



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA



MAESTRIA EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO EN *Opuntia sp.* Y SU ASOCIACIÓN CON FITOPLASMAS Y NUTRICIÓN DEL CULTIVO

Tesis

Que como requisito parcial para obtener el grado de Maestro En Ciencias en
Protección Vegetal

Presenta:

Samuel Tetla Solano

Bajo la supervisión de:

Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

Dr. Mateo Vargas Hernández

Dr. Santos Gerardo Leyva Mir



APROBADA



Chapingo, Estado de México, mayo del 2022



**ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO EN OPUNTIA SP. Y SU
ASOCIACIÓN CON FITOPLASMAS Y NUTRICIÓN DEL
CULTIVO**

Tesis realizada por Samuel Tetla Solano, bajo la supervisión del comité asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL

DIRECTORA:



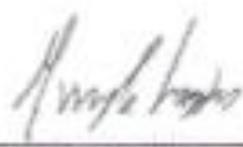
DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



DR. MATEO VARGAS HERNÁNDEZ

ASESOR:



DR. SANTOS GERARDO LEYVA MIR

DEDICATORIAS

A mis padres: Luciano Tetla Zapotitla y Gloria Solano Fonseca, quienes con tanta dedicación, sabiduría, tiempo, paciencia y fortaleza han logrado impulsar y convertirme en una persona capaz y funcional en todo ámbito.

A mi hermana: Citlali Saraí Tetla Solano quien con su apoyo, tiempo, constancia y perseverancia incentivan en mí la creación de un mejor ser humano.

A mis sobrinos Ian y Emily quienes en el breve tiempo con nosotros hacen pasar momentos perdurables y llenos de alegría.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Universidad Autónoma Chapingo y a la Maestría en Ciencias en Protección Vegetal por proporcionar las herramientas y así poder formarme profesionalmente y concluir con el posgrado.

Este trabajo tiene el propósito de contribuir a los PRONACES, principalmente a la Soberanía Alimentaria y a la Conservación del Medio Ambiente.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por brindarme de su tiempo, conocimientos en biología molecular; además de su paciencia, disciplina, vocación y disposición que me han permitido culminar esta etapa de mi formación.

Al Dr. Mateo Vargas Hernández por los ánimos, disponibilidad y conocimientos estadísticos en este periodo académico.

Al Dr. Santos Gerardo Leyva Myr por su tiempo y conocimientos en fitopatología otorgados.

Al Dr. Joel Pineda Pineda por sus conocimientos, tiempo y disposición brindada en nutrición vegetal.

Al M. C. Antonio Segura Miranda, por su tiempo y colaboración en la resolución de problemas de índole académico y en la coordinación del posgrado.

Al Comité de Sanidad Vegetal del Estado de México (CESAVEM) por el apoyo brindado con los productores. Y de manera particular al Ing. Fernando Ignacio Nájera Mendoza por su disposición, tiempo, transmisión de conocimientos, amistad y coordinación con productores de la región productora de Nopal tunero.

A mi familia (Luciano T. Z., Gloria S. F., Citlali S. T. S.), los cuales me han permitido formarme como persona y académicamente. Con su apoyo constante, consejos, valores y acciones han logrado permitirme culminar múltiples proyectos personales.

A mis compañeros y amigos (Alfredo L. Z., Iván G. K., Uriel. A. G., Susana G. G., Xóchitl A. H. R., Wendolyn V. S., Carmen M. A. A., Karina S. Y. P., Isaac S. B. A., Fidel P. M. R.) quienes han estado incondicionalmente en momentos importantes de mi vida con paciencia, risas y consejos. Así mismo, a Yaritzi M. R. quien ha estado presente con ánimos, consejos, paciencia, ayuda, comprensión y cariño en situaciones difíciles.

DATOS BIOGRAFICOS

Datos personales

Nombre: Samuel Tetla Solano

Fecha de nacimiento: 21 de diciembre de 1993

Lugar de nacimiento: Cuautla Morelos

CURP: TESS931221HMSTLM01

Profesión: Ingeniero Agrónomo Fitotecnista

Cedula Profesional: 10963468



FORMACIÓN ACADÉMICA PROFESIONAL

Comenzó sus estudios profesionales del 2012 al 2017 en el Centro de Estudios Profesionales-Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero se graduó en 2016, como ingeniero agrónomo con el título “Manejo del cultivo de papayo en tres sistemas de producción” realizada en el Centro de Estudios Profesionales-Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Laboró como personal técnico en el laboratorio de pruebas de efectividad biológica (IDAGRO) de 2018 a 2019 en Tlayacapan, Morelos. En el 2019 desempeñó funciones como asistente de fitopatología en el laboratorio de semillas perteneciente al Colegio de Posgraduados en Montecillos, Estado de México. En 2020 ingreso a la Maestría en Ciencia en Protección Vegetal para continuar su formación académica.

CONTENIDO

DEDICATORIAS	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DATOS BIOGRAFICOS	iv
CONTENIDO	v
ÍNDICE DE CUADROS EN EL TEXTO.....	viii
INDICE DE FIGURAS EN EL TEXTO.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS EN EL APENDICE	x
ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APÉNDICE	xi
RESUMEN GENERAL.....	1
GENERAL ABSTRACT	2
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL, IMPORTANCIA DE <i>Opuntia ficus-indica</i> Y FACTORES QUE LIMITAN SU PRODUCTIVIDAD	3
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos	5
CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA, IMPORTANCIA DE <i>Opuntia ficus-indica</i>, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO	5
Importancia del nopal	5
Taxonomía	6
Botánica	7
Principales cultivares.....	8
Principales plagas	8
Principales enfermedades.....	9

Engrosamiento del cladodio	10
a) Fitoplasmas.....	10
b) Virus Tobacco bushy top.....	12
Identificación molecular	12
PCR.....	13
PCR-RFLPs	15
PCR anidada.....	16
Secuenciación.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
Recolecta del material vegetal.....	18
Trasplante.....	20
Establecimiento en invernadero.....	21
Descripción de los tratamientos.....	22
Variables en estudio en invernadero	23
Peso.....	23
Largo y ancho	23
Grosor del cladodio	23
Emisión de brotes	24
Identificación molecular	24
Extracción de DNA.....	25
Determinación de la cantidad y calidad del DNA	26
PCR.....	26
PCR anidada.....	28
Secuenciación.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Resultados para las variables evaluadas en invernadero en función del tiempo.	30

Resultados de los efectos de los tratamientos para las variables evaluadas en invernadero.....	30
Discusión para la variable Peso de cladodios	31
Discusión para la variable Largo de cladodios	33
Discusión para la variable Ancho de cladodios	34
Discusión para la variable Grosor de cladodios	35
Número de brotes emitidos a los 90 días	36
Identificación molecular	42
Integridad de ADN extraído.....	42
PCR.....	42
PCR Anidada	43
Secuenciación.....	45
CONCLUSIONES	46
LITERATURA CITADA.....	47
CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN NOPAL TUNERO CON Y SIN SÍNTOMAS DE ENGROSAMIENTO EN EL VALLE DE MÉXICO.	55
APÉNDICE.....	66
Procesamiento de las muestras a liofilizar.....	66
Protocolo para llevar a cabo la lectura con el Nanodrop	67
Determinación de humedad requerida en el periodo de diciembre a enero	67
Determinación de cantidad e intervalos de riego con base a peso durante el periodo de diciembre a enero.	68
Origen del agua utilizada en el trabajo de investigación.....	70
Cálculo de la solución nutritiva para nopal tunero	71
VII. LITERATURA CITADA.....	86

ÍNDICE DE CUADROS EN EL TEXTO

Cuadro 1. Taxonomía del nopal	6
Cuadro 2. Listado de <i>Candidatus phytoplasma</i> descritos al 2020.	11
Cuadro 3. Microorganismos detectados en nopal y otras cactáceas mediante análisis moleculares	15
Cuadro 4. Tratamientos en estudio	22
Cuadro 5. Sitio de recolecta y cantidad de muestras seleccionadas para identificación molecular	25
Cuadro 6. Composición de la máster mix utilizada en la amplificación con PCR .	27
Cuadro 7. Valores promedio de las variables Peso, Largo, Ancho y Grosor a los 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación en cada tratamiento.	30
Cuadro 8. Valores promedio de los tratamientos a través de las tres fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación; para las variables Peso, Largo, Ancho y Grosor de cladodio.	31
Cuadro 9. Comportamiento de los tratamientos (1, 2, 3 y 4) a los 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos.	38
Cuadro 10. Comportamiento de los tratamientos (5, 6, 7 y 8) a los 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos.	39
Cuadro 11. Lecturas realizadas para la determinación de calidad en el espectrofotómetro en muestras de DNA de cladodios de Opuntia.	42

INDICE DE FIGURAS EN EL TEXTO

Figura 1. Nopal con engrosamiento del cladodio.....	10
Figura 2. Frutos en cara lateral en plantas con engrosamiento.....	10
Figura 3. Proceso de la reacción en cadena de la polimerasa	14
Figura 4. Representación de la PCR anidada	16
Figura 5. Proceso de secuenciación.....	17
Figura 6. <i>Opuntia ficus-indica</i> cultivar Alfajayucan.	18
Figura 7. Primer sitio de recolecta; Temascalapa, Estado de México	19
Figura 8. Segundo sitio de recolecta: Teotihuacan de Arista, Estado de México .	19
Figura 9. Tercer sitio de recolecta: San Martín de las Pirámides, Estado de México.	20
Figura 10. Cladodio con síntomas de engrosamiento	20
Figura 11. Cladodios recolectados y clasificados con base a síntomas y lugar de recolección	20
Figura 12. a) preparación del sustrato, b) llenado de bolsas con sustrato, c) peso de nopales y d) trasplante de cladodios recolectados.....	21
Figura 13. Distribución y claves de los tratamientos en el invernadero.	21

