceas ornamentales se reportaron los potexvirus CVX, OpVX, PiVX, SchVX y ZyVX, en infección única o mixta, de hasta cuatro de ellos (CVX, PiVX, SchVX y ZyVX) en una planta (Park *et al.*, 2021). Adicionalmente

Cuadro 3. Resultado del análisis Blastx de virus potencialmente presentes en la biblioteca CDMX-1 y confirmación por RT-PCR y secuenciación.

Virus	Longitud del contig	Número de acceso de la secuencia de referencia	Porcentaje de identidad (cobertura de consulta)	Parte del genoma	Confirmación por RT-PCR	Confirmación por secuenciación Sanger
Caulimovirus	3168	QYR69113.1	47.14 (51)	Putativa replicasa viral	+	+
Vityvirus	1242	AVL25840.1	52.21 (64)	Proteína de movimiento	+	+
Alphavirus	2932	QYD13417.1	75 (27)	Cápside proteica	-	-
Bammivirus	2110	UUL90866.1	39.75 (99)	Replicasa viral	-	-
Betaflexiviridae (Tymovirales)	1096	AZM69108.1	36.36 (52)	Proteína 1 del bloque de tres genes	-	-

+ = Positivo; - = Negativo

Cuadro 4. Detección de CCV-1 en cuatro estados productores de nopal verdura en México.

Estado	Muestras analizadas	Muestras positivas a CCV-1 (%)
Estado de México	24	22 (91)
Morelos	26	16 (64)
Hidalgo	24	10 (41)
CDMX	55	45 (81)
Total	129	93 (72)

convencionales como RT-PCR, ELISA, microscopía electrónica de transmisión e indexado biológico, en varias investigaciones no fue posible determinar al (los) virus asociado(s), debido a las características y limitaciones que presentan estas técnicas (De La Torre-Almaraz *et al.*, 2007; De La Torre-Almaraz *et al.*, 2016a; De La Torre-Almaraz *et al.*, 2016b; Alonso-Barrera *et al.*, 2015). Con el uso de HTS es posible determinar la presencia de todos los virus (conocidos o desconocidos) en una muestra, característica que otras técnicas no poseen. Así, por ejemplo, con esta técnica se logró la detección de un nuevo tobamovirus (OV2) en una muestra compuesta de ARN extraído de *O. ficus-indica* y *O. albicarpa* recolectadas en el Estado de México (Salgado-Ortíz *et al.*, 2020).

En este estudio se conoce por primera vez el viroma del nopal verdura cultivado en la zona centro de México, constituido por tres virus (dos nuevos, del género *Potexvirus* y *Carlavirus*) y un viroide (género *Apscaviroid*).

Opuntia potexvirus A (OPV-A) se propone como un nuevo miembro de la familia *Alphaflexiviridae*, género *Potexvirus*, con base en los criterios de demarcación de

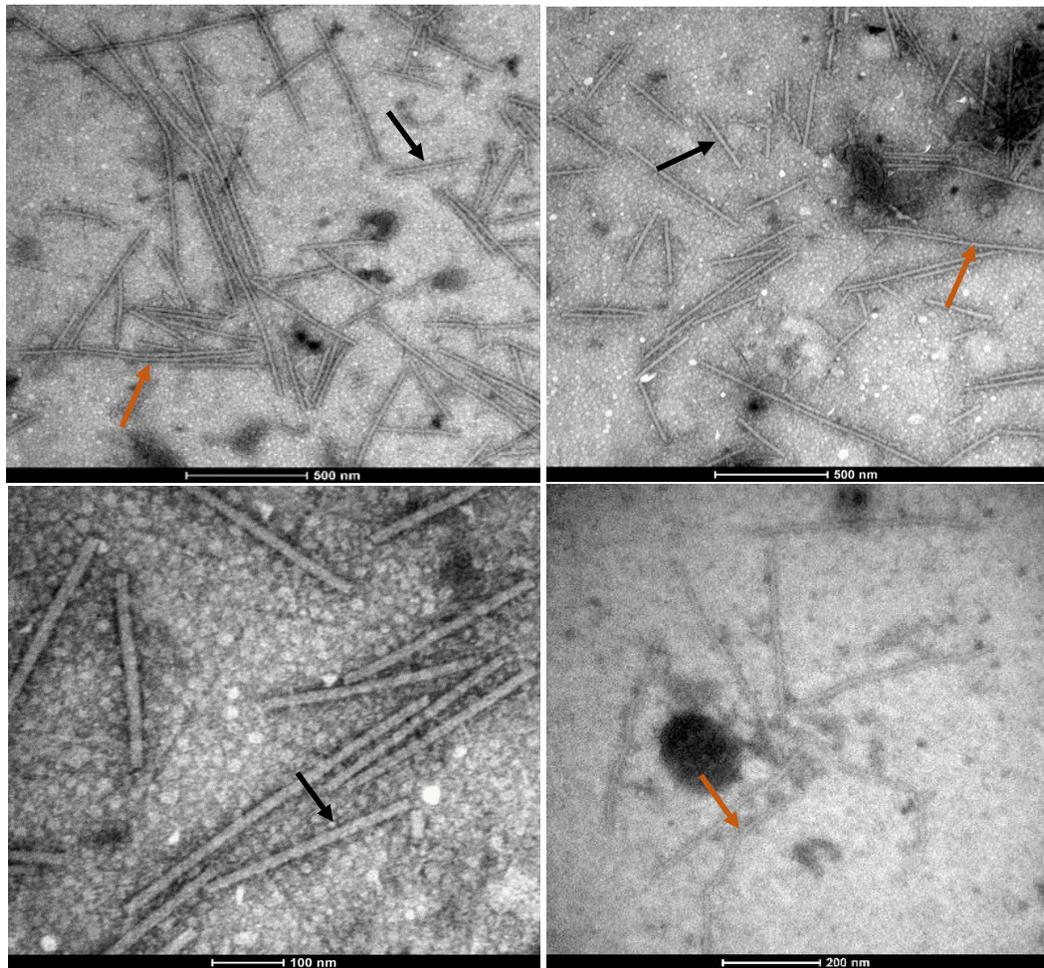


Figura 14. Partículas virales en forma de varilla rígida (→) y flexible (→) de diferentes longitudes observadas por microscopía electrónica de transmisión en plantas de nopal con patrones amarillos irregulares, anillos amarillos, mosaico y manchas cloróticas alrededor de las espinas, utilizando la técnica “leaf dip”.

se informó que la cactácea *Notocactus leninghausii f. cristatus*, puede estar coinfectada hasta con seis virus, cuatro potexvirus (CVX, PiVX, SchVX y ZyVX) y dos tobamovirus (CMMoV y RCNaV) (Park *et al.*, 2018). Estos reportes muestran que las cactáceas son hospedantes naturales de los potexvirus y tobamovirus. Sin embargo, los síntomas que causan de manera individual aún no se han descrito claramente ni se conoce su gama de hospedantes. Por lo anterior, en estudios posteriores tendrá que abordarse la caracterización biológica del potexvirus detectado en este estudio, para determinar, entre otras cosas, si representa un riesgo para la producción de nopal en México.

En el análisis de HTS, el CCV-1 se detectó en las muestras de la Ciudad de México y del Estado de México. Sin embargo, el genoma completo solo se recuperó en los cladodios recolectados en este último. La detección del genoma parcial en la muestra de la Ciudad de México, probablemente se deba a que el OPV-A y el OV2 suprimieron la replicación del CCV-1, por lo tanto, el número de secuencias obtenidas para este virus no cubrió la totalidad del genoma. El CCV-1 aislado del Estado de México, se agrupó en el mismo clado del aislamiento MK415316.1 reportado en Estados Unidos y una secuencia de México (KU854930.4) pero en una rama distinta. Este virus se detectó en las cuatro entidades muestreadas (Cuadro 4) tanto en plantas con síntomas de virosis como en plantas asintomáticas, en este último caso solamente en los estados de Hidalgo, Morelos y Ciudad de México. Se sabe que los carlavirus se transmiten por pulgones de forma no persistente, o por moscas blancas, infectan predominantemente plantas herbáceas y muchos de ellos causan infecciones latentes o asintomáticas, lo cual explicaría su detección en plantas de nopal que no presentaban alteraciones visibles (Kreuze *et al.*, 2012). Los virus CCV-1 y cactus carlavirus 2 (CC-2), se detectaron por primera vez en una planta asintomática del híbrido ‘Professor Ebert’ de *Epiphyllum* spp. (Peng *et al.*, 2019). Por lo tanto, en posteriores estudios, será necesario investigar el comportamiento biológico de ambos virus para determinar si bajo ciertas condiciones ambientales inducen algún síntoma en nopal y otras plantas de importancia económica. Asimismo, tendría que determinarse si constituyen un riesgo para la producción de nopal o algún otro cultivo.