Figura 16. Zonas de los cladodios del nopal en donde se midieron las características peso, largo, ancho y grosor.	24
Figura 17. Procedimiento para la extracción de DNA; A) Etiquetado de muestras, B) macerado y C) recuperación del pellet	25
Figura 18. Programa utilizado en la amplificación con los primers P1 y P7 para PCR	27
Figura 19. Programa utilizado en la PCR anidada con los primeros R16F2/R16R2	28
Figura 20. Valores promedio a través de las tres evaluaciones: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación. Peso de cladodios de nopal tunero cultivar Alfajayucan evaluadas en condiciones de invernadero (1. Plantas sanas + SN al 50 %; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2, Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua	33
Figura 21. Valores promedio a través de las tres fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación. Largo de nopal tunero cultivar Alfajayucan evaluadas en condiciones de invernadero (1. Plantas sanas + SN al 50 %; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2, Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua).	34
Figura 22. Valores promedio a través de las tres fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación. Ancho de cladodios de nopal tunero cultivar Alfajayucan evaluadas en condiciones de invernadero (1. Plantas sanas + SN al 50 %; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2, Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua).....	35
Figura 23. Valores promedio a través de las tres fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación. Ancho de nopal tunero cultivar Alfajayucan evaluadas en condiciones de invernadero (1. Plantas sanas + SN al 50 %; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2, Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua.....	36
Figura 24. Comparación porcentual de brotes totales emitidos a los 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos (1. Plantas sanas + SN al 50 %; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2, Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺ 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua) al cultivo de nopal tunero.	37

Figura 25. Síntomas de engrosamiento en el tratamiento 5 (Plantas enfermas +SN al 50%); Brotes dobles y el cladodio señalado presenta una ligera distorsión en la parte apical del brote.	40
Figura 26. Síntomas de engrosamiento en el tratamiento 6 (Plantas enfermas +SN al 100%); A). Aparición de brote curvado en cara lateral del cladodio, B) Cladodio curvado y C) Cladodios con brotes dobles.	40
Figura 27. Síntomas de engrosamiento en el tratamiento 7 (SN al 100% con 400 ppm de Ca ²⁺); A) Deformación de cladodio, B) Acorazonamiento del brote, C) Gravitropismo positivo en el brote y D) Deformación de brotes.	41
Figura 28. Amplificaciones en 44 muestras de cladodios con los primers P1 y P7 en gel de agarosa al 1.5 %.	43
Figura 29. Amplificación anidada en muestras de cladodios con los primers R16F2/R16R2 en gel de agarosa al 1.5 %. en donde se muestra un fragmento de aproximadamente 1200 pb y que corresponde a la presencia de fitoplasmas.	44
Figura 30. Búsqueda de secuencias en la base de datos del National Center of Biotechnology information (NCBI).	45

ÍNDICE DE CUADROS EN EL APENDICE

Cuadro 1. Solución nutritiva original y ajustada para nopal tunero	71
Cuadro 2. Solución nutritiva al 100 % para nopal en Meq. L ⁻¹ utilizando el agua proveniente del pozo “El Yucateco” de la UACH.....	72
Cuadro 3. Diferencia entre cationes y aniones	72
Cuadro 4. Ajuste de iónico de la SN para el cultivo de nopal.	73
Cuadro 5. Balance iónico para la SN de nopal tunero. Y cantidad de las fuentes nutrimentales.....	73
Cuadro 6. Cantidades aportadas por un producto (Quelato) y cantidad necesaria de micronutrientes para la SN de nopal tunero al 100 %	74
Cuadro 7. Cálculo de micronutrientes para la SN de nopal tunero al 100%.....	75
Cuadro 8. Fuentes de fertilización, ácidos y micronutrientes utilizados para la solución de nopal tunero en diferentes concentraciones (Almaguer, 2014)	77
Cuadro 9. Sitio de recolección, clave en el invernadero y peso inicial al momento del trasplante.....	78
Cuadro 10. Brotes contabilizados a partir de la aparición del primer brote	80
Cuadro 11. Cuantificación de brotes, así como largo y ancho de los mismos.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APÉNDICE

Figura 1. Clasificación de cladodios recolectados con base al sitio de recolección	66
Figura 2. Procesamiento de muestras para liofilización; A) Pesado de las muestras, B) Almacenamiento en refrigeración para su conservación y C) Sitio donde se liofilizaron las muestras.	66
Figura 3. Calendarización de los tratamientos a partir de la primera aplicación (30 de enero del 2022), hasta el mes de agosto del 2022.....	68
Figura 4. Distribución de plantas monitoreadas para realizar la determinación de humedad en 19 días de diciembre y enero.	69
Figura 4. Localización del pozo “El Yucateco” que abastece a los invernaderos en dónde se encuentra establecida el trabajo de investigación.	70

RESUMEN GENERAL

El cultivo de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) para México es de gran importancia debido a que representa una alternativa de producción en zonas áridas con poca disponibilidad hídrica y suelos de mala calidad. El estado de México es el principal productor de tuna a nivel nacional, sobresaliendo entre los demás cultivares el Alfajayucan, debido a que presenta una buena aceptación ante los consumidores por su sabor dulce, pocas semillas y menos dificultad al momento de su cosecha. No obstante, este cultivar presenta mayor susceptibilidad a la enfermedad conocida como engrosamiento del cladodio. Esta enfermedad se manifiesta con un engrosamiento en cladodios, amarillamiento, disminución de crecimiento y producción de frutos pequeños e insípidos en las caras laterales de los cladodios. El engrosamiento ha sido asociado a fitoplasmas y virus desde hace más de tres décadas. A pesar de esto, no se ha logrado hacer la determinación del agente causal biótico. Para aportar más información referente a este problema, el objetivo del presente estudio fue muestrear de manera dirigida plantas de nopal tunero variedad Alfajayucan con y sin síntomas de engrosamiento en la zona de Teotihuacan, estado de México, para determinar la presencia de fitoplasmas. Paralelamente se estableció un experimento en invernadero para evaluar la posibilidad de que dicha alteración pudiera ser causada por la desnutrición que generalmente se observa en estos cultivos; y en donde se evaluaron diferentes soluciones nutritivas. Los resultados indicaron que 31% de las plantas sanas y 13% de las engrosadas resultaron positivas para *Candidatus Phytoplasma*. La solución nutritiva al 100% adicionada con 400 ppm de calcio indica un fenotipo sano en ambos tipos de plantas.

GENERAL ABSTRACT

The cultivation of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico is important because it represents an alternative production way in arid zones with little water availability and poor-quality soils. The state of Mexico is the main producer of prickly pear at the national level, standing out among the other cultivars the Alfajayucan cultivar because it is well accepted by consumers for its sweet flavor, few seeds, and less difficulty at harvest time. However, this cultivar is susceptible to the disease known as cladode thickening. This disease manifests itself with a thickening in cladodes, yellowing, decreased growth, and production of small and insipid fruits on their lateral faces. Thickening has been associated with Phytoplasmas and viruses for more than three decades. Despite this, it has not been possible to determine the biotic causal agent. In order to provide more information regarding this problem, the objective of this study was to sample Prickly pear plants of the Alfajayucan variety with and without symptoms of thickening in the Teotihuacan area, State of Mexico, to determine the presence of phytoplasmas. At the same time, a greenhouse experiment was established to evaluate the possibility that this alteration could be caused by the bad cultural practices that are generally observed in these crops; and where different nutritional solutions were evaluated. The results indicated that 31% of the healthy plants and 13% of the thickened ones were positive for *Candidatus Phytoplasma*. Nutritive solution at 100% added with 400 ppm calcium indicates a healthy phenotype in both types of plants.

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL, IMPORTANCIA DE *Opuntia ficus-indica* Y FACTORES QUE LIMITAN SU PRODUCTIVIDAD

Chapter I GENERAL INTRODUCTION, IMPORTANCE OF *Opuntia ficus-indica*, FACTORS THAT LIMIT ITS PRODUCTIVITY

El cultivo de nopal en México es de gran relevancia gastronómica, social, cultural y económica. Esta cactácea es cultivada en diferentes entidades del país por su gran adaptabilidad a condiciones extremas de temperatura y humedad; se cultiva con fines diversos tales como; producción de forraje, frutos, verdura y ornato.

Este cultivo es sin duda de gran relevancia para México encontrándose dentro de los símbolos que nos proporcionan identidad cómo mexicanos. Fray Bernardino de Sahagún fue un historiador que en 1620 describió las bondades de esta planta cuyos frutos y hojas eran consumidos por los pobladores con cotidianeidad (Sáenz, 2006). Hoy en día continúa formando parte de la dieta mexicana debido a que contiene un gran valor nutricional; el nopal verdura aporta proteína, grasa, fibra y cenizas, comparable con el contenido nutricional de espinacas y lechuga. Mientras que los frutos son fuente de proteína, grasas, fibra, azúcares, vitaminas y minerales tales como el calcio, fósforo, potasio, hierro y magnesio. Además, este cultivo tiene un gran potencial para ser utilizado por la industria alimenticia (cómo bebidas, botanas, mermeladas, etc.), cosmética (shampoos, cremas, lociones, etc.) y para la generación de energía como el biogás (SAGARPA, 2015).

En el aspecto económico el valor de la producción nacional de nopal (verdura y tunero) durante el cierre agrícola 2020, fue de \$ 3,719,577,940.00 lo que representa el 0.58 % de la producción agrícola nacional. Siendo la producción de nopal verdura la que abarcó el 57.1 % de la producción nacional de nopal en 12, 471.73 hectáreas cosechadas en 27 entidades federativas. Por otro lado, el 42.9% restante fue de tuna; la cual fue producida en 16 estados de la república con una superficie cosechada de 43,393.4 ha (SIAP, 2020). Con estas cifras se aprecia que las utilidades generadas por hectárea en la producción de nopal tunero es apenas un 21.58% en comparación con las utilidades obtenidas con el cultivo de nopal verdura. La producción de tuna, aunque menos rentable continúa siendo sustento de cientos de familias mexicanas que se enfrentan a problemas de diferente origen [biótico

(plagas y enfermedades) y abiótico (mala nutrición del cultivo, cambio climático, falta de transferencia de tecnología, mal manejo del cultivo, intermediarios y la volatilidad de los precios de mercado)] los cuales repercuten de manera directa en el rendimiento del cultivo. La tuna más producida en México es el cultivar Alfajayucan, seguido por la Tuna criolla, Tuna roja, Blanca cristalina, Amarilla, Blanca burrona, Pico chulo y Xoconostle (SIAP, 2020). Sin embargo, el cultivar Alfajayucan presenta mayor susceptibilidad a la enfermedad conocida como engrosamiento del cladodio. Esta enfermedad se caracteriza por presentar un amarillamiento en la planta, reducción gradual en el tamaño del fruto y del cladodio, seguido del engrosamiento de éste y la disminución de la producción (Gallegos et al., 2013; CESAVEM, 2013). Pimienta (1990) realizó el primer reporte sugiriendo que el engrosamiento del cladodio era causado por fitoplasmas. Sin embargo, en otras investigaciones se ha reportado que esta sintomatología también puede ser ocasionada por virus presentes en los cladodios enfermos. Así como la presencia de fitoplasmas, la detección de virus se ha determinado con identificación molecular (Bertaccini et al., 2007; Fucikovsky et al., 2011; Suaste-Dzul et al., 2011 y Felker et al., 2019). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha identificado el agente causal responsable de la sintomatología mencionada, debido probablemente a la dificultad de comprobar los Postulados de Koch en este cultivo que es de lento desarrollo. Por otro lado, se ha observado que cuando las plantas de nopal están bajo condiciones de estrés debido al incremento de temperatura, estrés hídrico, pero sobre todo con mala nutrición, etc., pueden presentar síntomas de engrosamiento (Valadez et al. 2021). No obstante, no se ha prestado la suficiente atención en los aspectos nutricionales requeridos por el cultivo que determinen si existe una correlación entre la presencia de la enfermedad y un déficit nutrimental.

Objetivo general

Distinguir plantas sanas y con síntomas de engrosamiento a través de la detección molecular de Fitoplasmas asociados a la enfermedad del engrosamiento del cladodio del nopal.

Objetivos específicos

- Identificar molecularmente Fitoplasmas asociados al engrosamiento del cladodio en el cultivo de nopal tunero cultivar Alfajayucan.
- Determinar si existe correlación entre los niveles de fertilización y la manifestación de síntomas del engrosamiento del cladodio en el cultivo de nopal tunero cultivar Alfajayucan.

CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA, IMPORTANCIA DE *Opuntia ficus-indica*, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL ENGROSAMIENTO DEL CLADODIO

Importancia del nopal

El nopal es una planta suculenta y perenne con alturas variables de entre 1.5 y 3 metros, con tallos aplanados y fotosintéticamente activos en la cual las hojas están modificadas en forma de espina que le confieren una ventaja adaptativa al evaporar menor cantidad de agua. Este grupo de plantas presenta un tipo de metabolismo conocido como Metabolismo ácido de las crasuláceas, en donde la apertura estomática se realiza durante la noche con la cual las plantas absorben y almacenan el dióxido de carbono (fase oscura); reduciendo así la evapotranspiración. Mientras

que la fotosíntesis (fase luminosa) es llevada a cabo durante el día (Andrade et., al 2007). Así mismo, su reproducción puede ser por semilla o de manera vegetativa (asexual) a partir del tallo (Arango, 2018). Las características antes mencionadas han permitido que este cultivo pueda adaptarse y desarrollarse en nichos ecológicos con baja disponibilidad de agua, temperaturas extremas y suelos de mala calidad no aptos para muchos otros cultivos. Esta planta es originaria del continente americano con una amplia distribución que va desde Canadá hasta la Patagonia Argentina (Guzman y Chávez, 2007).

Para México esta cactácea es de gran relevancia puesto que es una alternativa de producción en zonas áridas y semiáridas, de las cuales nuestro país cuenta con un 41.2% (CONAZA, 2018). Dadas las bondades de este cultivo en México, se ha empleado de manera integral en diversas áreas como son; industria alimenticia (humana y animal), medicina, cosmetología, usos biotecnológicos, mejorador de suelos, farmacología, producción agrícola, paisajismo, biocombustible, adhesivos, etc. (Santiago et., al 2016; Magro,2017).

Taxonomía

A nivel mundial se conocen más de 300 especies del género *Opuntia*, las cuales han sido utilizadas con distintos fines tales como; forraje, producción frutícola, producción del insecto grana cochinilla para obtención de colorantes, producción de verdura o cómo plantas ornamentales (Sáenz, 2006). Tan solo en México se reconocen alrededor de 103 especies silvestres pertenecientes al género antes mencionado y es considerado un centro de diversificación para este género. Este género forma parte de la subfamilia *Opuntioideae*; la cual tiene como característica la presencia de tallos verdes, encadenados en forma de raqueta denominados cladodios, además de que presenta areolas con espinas finas delgadas y poco visibles (Scheinvar et al., 2015).

Cuadro 1. Taxonomía del nopal

Reino

Vegetal

Subreino	Embryophita
División	Angiospermae
Clase	Dicotiledoneae
Subclase	Dialipetalas
Orden	Opuntiales
Familia	Cactaceae
Subfamilia	Opuntioideae
Tribu	Opuntiae
Genero	Opuntia
Subgénero	Platyopuntia
Nombre científico	<i>Opuntia ficus-indica</i>

Fuente: Sáenz, 2006

Botánica

Esta planta presenta órganos como son: raíz, tallo, hojas, flores y frutos. Cada uno con características muy particulares y específicas. La raíz presenta similitud con dicotiledóneas, cuyo origen proviene de la radícula, aunque es posible la proliferación de raíces a partir del tallo (cuando es propagada de manera asexual); presenta una raíz pivotante de tamaño y ancho variable la cual puede tener o no pelos absorbentes en función de la disponibilidad hídrica presente en el suelo (Hernández, 2017). El tallo es aplanado con forma de raqueta (cladodio) con una consistencia herbácea, articulada y con ramificaciones, una cutícula gruesa compuesta por compuestos lipofílicos como son; cutina y ceras cuticulares; adaptadas para el almacenamiento de agua en el interior de sus tejidos. Mientras que cuando la planta va llegando a etapas adultas, los tallos se comprimen adoptando una forma cilíndrica, lignificada y semileñosa, que les proporciona resistencia, capaz de soportar el peso de los cladodios jóvenes de la misma (Sáenz, 2006). En las caras de los cladodios se encuentran yemas, denominadas aréolas, las cuales pueden desarrollar nuevos nopales, flores o raíces esto dependiendo las condiciones climáticas presentes. En la cavidad de las aréolas se encuentran dos tipos de espinas: unas pequeñas, agrupadas en gran cantidad, y otras grandes que son hojas modificadas comúnmente conocidas como espinas (Magro, 2017). Sus

flores son hermafroditas, sésiles y solitarias, las cuales se desarrollan en el borde superior de los cladodios (pencas). Con un color variable con tonalidades rojas, amarillas, y blancas entre otras, esto en función del cultivar establecido, generalmente con una floración por año (Sáenz, 2006). Los frutos son bayas uniloculares, ovoides, carnosos con un tamaño y color variable en función de la especie. En ellos se encuentran las semillas lenticulares y poliespermicas, con una testa clara, cotiledones grandes y un embrión curvo (Hernández, 2017).

Principales cultivares

El cultivo de nopal en México es producido en 27 entidades federativas con fines hortícolas y en 16 con fines frutícolas. Durante el año agrícola 2020 se produjeron un total 471, 427.35 ton de tuna siendo los estados de México, Puebla, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco en donde se concentró 92.03% de la producción nacional. Los principales cultivares producidos en estos estados fueron, Tuna blanca Alfajayucan, Tuna criolla, Tuna roja, Tuna blanca cristalina, Tuna amarilla, Tuna blanca burrona, Tuna pico chulo y Tuna xoconostle en campo abierto (SIAP,2020).

Principales plagas

El cultivo de nopal es el más difundido y relevante entre todas las cactáceas en el mundo. Se estima que alrededor de 200 especies de artrópodos son huéspedes, sin embargo, no todos requieren medidas de control (Lobos et al. 2013). Las especies de mayor relevancia en México y otros países son; palomilla del nopal *Cactoblastis cactorum* Berg cuyo daño se manifiesta con un amarillamiento en el tejido de la planta, exudación de líquido y excrementos de las larvas, además de que los cladodios dañados se marchitan y mueren. Todos los instares larvarios generan daño, ya que consumen intensamente los tejidos internos del nopal (Zimmermann et., al 2005). *Dactylopius opuntiae* Cockerell denominada cochinilla del carmín cuyo daño se manifiesta como una clorosis en cladodios y frutos que debilita las plantas, además de que promueve la infección de fitopatógenos. Cuando su densidad es alta pueden causar la muerte de la planta (Vanegas et al., 2010). *Melitara (Olycella) nephelepasa* (Dyar) también conocido como gusano cebrá ocasiona un daño en las pencas al alimentarse de ellas; este patógeno ocasiona

una especie de escama y secamiento en la base de las espinas (Badii et al., 2001) *Metamasius (Cactophagus) spinolae* es conocido como barrenador del tallo puesto que la hembra al ovopositar sus huevos, eclosionan y emergen larvas que comienzan a alimentarse del tejido haciendo galerías en el mismo. En las áreas de entrada es posible observar secreciones gomosas y es una puerta de entrada para fitopatógenos (Pablo et al., 2015). También es posible observar a la chinche gris *Chelinidea tabulatus Burmesiter* quien posterior a su alimentación, en el sitio donde inserta su estilete forma una zona con márgenes circulares claros, las manchas se tornan amarillas y posteriormente la penca se debilita dependiendo el grado de infestación. Así como la chinche roja *Hesperolabops gelastops* Kirkaldy cuyo daño lo ejercen ninfas y adultos succionan la savia ocasionando secciones secas en la planta. En invierno las hembras de este insecto ovipositan en el interior de las pencas (Hernández, 2017). Otros artrópodos que es posible encontrar son araña roja, trips, diabroticas y moluscos (Mendoza,2008).