El OV2 se reportó por primera vez en México en diferentes especies de cactáceas cultivadas (*O. ficus-indica* y *O. albicarpa*) y no cultivadas (*O. pilifera*, *O. depressa*, *O. tomentosa*, *O. robusta* y *O. streptacantha*) del Estado de México, Puebla y Ciudad de México (Salgado-Ortíz *et al.*, 2020). El género *Tobamovirus* se divide en siete grupos, de acuerdo con su hospedante natural, que incluye a las familias *Solanaceae*, *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Malvaceae*, *Cactaceae*, *Passifloraceae*, *Apocynaceae* y *Leguminosae* (Li *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2006). El análisis filogenético fue consistente con esta división, agrupando al OV2 en el clado de tobamovirus que infectan cactáceas (Figura 4). Otro tobamovirus reportado en México que infecta nopal es el *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV). Este virus se reportó en la zona de Axapusco, Otumba, y San Martín de las Pirámides, Estado de México en plantas de nopal que mostraban anillos amarillos pequeños, (De La Torre-Almaráz *et al.*, 2016a). Sin embargo, en este estudio no se detectó al RCNaV en ninguna de las muestras analizadas por HTS.

En la presente investigación se informa por primera vez a nivel mundial, la presencia de un viroide en nopal (OVd-I). Sin embargo, debido a que éste se encontró en muestras con infecciones mixtas con OV2, CCV-1 y OPV-A, se desconoce si provoca o no síntomas de manera individual.

Hasta ahora en México no existe una normatividad que regule el movimiento de material propagativo de nopal, por lo que existe el riesgo de la introducción de los virus y viroide encontrados en esta investigación a nuevas zonas productoras de esta especie.

CONCLUSIONES

El viroma del nopal verdura en cuatro zonas productoras del centro de México estuvo conformado por *Opuntia virus 2* (género *Tobamovirus*), *Cactus carlavirus 1* (Género *Carlavirus*), un nuevo virus cuyo nombre propuesto es *Opuntia potexvirus A* (Género *Potexvirus*) y un nuevo viroide que se propone nombrar *Opuntia viroid I* (Género *Apocavivirus*). *Cactus carlavirus 1* se encontró en los cuatro estados productores de nopal muestreados.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al primer autor para realizar sus estudios de doctorado. A los productores de nopal de los diferentes estados que dieron acceso a sus parcelas para la toma de muestras.

LITERATURA CITADA

- Adams MJ, Antoniw JF, Bar-Joseph M, Brunt AA, Candresse T, Foster G, Martelli GP, Milne RG and Fauquet CM. 2004. Virology Division News: The new plant virus family *Flexiviridae* and assessment of molecular criteria for species demarcation. Archives of Virology 149:1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0304-0>
- Al Rwahnih M, Daubert S, Úrbez-Torres JR, Cordero F and Rowhani A. 2011. Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. Archives of Virology 156:397-403. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-0869-8>
- Alonso-Barrera B, Mora-Aguilera G, Valdovinos-Ponce G, Ochoa-Martínez DL, Rodríguez-Leyva E, Tlapal-Bolaños B and De La Torre-Almaraz R. 2015. Asociación de un Potexvirus como agente causal de manchas cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. Mexican Journal of Phytopathology 33(1):75-86 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092015000100075&lng=es&tlng=es.
- Andrews S. 2010. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Barbera, GF, Carimi P, Inglese and M Panno. 1992. Physical, morphological and chemical changes during fruit development and ripening in three cultivars of prickly-pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller). Journal of Horticultural Science 67:307-312. <https://doi.org/10.1080/00221589.1992.11516253>
- Bravo H. 1978. Las Cactáceas de México. 2nd. ed. Vol. I. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 743 p.
- Chen J, Shi YH, Adams MJ and Chen JP. 2005. The complete sequence of the genomic RNA of an isolate of Lily virus X (genus *Potexvirus*). Archives of Virology 150:825–832. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0441-5>