Principales enfermedades

El cultivo de nopal presenta enfermedades como son la mancha negra, mal de oro, y engrosamiento del cladodio. La mancha negra es una enfermedad en la cual existe una decoloración de la cutícula del cladodio, cambiando a un color claro con puntos pequeños de color olivo, posteriormente las manchas adquieren un color café oscuro, su diámetro incrementa de 3 a 4 cm y en la parte central se presenta un hundimiento; finalmente la lesión se seca, quedando expuesto el tejido leñoso que a veces se desprende dejando agujeros en las pencas (SADER,2020). Mediante identificación morfológica y molecular fue posible identificar a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria alternata*, *Fusarium lunatum* y *Curvularia lunata*. Todas estas especies causaron síntomas de mancha circular en cladodios. Adicionalmente, un aislado fue identificado como *Pythium ultimum* (Flores,2012). Aunque también existen reportes en donde se identifica como agente causal de la mancha circular a *Pseudocercospora opuntiae* (Quezada et al., 2013; Judith, 2015 y Ochoa et al., 2016). Mientras que el engrosamiento del cladodio es una enfermedad con presencia en nopal tunero, verdura y xoconostle con diversas

alteraciones morfológicas y fisiológicas que repercuten en la calidad y rendimiento del cultivo.

Engrosamiento del cladodio

Esta enfermedad también se conoce como “plantas macho”, está caracterizada por presentar cladodios con engrosamiento, enanismo, acorazonamiento, amarillamiento y un mosaico en tallos (Figuras 1 y 2). Además de la proliferación de frutos pequeños, cloróticos, de mala calidad en las caras laterales de los cladodios (Bertaccini et al., 2007; Suaste et al., 2012 y Valadez et al., 2021). Existen diversos estudios en donde se ha tratado de determinar al agente causal de la enfermedad mediante análisis moleculares; siendo asociado comúnmente con fitoplasmas (Bertaccini et al., 2007; Hernández et al., 2009; Suaste et al., 2012; Salas et al., 2020; así como con la presencia virus (Dzul *et al.*, 2012; Felker *et. al*, 2019).



Figura 1. Nopal con engrosamiento del cladodio



Figura 2. Frutos en cara lateral en plantas con engrosamiento

a) Fitoplasmas

Los fitoplasmas son microorganismos procariontes parásitos, miembros de la clase Mollicutes cuya característica principal en esta clase es la carencia de pared celular (Monje y Lara, 2019). Esta característica es responsable de pleomorfismo, plasticidad y resistencia a sustancias que inhiban o degradan la síntesis de peptidoglicano (Kuboyama et al., 1998). Se encuentran habitando el floema de las plantas y son responsables de más de 300 enfermedades en cultivos (Cuadro 2). A menudo estos microorganismos son detectados mediante la amplificación del gen 16S con PCR-RFLP y secuenciación (Lee et al., 2000). Presenta múltiples hospedantes vegetales y su dispersión depende en gran medida de los insectos que fungen como vectores. Estos microorganismos inducen síntomas que interfieren

con el desarrollo de la planta que varían dependiendo la especie, entre los que destacan: escoba de bruja (agrupación en ramas de tejidos de desarrollo); filodia (cambio retrogrado de órganos florales a hojas); espigado (elongación de tallos); formación de raíces secundarias agrupadas y fibrosas; enrojecimiento de hojas y tallos; amarillamiento generalizado; necrosis del floema así como una disminución en el crecimiento y desarrollo (Hogenhou et al.,2008).

Cuadro 2. Listado de *Candidatus phytoplasma* descritos al 2020.

Ca. <i>Phytoplasma</i> especie	Enfermedad asociada	Grupo/subgrupo 16Sr
Ca. <i>Phytoplasma ulmi</i> y Ca. <i>Phytoplasma asteris</i> Ca. <i>Fitoplasma trifolii</i>	Engrosamiento del cladodio	16SrV-A y 16Srl-B
ND	<i>Echinopsis con amarillamiento</i>	16SrlV, 16SrVI-K, 16SrlI-D, 16SrXIII
ND	Nopal verdura retrasado en crecimiento	16SrlI 16SrlI-C
Ca. <i>Phytoplasma asteris</i>	Amarillamiento del aster	16Srl-B
Ca. <i>Phytoplasma aurantifolia</i>	Escoba de bruja de la lima	16SrlI-B
Ca. <i>Phytoplasma omanense</i>	Escoba de bruja del sen de Oman	16SrXXIX-A
Ca. <i>Phytoplasma tamaricis</i>	Escoba de bruja del tamarindo	16SrXXX-A
Ca. <i>Phytoplasma</i> costaricanum	Enanismo de la soja	16SrXXXI-A
Ca. <i>Phytoplasma rubi</i>	Enanismo en <i>Rubus</i> sp.	16SrV-D
Ca. <i>Phytoplasma trifolii</i>	Proliferación del trébol	16SrVI-A
Ca. <i>Phytoplasma fraxini</i>	Amarillamiento del fresno	16SrVII-A
Ca. <i>Phytoplasma phoenicium</i>	Enfermedad letal del almendro	16SrlX-D
Ca. <i>Phytoplasma mali</i>	Proliferación del manzano	16SrX-A
Ca. <i>Phytoplasma pyri</i>	Declinamiento del peral	16SrX-C
Ca. <i>Phytoplasma spartii</i>	Escoba de bruja en <i>Spratium</i>	16SrX-D
Ca. <i>Phytoplasma prunorum</i>	Amarillamiento en frutales de carozo	16SrX-F
Ca. <i>Phytoplasma oryzae</i>	Amarillamiento enanizante del arroz	16SrXI-A
Ca. <i>Phytoplasma solani</i>	Síndrome de madera negra en vid	16SrXII-A
Ca. <i>Phytoplasma solani</i>	Madera negra de la vid	16SrXII-A
Ca. <i>Phytoplasma australiense</i>	Amarillamiento de la vid	16SrXII-B
Ca. <i>Phytoplasma japonicum</i>	Filodia de la hortensia	16SrXII-D
Ca. <i>Phytoplasma fragariae</i>	Amarillamiento de la frutilla	16SrXII-E

<i>Ca. Phytoplasma cynodontis</i>	Hoja blanca de la bermuda grass	16SrXIV-A
<i>Ca. Phytoplasma castaneae</i>	Escoba de bruja del castaño	16SrXIX-A
<i>Ca. Phytoplasma brasiliense</i>	Escoba de bruja del Hibiscus	16SrXV-A
<i>Ca. Phytoplasma graminis</i>	Amarillamiento de gramíneas	16SrXVI-A
<i>Ca. Phytoplasma caricae</i>	Fitoplasmosis en papaya	16SrXVII-A
<i>Ca. Phytoplasma americanum</i>	Punta morada de la papa	16SrXVIII-A
<i>Ca. Phytoplasma rhamni</i>	Escoba de bruja del espino	16SrXX-A
<i>Ca. Phytoplasma pini</i>	Fitoplasmosis en Pinus sp.	16SrXXI-A
<i>Ca. Phytoplasma palmicola</i>	Amarillamiento letal del cocotero	16SrXXII-A
<i>Ca. Phytoplasma sudamericanum</i>	Proliferación en maracuyá	16SVI-I
<i>Ca. Phytoplasma allocasuarine</i>	Amarillamiento de la allocasuarina	ND
<i>Ca. Phytoplasma lycopersici</i>	Hoja de perejil en tomate	ND
<i>Ca. Phytoplasma convolvuli</i>	Amarillamiento de la correhuela	ND
<i>Ca. Phytoplasma balanitae</i>	Escoba de bruja de la balanita	ND
<i>Ca. Phytoplasma pruni</i>	X-disease en durazneros	16SrIII-A
<i>Ca. Phytoplasma ulmi</i>	Amarillamiento del olmo	16SrV-B
<i>Ca. Phytoplasma ziziphi</i>	Escoba de bruja de ziziphi	16SrV-B

Fuente: Tomado de Fernández, 2015 y modificado con información de Granata et al., 2006; Bertaccini, 2007; Avina et al., 2009; Hernández et al., 2009; Suazte, 2012; Panyagua, 2019; Hemmati et al., 2020; Martínez et al., 2020.

*ND: No descrito.

b) Virus Tobacco bushy top

Felker et al., en 2019 reportó la presencia de un virus similar al Tobacco bushy top en cladodios de nopal con engrosamiento; el cual es un virus de la familia umbraviridae que se caracteriza por la dependencia de un grupo de virus auxiliar (Luteoviridae para su transmisión por áfidos de manera circulativa no propagativa). Su infectividad se asocia con el ARN monocatenario (ssRNA). En la naturaleza los Umbraviridae son encapsidados por la proteína de cubierta de los luteovirus auxiliares para posteriormente ser transmitidos por pulgones del género Myzus (Mo et al. 2003).

Identificación molecular

A lo largo de la historia se han utilizado diversas técnicas y herramientas para determinar la identidad de microorganismos. Para los cuales se disponen diversos métodos como son los basados en caracteres morfológicos, tinciones diferenciales, pruebas bioquímicas y serológicas, así como la detección molecular. Esta última

permite obtener resultados con mayor rapidez y sensibilidad. Además de que es posible detectar varios organismos a la vez y diferenciar entre serotipos (Palomino et al., 2014). La identificación molecular está basada en el estudio de moléculas de DNA y RNA, lo que permite el análisis de un gran número de microorganismos mediante marcadores moleculares; para lo cual, se han diseñado iniciadores para PCR altamente específicos para la detección de fitopatógenos. El gen 16S es el más utilizado para la detección e identificación de microorganismos debido a que se encuentra presente en todos ellos; pero, además, esta región se ha considerado útil para estudios filogenéticos porque los diferentes grupos de procariontes se han definido con base en los cambios nucleotídicos que esta zona de información genética presenta (Fox, 1992). El gen 16s de aproximadamente 1800 nucleótidos y minimiza las fluctuaciones estadísticas; y al conservar su estructura secundaria, propicia el alineamiento durante la comparación de secuencias (Del Rosario et al., 2004). Este gen 16s presenta nueve regiones hipervariables (V1-V9) entre todos los microorganismos procariontes, siendo las regiones conservadas las que se han utilizado para diseñar iniciadores de PCR universales que permiten la amplificación de las regiones hipervariables (Baker et al., 2003). Para la detección de fitoplasmas responsables de enfermedades en diversos cultivos, se ha utilizado dicho gen. Esta región ha permitido clasificar a los fitoplasmas en 31 grupos y más de 100 subgrupos con base en el análisis de patrones de restricción obtenidos mediante RFLP (restriction fragment length polymorphisms) (Lee et al., 2000).

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar fragmentos de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN llamados cebadores (iniciadores o primers) para delimitar la parte del genoma a amplificar. Durante el proceso, la temperatura de la muestra sube y baja repetidamente para ayudar a la enzima de replicación del ADN a duplicar la secuencia que está siendo copiada. Con esta técnica se pueden replicar millones o miles de millones de copias en unas pocas horas (Smith, 2009).

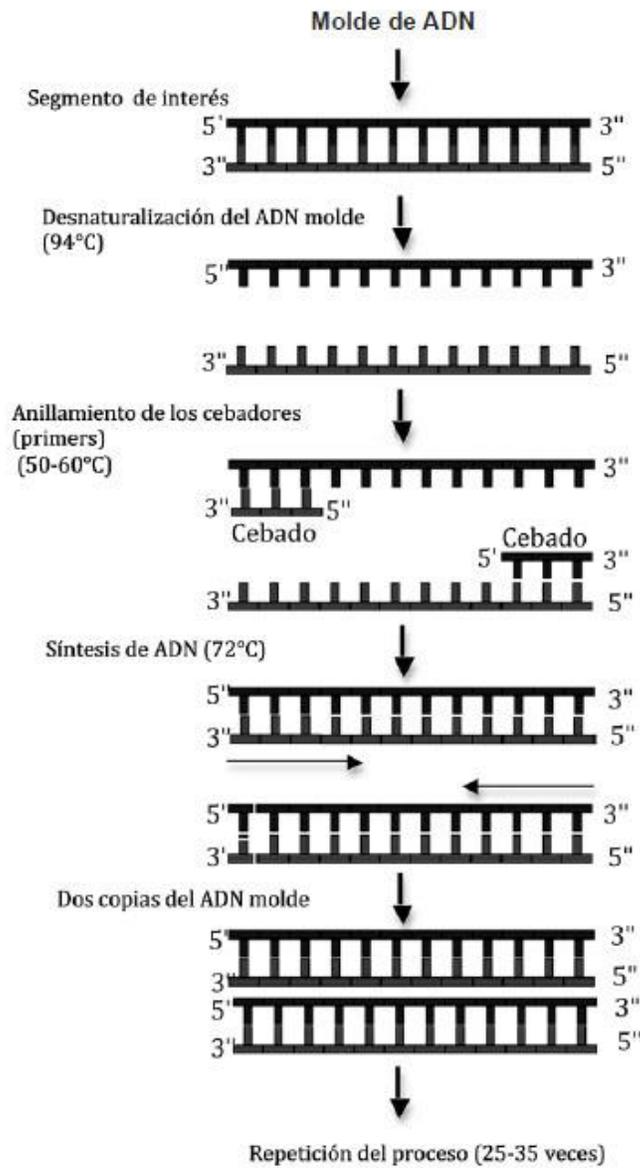


Figura 3. Proceso de la reacción en cadena de la polimerasa

Fuente: Palomino y Camargo, 2014.

PCR-RFLPs

La PCR y PCR anidada (nested PCR) son técnicas para la detección e identificación de fitoplasmas. Los virus en plantas generalmente se detectan con PCR directa (Cuadro 3). Así mismo, mediante el análisis RFLP del producto de PCR anidada para el caso de los fitoplasmas, y/o con secuenciación del gen 16S es posible confirmar la presencia e identidad de estos microorganismos (Lee et al., 2000).

Cuadro 3. Microorganismos detectados en nopal y otras cactáceas mediante análisis moleculares

Fitoplasmas	Virus
<ul style="list-style-type: none"> • Salas et al., 2020. Encontraron en el cultivo de nopal con síntomas de aborto floral, necrosis foliar, pérdida de espinas y amarillamiento (nueva enfermedad) <i>Ca. P. trifolii</i> del subgrupo 16SrVI-K). • Martínez et al., 2020. Determinaron en plantas con síntomas de engrosamiento las cuales injerto con presencia <i>Candidatus phytoplasma</i>. • Hemmati et al., 2020 encontraron a un fitoplasma del subgrupo 16SrII-D en plantas de nopal tunero (<i>O.cylindrica</i>) con síntomas de retraso en crecimiento, fasciación en tallos cladodios y cambios de un color púrpura en las puntas de los cladodios y grupos de cladodios. • Panyagua, 2019. Encontró a <i>Candidatus</i> fitoplasma trifolli perteneciente al grupo 16SrIV, subgrupo A, en <i>Opuntia ficus-indica</i> asociado a síntomas de engrosamiento. • Suazte et al., 2012. Reportaron en plantas con síntomas de engrosamiento mediante patrones de restricción generados con las endonucleasas <i>HaeIII</i>, <i>KpnI</i> y <i>MseI</i> (TrU91), revelo que el fitoplasma pertenece al grupo 16SrXIII. • Bertaccini et al., 2007. En plantas de nopal que mostraban proliferación y retraso en el crecimiento, encontraron la presencia de fitoplasmas 16SrV-A y 16SrI-B respectivamente relacionados con “<i>Candidatus Phytoplasma ulmi</i>” y “<i>Ca. P asteris</i>”. • Avina et al., 2009. Encontraron en nopales ornamentales del género <i>Echinopsos</i> que presentaban mosaicos y amarillamiento la presencia de fitoplasmas del grupo 16 SrII. • Hernández et al., 2009. Determinaron en plantas de nopal tunero (<i>O. ficus-indica</i> identifico a <i>Candidatus phytoplasma</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • Felker et al., 2019. Determinaron como probable agente causal del engrosamiento del cladodio. A un virus de cadena sencilla sin ADN intermedio de 630 pb, similar al Tobacco bushy top virus • De la Torre et al., 2016. En cladodios jóvenes con manchas anulares amarillas irregulares y malformación del cladodio, existe la presencia de <i>virus X de Schlumbergera</i> (SVX). • Alonso et al., 2015. Encontraron mediante PCR-RT la presencia de virus del tipo Potexvirus como Agente Causal de Manchas Cloróticas en <i>Opuntia ficus-indica</i> en México. • Torre et al., 2007. Determinaron que los síntomas de manchas anulares de color amarillo en plantas de nopal tunero (<i>Opuntia amyclae</i>) están asociadas con un virus que pertenece al grupo de los Tobamovirus.

aurantifolia perteneciente al Subgrupo 16 SrII-B).

- Granata et al., 2006 Determinaron la presencia del Fitoplasma TS perteneciente al subgrupo ribosomal 16SrII-C en muestras de nopal con síntomas de retraso en su crecimiento.

Fuente: Granata et al., 2006; Bertaccini, 2007; Torre et al., 2007; Avina et al., 2009; Hernández et al., 2009; Suazte, 2012; Alonso et al., 2015; De la Torre et al., 2016; Felker et al., 2019; Panyagua, 2019; Hemmati et al., 2020; Martínez et al., 2020 y Salas et al., 2020

El análisis RFLP consiste en la generación de perfiles de fragmentos de DNA específicos de especie y la subsecuente digestión del amplicón del DNA con una o más enzimas de restricción (Segura, 2010). Estas enzimas rompen la molécula de DNA correspondiente al amplicón en sitios de reconocimiento específicos de 4 ó 6 pb, originando un conjunto de subfragmentos con diferentes longitudes que se separan mediante electroforesis (Figura 4).

PCR anidada

Para su realización es necesario tomar una alícuota del producto de la PCR primaria y utilizarla como molde para realizar una segunda ronda de amplificación. Para lograr esto, se utilizan iniciadores internos que limitan la amplificación de productos inespecíficos como los resultantes en la PCR primaria. Estos iniciadores anidados dan como resultado un amplicón más corto que resulta de mayor especificidad (Figura 4) (Goode et al., 2002).

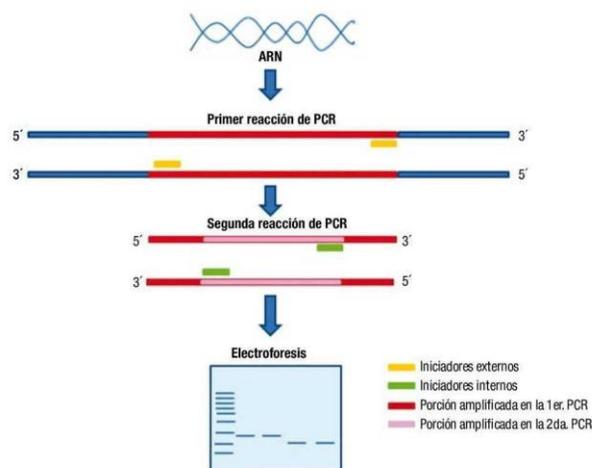


Figura 4. Representación de la PCR anidada

Fuente: Pacheco et., al 2013,

Secuenciación

La secuenciación es una técnica que permite codificar (determinar el orden) y conocer las bases nitrogenadas del ADN en un fragmento determinado. El conocimiento de la secuencia de nucleótidos es una herramienta con infinidad de aplicaciones, entre ellas, la identificación de patógenos (Valdemar, 2011).