- Chen S, Zhou Y, Chen Y and Gu J. 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics* 34 (17):i884-i890 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- De La Torre-Almaraz R, Salazar-Segura M and Ruiz-Medrano R. 2007. Ocurrencia de un tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41:763-773. <https://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v41n7/1405-3195-agro-41-07-763.pdf>
- De la Torre-Almaraz R, Salgado-Ortiz H, Salazar-Segura M, Pallas V, Sanchez-Navarro JA and Valverde RA. 2016a. First report of Schlumbergera virus X in prickly pear (*Opuntia ficus-indica*). *Plant Disease* 100:1799. <https://doi.org/10.1094/pdis-11-15-1326-pdn>
- De La Torre-Almaraz R, Salgado-Ortiz H, Salazar-Segura M, Pallás V, Sánchez-Navarro JA and Valverde RA. 2016b. First Report of Rattail cactus necrosis-associated virus in Prickly Pear Fruit (*Opuntia albicarpa Scheinvar*) in Mexico. *Plant Disease* 100:11. <https://doi.org/10.1094/pdis-04-16-0554-pdn>
- Di Serio F, Flores R, Verhoeven JTT, Li SF, Pallás V, Randles JW, Sano T, Vidalakis G and Owens RA. 2014. Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology* 159:3467–3478 <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6>
- Fontenele RS, Salywon AM, Majure LC, Cobb IN, Bhaskara A, Avalos-Calleros JA, Argüello-Astorga GR, Schmidlin K, Khalifeh A, Smith K, Schreck J, Lund MC, Köhler M, Wojciechowski MF, Hodgson WC, Puente-Martinez R, Van Doorslaer K, Kumari S, Vernière C, Filloux D, Roumagnac P, Lefevre P, Ribeiro SG, Kraberger S, Martin DP and Varsani A. 2020. A Novel Divergent Geminivirus Identified in Asymptomatic New World Cactaceae Plants. *Viruses* 12:398. <https://doi.org/10.3390/v12040398>
- Fontenele RS, Salywon AM, Majure LC, Cobb IN, Bhaskara A, Avalos-Calleros JA, Argüello-Astorga GR, Schmidlin K, Khalifeh A, Smith K, Schreck J, Lund MC, Köhler M, Wojciechowski MF, Hodgson WC, Puente-Martinez R, Van Doorslaer K, Kumari S, Oyeniran KA, Vernière C, Filloux D, Roumagnac P, Lefevre P, Ribeiro SG, Kraberger SP, Martin DP and Varsani A. 2021. New World Cactaceae Plants Harbor Diverse Geminiviruses. *Viruses* 13(4):694. <https://doi.org/10.3390/v13040694>
- Griffith MP. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91:1915-1921. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1915>
- Jan FK, Vaira AM, Menzel W, Candresse T, Zavriev SK, Hammond J, Ryu KH and ICTV Report Consortium. 2020. ICTV Virus Taxonomy Profile: Alphaflexiviridae. *Journal of General Virology* 101:699–700. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001436>
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, Haeseler AV and Jermini LS. 2017. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods* 14:587-589. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4285>
- Katoh, Rozewicki J and Yamada KD. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief in Bioinformatics* 20:1160-1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kreuze JF, Vaira AM, Menzel W, Candresse T, Zavriev SK, Hammond J, Ryu KH and ICTV Report Consortium. 2020. ICTV virus taxonomy profile: Alphaflexiviridae. *Journal of General Virology* 101:699–700. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001436>
- Lan P, Tian T, Pu L, Rao W, Li F and Li R. 2019. Characterization, and detection of a new badnavirus infecting *Epiphyllum* spp. *Archives of Virology* 164:1837–1841. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04237-6>
- Langmead B and Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9(4): 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Letunic I and Bork P. 2021. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation, *Nucleic Acids Research* 49: W293–W296 <https://doi.org/10.1093/nar/gkab301>
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G and Durbin R. 2009. “The Sequence Alignment/Map format and SAMtools.” *En: Bioinformatics (Oxford, England)* 25:16 2078-9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li Y, Wang Y, Hu J, Xiao L, Tan G, Lan P, Liu Y and Li F. 2017. The complete genome sequence, occurrence and host range of tomato mottle mosaic virus Chinese isolate. *Virology Journal* 14:1–9. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0676-2>
- Maliogka V, Minafra A, Saldarelli P, Ruiz-García A, Glasa M, Katis N and Olmos A. 2018. Recent Advances on Detection and Characterization of Fruit Tree Viruses Using High-Throughput Sequencing Technologies. *Viruses* 10:436. <https://doi.org/10.3390/v10080436>
- Martelli GP, Adams MJ, Kreuze JF and Dolja VV. 2007. Family Flexiviridae: A Case Study in Virion and Genome Plasticity. *Annual Review of Phytopathology* 45:73–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.45.062806.094401>

- Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, Haeseler AVR and Lanfear. 2020. IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol Biol Evol* 37:1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
- Muhire BM, Varsani A and Martin DP. 2014. SDT: A virus classification tool based on pairwise sequence alignment and identity calculation. *PLoS one* 9(9):e108277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108277>
- Okonechnikov K, Conesa A and García-Alcalde F. 2016. Qualimap 2: advanced multisample quality control for high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(2):292–294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv566>
- Park CH, Song EG and Ryu KH. 2018. Detection of co-infection of *Notocactus leninghausii* f. *cristatus* with six virus species in South Korea. *The Plant Pathology Journal* 34:65-70. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.08.2017.0187>
- Park CH, Song EG and Ryu KH. 2021. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of five potexviruses infecting cactus plants using dual-priming oligonucleotides (DPOs) primers. *Journal of Virological Methods* 298:114280. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2021.114280>
- Peng L, Wu L, Grinstead SC, Kinard GR and Li R. 2019. Molecular characterization and detection of two novel carlaviruses infecting cactus. *Archives of Virology* 164:1873–1876. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04279-w>
- Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A and Korobeynikov A. 2020. Using SPAdes de novo assembler. *Curr Protoc Bioinformatics* 70(1):e102. <https://doi.org/10.1002/cpbi.102>
- Salgado-Ortíz H, De La Torre-Almaraz R, Sánchez-Navarro J and Pallás V. 2020 Identification and genomic characterization of a novel tobamovirus from prickly pear cactus. *Archives of Virology* 165:781–784 <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04528-3>
- Sastry KS, Mandal B, Hammond J, Scott SW and Briddon RW. 2019. *Narcissus* spp. (Daffodil). In: *Encyclopedia of plant viruses and viroids*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3912-3_608
- SIAP. 2022. Avance agrícola. https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/. (Consultado el 1 de noviembre del 2022).
- Song YS, Min BE, Hong JS, Rhie MJ, Kim MJ and Ryu KH. 2006. Molecular evidence supporting the confirmation of Maracuja mosaic virus as a species of the genus *Tobamovirus* and production of an infectious cDNA transcript. *Archives of Virology* 151:2337–2348. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0823-y>
- Thorvaldsdóttir He, Robinson JT and Mesirov JP. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics* 14:2,78–192 <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>
- Van der Vlugt RA and Berendsen M. 2002. Development of a General Potexvirus Detection Method. *European Journal of Plant Pathology* 108:367–371. <https://doi.org/10.1023/A:1015644409484>
- Villamor DEV, Ho T, Al Rwahnih M, Martin RR and Tzanetakis IE. 2019. High throughput sequencing for plant virus detection and discovery. *Phytopathology* 109:716–725. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0257-RVW>
- Vučurović A, Kutnjak D, Mehle N, Stanković I, Pecman A, Bulajić A, Krstić B and Ravnikar M. 2021. Detection of four new tomato viruses in Serbia using post hoc high-throughput sequencing analysis of samples from a large-scale field survey. *Plant Disease* 105:2325–2332. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1915-RE>
- Zheng L, Cao M, Wu L, Liu H, Chen M and Li R. 2020. First identification and molecular characterization of a novel cavemovirus infecting *Epiphyllum* spp. *Archives of Virology* 165:2083–2086. [https://doi.org/10.1093/nar/gkg595](https://doi.org/10.1007/s00705-020-04688Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. <i>Nucleic Acids Research</i> 31:3406–3415. <a href=)