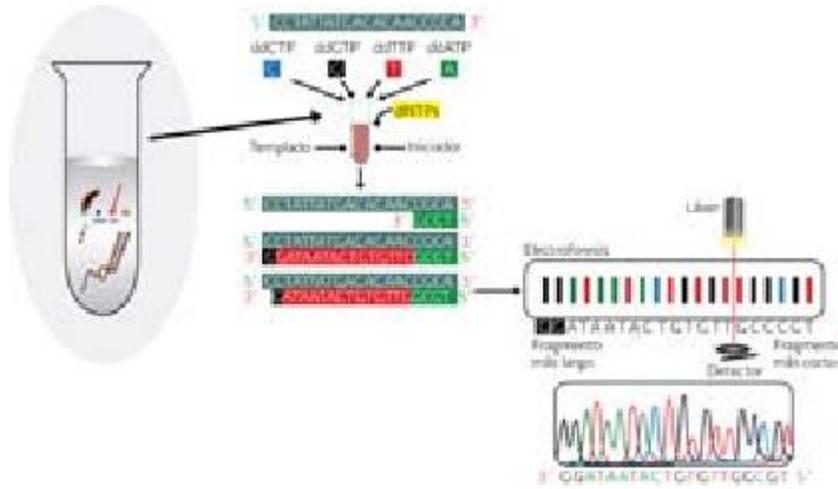


Figura 5. Proceso de secuenciación

Fuente: Valdemar et al., 2011.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta del material vegetal

Se llevó a cabo de forma dirigida el día 03 de septiembre de 2021 en compañía de personal del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de México, a cargo de la campaña fitosanitaria de nopal. El material genético recolectado correspondió al cultivar Alfajayucan (Figura 6), que produce una tuna blanca de sabor dulce, con semillas, buena vida de anaquel y con menos problemas para su cosecha. Siendo la más cultivada en el estado de México y el cultivar más susceptible al engrosamiento del cladodio en el valle de México



Figura 6. *Opuntia ficus-indica* cultivar Alfajayucan.

Se seleccionaron los municipios de: Temascalapa (Huerta 1), Teotihuacan de Arista (Huerta 2) y San Martín de las Pirámides (Huerta 3), georreferenciando cada sitio muestreado.

La primera huerta de donde se recolectaron muestras de plantas que presentaban síntomas de engrosamiento en el cultivar Alfajayucan se localiza en Temascalapa, Estado de México (Figura 7), cuyas coordenadas geográficas son 19°74'91'' Latitud Norte y 98°54' 49'' Longitud Oeste. Esta huerta tiene una superficie aproximada de 1.5 hectáreas, y se cultiva bajo un manejo convencional (químico) y tiene una edad aproximada de 20 años. De esta huerta se obtuvieron un total de 29 plantas; 18 sanas y 11 con síntomas de engrosamiento.

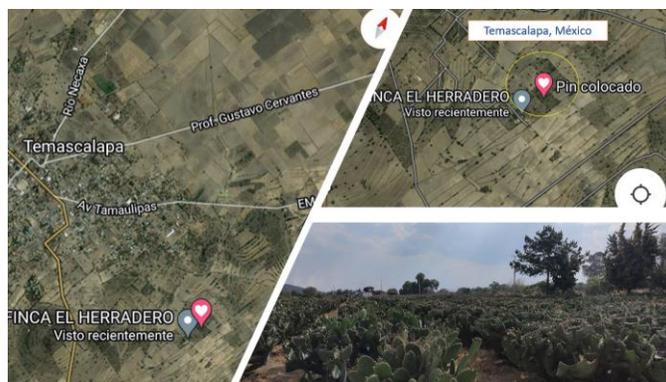


Figura 7. Primer sitio de recolecta; Temascalapa, Estado de México

El segundo lugar de recolecta se realizó en el municipio de Teotihuacan de Arista, Estado de México (Figura 8), cuyas coordenadas geográficas son 19° 44' 59'' latitud norte y 98° 55' 29'' Longitud Oeste. Esta huerta tiene una superficie aproximada de 2.5 hectáreas con una edad aproximada de 20 años, en la cual los productores implementan un manejo orgánico. En esta huerta se obtuvieron 36 cladodios en total: 16 sanos y 20 enfermos.

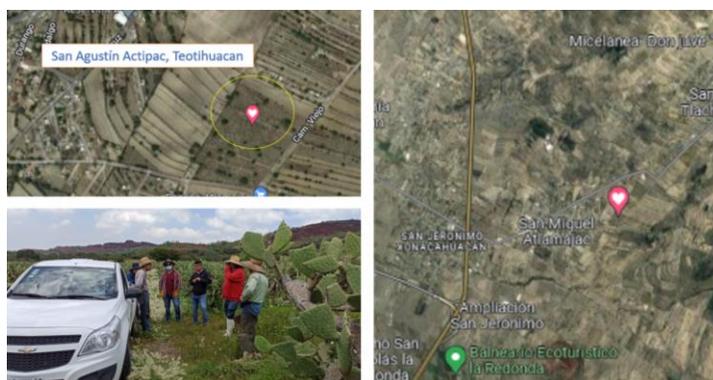


Figura 8. Segundo sitio de recolecta: Teotihuacan de Arista, Estado de México

La tercera huerta muestreada se localizó en el San Martín de las Pirámides (Figura 9) cuyas coordenadas geográficas son: 19° 71' 37'' Latitud Norte y 98° 83' 41'' Longitud oeste. Esta huerta tiene una superficie aproximada de 10 hectáreas, con una edad aproximada de 35 años y cuyo manejo del cultivo es convencional. De esta huerta se obtuvieron 76 plantas en total; 39 plantas sanas y 37 plantas enfermas.



Figura 9. Tercer sitio de recolecta: San Martín de las Pirámides, Estado de México.

Una vez seleccionados los cladodios útiles para el estudio, se realizó un corte limpio en la base de los mismos (Figuras 10 y 11), para su posterior traslado al invernadero de horticultura perteneciente a la UACH en donde se colocarían en mesas de madera para su cicatrización.



Figura 10. Cladodio con síntomas de engrosamiento



Figura 11. Cladodios recolectados y clasificados con base a síntomas y lugar de recolección

Trasplante

Este se llevó a cabo el 25 de septiembre del 2021 utilizando un sustrato inerte compuesto por Tezontle y Tepexin en proporciones 1:1 (v/v), en bolsas de polietileno de 40 x 40 cm, las cuales fueron perforadas y llenadas con 11.38 kg de sustrato en promedio. Una vez llenadas las bolsas se les agregó 1.2 L de agua para saturar el sustrato previo al trasplante de los cladodios recolectados. Se registró el

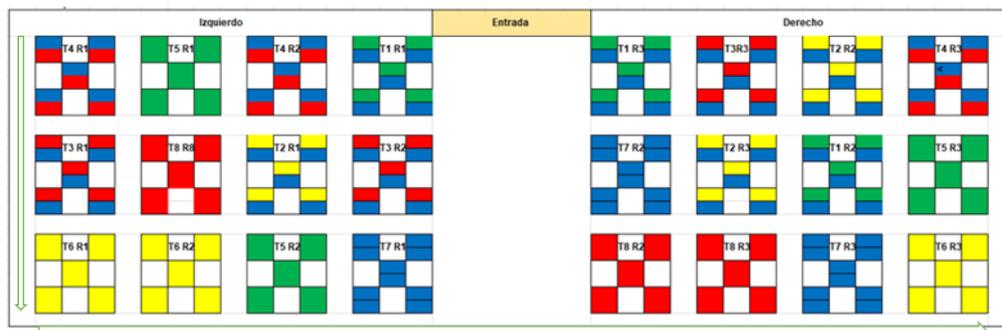
peso para cada uno de los cladodios y la parte basal donde se realizó el corte a partir de la planta madre se impregnó con Radix 1000 para favorecer el proceso de enraizamiento. Posteriormente, los cladodios con Radix fueron trasplantados a las bolsas de sustrato sumergiendo un tercio de su longitud. En la figura 12 se muestra el proceso de trasplante y toma de datos de los cladodios recolectados.



Figura 12. a) preparación del sustrato, b) llenado de bolsas con sustrato, c) peso de nopales y d) trasplante de cladodios recolectados.

Establecimiento en invernadero

El experimento se estableció el 30 de enero del 2022 en un diseño completamente al azar con 8 tratamientos y 3 repeticiones; con 5 plantas por repetición y en un acomodo de 5 deoros (Figura 13, 14 y 15).



Tratamiento	Color	Descripción	Engrosamiento
1	■	SN al 50%	
2	■	SN al 100%	No
3	■	SN con 400 ppm Ca ²⁺	
4	■	Agua (Testigo)	
5	■	SN al 50%	
6	■	SN al 100%	Si
7	■	SN con 400 ppm Ca ²⁺	
8	■	Agua (Testigo)	

Figura 13. Distribución y claves de los tratamientos en el invernadero.



Figura 14. Tratamientos en estudio (lado izquierdo con respecto a la entrada del invernadero).



Figura 15. Tratamientos en estudio (lado derecho con respecto a la entrada del invernadero).

Descripción de los tratamientos

Se establecieron 8 tratamientos, 4 de los cuales consistían de cladodios sanos y 4 de cladodios engrosados con tres repeticiones cada uno y 5 plantas por repetición. En el cuadro 4 se muestran los tratamientos para cada grupo de plantas que consistieron en diferentes concentraciones de solución nutritiva (SN); que fueron 50%, 100%, 100%+400 ppm de Ca^{2+} y Agua.

Se realizó el cálculo de la solución nutritiva evaluada por Almaguer et al. (2014) para nopal verdura; la cual fue modificada por Pineda y Tetla en 2021 para el cultivo de tuna con base a la solución nutritiva Steiner (1984). Para el cálculo de la solución nutritiva se tomaron en cuenta los nutrientes presentes en el agua (Cuadro 2 del apéndice) que abastece a los invernaderos de fitotecnia (información proporcionada por los laboratorios de salinidad, suelos y aguas pertenecientes a la Universidad Autónoma de Chapingo). La cantidad y frecuencia de riegos se determinó mediante la diferencia entre peso de plantas a capacidad de campo y la cantidad de agua evapotranspirada en 19 días. Regando con 120 mL para cada planta, cada tercer día a partir de la primer aplicación (30 de enero del 2022) de los tratamientos.

Cuadro 4. Tratamientos en estudio

Tratamiento	Engrosamiento (sintomáticas).	Fertilización
1		SN al 50%
2		SN al 100%
3	No	SN con 400 ppm Ca^{2+}
4		Agua (Testigo)
5		SN al 50%
6	Si	SN al 100%
7		SN con 400 ppm Ca^{2+}
8		Agua (Testigo)

**SN=Solución nutritiva propuesta por Almaguer et. al. 2014, modificada por Pineda y Tetla, 2021 para nopal Tunero, con base a la Solución nutritiva Steiner (1984).

Variables en estudio en invernadero

Las variables en estudio que se evaluaron fueron: peso inicial del cladodio, peso, largo, ancho y grosor realizando un análisis de varianza con el programa SAS y una prueba de comparación de medias entre los tratamientos, para las variables peso, largo, ancho y grosor.

Peso: esta variable se comenzó a cuantificar con una báscula Vinson con capacidad de 40 kg a partir de los 60 días después de suministrar los tratamientos en el experimento. Se evaluó a los 60, 80 y 90 días después de la instalación del mismo.

Largo y ancho: Se determinó utilizando un flexometro Pretul de 5 m. Realizando las mediciones de la parte media del cladodio de forma vertical (arriba hacia abajo) y horizontal (Izquierda a derecha) partiendo de la base del cladodio (Figura 16), a los 60, 80 y 90 días después de la aplicación de los tratamientos.

Grosor del cladodio: Este se realizó empleando un Vernier a los 60,80 y 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos. Tomando lecturas de 7 sitios; izquierdo (IZQ.), derecho (D.), arriba (A.), I, II, III y IV (Figura 16). Estas lecturas fueron promediadas obteniendo un grosor promedio del cladodio.

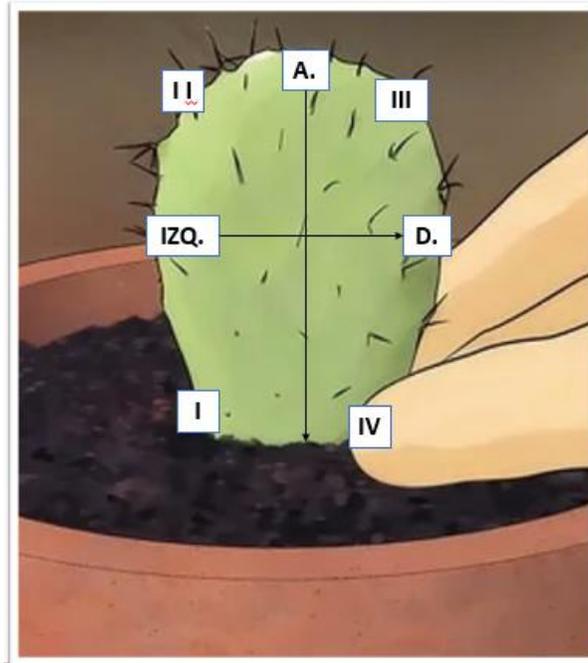


Figura 16. Zonas de los cladodios del nopal en donde se midieron las características peso, largo, ancho y grosor.

Emisión de brotes

Para esta variable se realizaron lecturas de los brotes (yemas apicales) que fueron emitidos a partir del primero de ellos en cada tratamiento hasta los 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos; así mismo se registró la fecha de aparición de los brotes durante los 90 días. Durante la evaluación a los 90 (ddt), se midieron también el largo y el ancho de los cladodios alcanzado hasta esa fecha con un flexómetro Pretul de 5 m.

Identificación molecular

En el cuadro 5 se indica el origen de las muestras seleccionadas para el análisis molecular provenientes de los 3 sitios de recolección, 22 presentaban síntomas de engrosamiento y 22 sin síntomas (consideradas como sanas). Las muestras fueron liofilizadas con un equipo Labconco modelo 7754041 de 18 L en el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), con las siguientes condiciones: vacío de 0.045 mBar a una temperatura de condensar de -45 °C.

Cuadro 5. Sitio de recolecta y cantidad de muestras seleccionadas para identificación molecular

Huerta	2CLADODIOS	
	SANOS	ENFERMOS
1	5	5
2	7	7
3	10	10

Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo con los métodos CTAB I y II (Weising et al. 2005), utilizando 50 mg de tejido liofilizado proveniente de cladodios sanos y engrosados de las 44 muestras antes referidas. El tejido se maceró en morteros limpios y secos, posteriormente se dividió en 2 tubos Eppendorf de 2 mL debidamente etiquetados. En la Figura 17 se aprecia parte del proceso de extracción de DNA.



Figura 17. Procedimiento para la extracción de DNA; A) Etiquetado de muestras, B) macerado y C) recuperación del pellet

A las muestras se les agregó 1 mL de Buffer de extracción y 0.4 mL de la mezcla de cloroformo y alcohol isoamílico (24+1; v/v). Posteriormente, se incubaron a 65 °C durante media hora con agitación manual cada diez minutos. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron las muestras durante diez minutos a 10,000 revoluciones por minuto (RPM). La fase acuosa (sobrenadante) de las muestras se recuperó y se transfirió a tubos Eppendorf de 2 mL limpios, nuevos y etiquetados. Se adicionaron 1.2 volúmenes de isopropanol 100 % para precipitar los ácidos nucleicos presentes en la muestra. Se centrifugaron nuevamente las muestras durante 10 minutos a 12,000 RPM, se retiró con cuidado el sobrenadante por inversión y se mantuvo solamente el pellet, el cual se lavó con etanol 70%. Se

centrifugaron las muestras durante diez minutos a 12,000 RPM, se retiró el sobrenadante y los tubos se invirtieron sobre una toalla de papel para eliminar el exceso de alcohol. Una vez que la pastilla de ADN estuvo seca, se adicionaron 100 μ L de Buffer TE y se incubó durante toda la noche en un refrigerador a 4 °C para su solubilización. Después se agregaron 8 μ L de RNAsa (250 μ g/mL); se mezcló e incubó durante una hora. Posteriormente, se añadieron a todas las muestras 0.05 volúmenes de cloruro de sodio (5 Molar) y 0.35 volúmenes de isopropanol (100%); se mezclaron e incubaron las muestras durante diez minutos a 4 °C para precipitar los polisacáridos presentes. Pasado el tiempo indicado, los tubos fueron centrifugados durante diez minutos a 10,000 RPM, se transfirió el sobrenadante a tubos nuevos, limpios y debidamente etiquetados. A las muestras transferidas se les agregó un volumen de isopropanol 100%, se mezcló y se incubó durante 24 horas a -20 °C. Después de ese tiempo, se centrifugaron las muestras durante diez minutos a 10,000 RPM; se decantó el isopropanol y a los pellets se les aplicó un lavado con 1 mL de etanol al 70%. Las muestras nuevamente fueron centrifugadas (10 minutos x 10,000 RPM) y decantadas; al pellet se les adicionó un volumen adecuado de Buffer TE (Tris-Cl pH 7.5 y EDTA pH 8) con base a su tamaño.

Determinación de la cantidad y calidad del DNA

Una vez disuelto el DNA en el buffer TE, se verificó su integridad y calidad en un gel de agarosa 1%. La concentración, absorbancia y relación 260/280 fue determinada con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA).

PCR

Se utilizó PCR para amplificar un fragmento de aproximadamente 1800 pb del gen 16S (Zambrano, 2008) utilizando los primers P1: -5_AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GATT-3 y P7: -5- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GATT-3. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final 25 μ L (Cuadro 6) utilizando el programa de termociclaje referido en la Figura 18. Esta amplificación genera muchos productos de PCR, ya que estos iniciadores pueden reconocer a diferentes tipos de

fitoplasmas que viven dentro de la planta. Posteriormente sobre estos productos, se llevó a cabo la amplificación “anidada” con un par de iniciadores específicos para la detección de Phytoplasmas.

Cuadro 6. Composición de la máster mix utilizada en la amplificación con PCR

Reactantes	Cantidad [Volumen/reacción (µL)]	Concentración Final
DNA	5	50 ng
Buffer (5 X)	5	1 X
DNA Taq-polimerasa 5U/L	0.3	1.5 U
MgCl ₂	2.5	2.5 mM
H ₂ O	4.2	-
P1	1.5	1.5 µL
P7	1.5	1.5 µL
dNTPs (1000 mM)	5	200 (mM)

En la Figura 18, se ejemplifica el programa de termociclaje efectuado en el termociclador automático modelo Maxygene (Axygene).

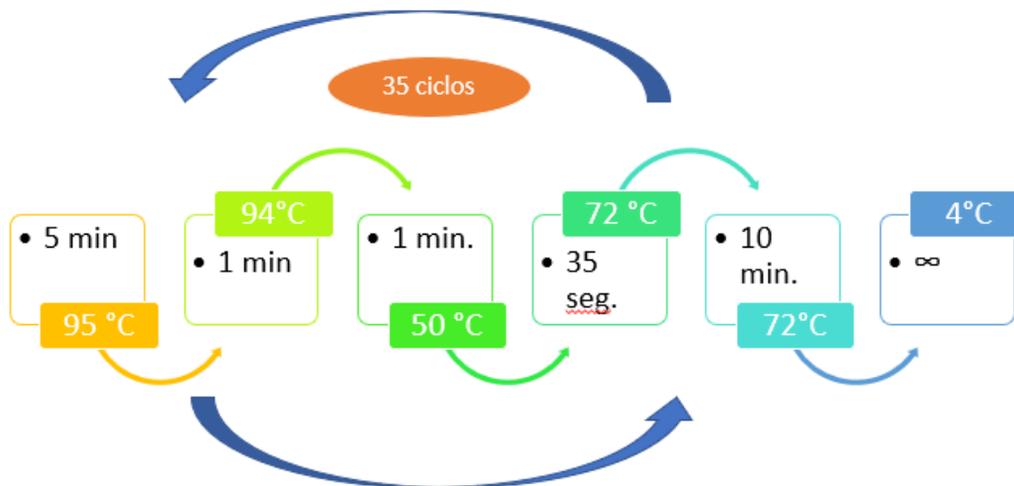


Figura 18. Programa utilizado en la amplificación con los primers P1 y P7 para PCR

El resultado de la PCR se visualizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa 1.5% con buffer TAE 1X, el cual se corrió a 90 Volts durante 45 minutos. Para revelar las bandas presentes en los geles, se utilizó bromuro de etidio 1% (BrEt) durante 10 minutos y se retiró el exceso del mismo por inmersión en agua

destilada durante 15 minutos. Los geles fueron fotodocumentados utilizando el programa Quanta One (BioRad, modelo). Para la estimación del peso molecular de las bandas amplificadas se utilizó el marcador de peso molecular de 1 Kb (PROMEGA). Las muestras amplificadas se mantuvieron en refrigeración (4 °C) para su posterior análisis.

PCR anidada

Para la PCR anidada se utilizaron los mismos reactantes descritos con anterioridad, con excepción de los primers que fueron R16F2/R16R2 (5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'/ 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3') (Gundersen y Lee, 1996). Estos primers que reconocen una zona interna del fragmento de aproximadamente 1800 pb del gen 16S obtenido en el primer termociclaje, amplifican un sub fragmento de aproximadamente 1200 pb de dicha región en los fitoplasmas. Se utilizaron 3 µL del producto de la primer PCR y las condiciones de amplificación fueron las indicadas en la Figura 19 iniciando con una desnaturalización de 94 °C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento a 57 °C por 1.0 min, extensión a 72 °C durante 2.0 min y un paso final a 72 °C por 10 min en un termociclador Touch™ C1000 thermal Cycler® (Bio-Rad, USA).

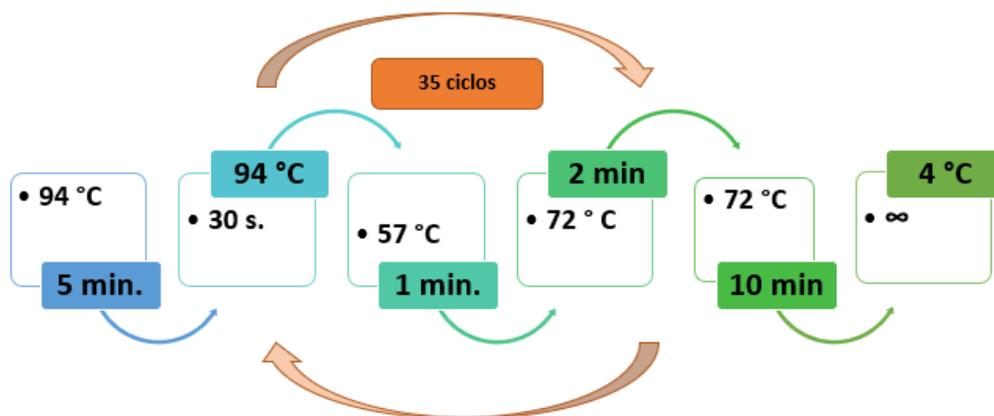


Figura 19. Programa utilizado en la PCR anidada con los primers R16F2/R16R2

Secuenciación

A partir de los fragmentos amplificados mediante PCR anidada, se seleccionaron los que presentaran mayor nitidez para posteriormente secuenciarlas. Una vez obtenidas las secuencias, estas se editaron con el programa Genious Prime para unir las secuencias forward y reverse de cada una de las muestras, para su posterior comparación en la base de datos National Center of Biotechnology information (NCBI).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados para las variables evaluadas en invernadero en función del tiempo.

Para las variables Peso, Largo, Ancho y Grosor de los cladodios, se realizaron análisis de varianza combinados para las fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días. En el cuadro 7 se observan diferencias estadísticamente significativas para todas las variables peso, largo, ancho y grosor, lo que se traduce en un incremento en todas las variables desde los 60 a los 90 días. Al realizar la prueba de comparación de medias por el método de la Diferencia Mínima Significativa de Fisher, fue posible observar grupos estadísticamente diferentes en la variable peso a los 80 y 90 días. Las variables largo, ancho y grosor tuvieron un comportamiento similar, a medida que pasaron los días de evaluación se observaron incrementos significativos.

Cuadro 7. Valores promedio de las variables Peso, Largo, Ancho y Grosor a los 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación en cada tratamiento.

	Peso (kg)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)
60 días	13.8552 b***	19.0895 b	19.2721 b	1.7202 c
80 días	13.9887 a	19.0911 b	19.2730 b	1.7356 b
90 días	14.0387 a	19.1111 a	19.2921 a	1.7902 a
Prob.*	0.0234	0.0002	0.0001	0.0001
DMS**	0.1119	0.0038	0.0019	0.0055

*:Prob.=Probabilidad en el ANOVA; **DMS: Diferencia mínima significativa de Fisher ($p=0.05$);***: Medias por columnas con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Resultados de los efectos de los tratamientos para las variables evaluadas en invernadero.

En el Cuadro 8 es posible apreciar que existen diferencias altamente significativas para las variables peso, largo, ancho y grosor. Al realizar la comparación de medias entre los tratamientos usando el método de Tukey, se obtuvieron grupos estadísticamente diferentes en los datos promedio a través de las tres fechas evaluadas (60, 80 y 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos). Para la variable peso es notorio observar que los tratamientos con las medias más altas son los correspondientes a los tratamientos 5, 6, 7 y 8 provenientes de plantas con engrosamiento. Manifestando una tendencia similar en la variable grosor en donde los tratamientos con cladodios con síntomas de engrosamiento presentan las

medias más altas. Mientras que para la variable largo se observan medias mayores en los tratamientos provenientes de plantas sanas (1, 2, 3 y 4). No obstante, en la variable ancho existe un comportamiento distinto que en las anteriores, pues el tratamiento con la menor media (6) está comprendido dentro de los tratamientos enfermos. Esto quizá se debe a que las huertas muestreadas presentaban un manejo y edades diferentes.

Es importante mencionar que el crecimiento de este cultivo es lento por lo que los cambios en los cladodios iniciales no son evidentes. Resultando necesario continuar con las evaluaciones.

Cuadro 8. Valores promedio de los tratamientos a través de las tres fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación; para las variables Peso, Largo, Ancho y Grosor de cladodio.

Tratamiento	Peso (kg)	Largo (cm)	Ancho (cm)	Grosor (cm)
1	14.21 ab***	20.23 ab	19.57 abc	1.55 bc
2	13.71 b	19.53 abc	19.02 bcd	1.69 b
3	13.89 ab	20.80 a	19.24 abcd	1.55 bc
4	13.72 b	20.55 ab	19.05 bcd	1.46 c
5	13.89 ab	18.26 c	20.22 ba	1.99 a
6	14.35 a	18.14 c	18.10 d	2.16 a
7	13.92 ab	16.30 d	18.66 dc	2.00 a
8	14.00 ab	18.97 bc	20.37 a	1.72 b
Prob.*	0.0015**	<0.0001**	<0.0001**	<0.0001**
DSH**	0.52	1.72	1.28	0.22

Tratamientos: 1. Plantas sanas + SN al 50 %; 2. Plantas sanas + SN al 100%; 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺; 4. Plantas sanas + agua; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%; 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺ y 8. Plantas engrosadas + agua. *: Prob=Probabilidad en el ANOVA; **: DSH: Diferencia significativa honesta de Tukey (p=0.05); ***: Medias por columna con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Para la variable número de brotes, se realizó la cuantificación total de brotes emitidos, así como las mediciones largo y ancho a los 90 días después de la primera aplicación de la solución nutritiva.

Discusión para la variable Peso de cladodios

En la figura 20 se aprecia que los tratamientos; 5, 6, 7 y 8 (engrosados) presentan medias de peso combinadas superiores a las de los tratamientos 2, 3 y 4 con excepción del 1 (sanos); esta tendencia probablemente se debe a que los cladodios presentes en los tratamientos del 5 al 8 fueron seleccionados de manera dirigida

hacia plantas con síntomas de engrosamiento (engrosados, amarillentos, con deformaciones y acorazonamiento). Ante esto, Valadez et al. (2021) encontraron al realizar cortes tisulares de plantas con engrosamiento que los tejidos presentaban hipertrofia e hiperplasia, así como un aumento de traqueidas, haces vasculares dañados y una concentración mayor de amiloplastos y cristales de oxalato de calcio en comparación con plantas asintomáticas. Por lo que los cambios histológicos pueden explicar el incremento en peso de las plantas con presencia de engrosamiento. Mientras que en los tratamientos 2, 3, y 4 el peso promedio se comportó de manera inferior a los tratamientos con síntomas. La media de peso que manifiesta el tratamiento 1 se debió probablemente a la variación de peso inicial de los cladodios recolectados y seleccionados desde el inicio (edad de plantas madre, manejo, largo y ancho), ya que no todos presentaban pesos homogéneos entre las huertas muestreadas. Pero también, se ha reportado que cuando el material vegetal proviene de diferentes genotipos, aun siendo cultivado en las mismas condiciones climáticas las plantas presentan un comportamiento distinto en el desarrollo de las plantas. López et al. (2013) evaluaron el comportamiento de diferentes cultivares de nopal (nopal verdura, nopal tunero sin semilla, nopal tunero verde y rojo) bajo condiciones climáticas diferentes al sitio de cultivo, determinando respuestas estadísticamente significativas para grosor, ancho, largo y emisión de brotes en el municipio de Paso de Ovejas en Veracruz. Por otro lado, Soriano y Orihuela en el 2008 al utilizar cladodios completos y fracciones de estos en el establecimiento de plantaciones, determinaron que existe un retraso de al menos 3 meses en la emisión de brotes al establecer plantas a partir de cladodios completos en comparación con las establecidas a partir de fracciones de estos. Por lo tanto, es importante que se continúe evaluando el comportamiento de las plantas en las condiciones controladas en el invernadero.

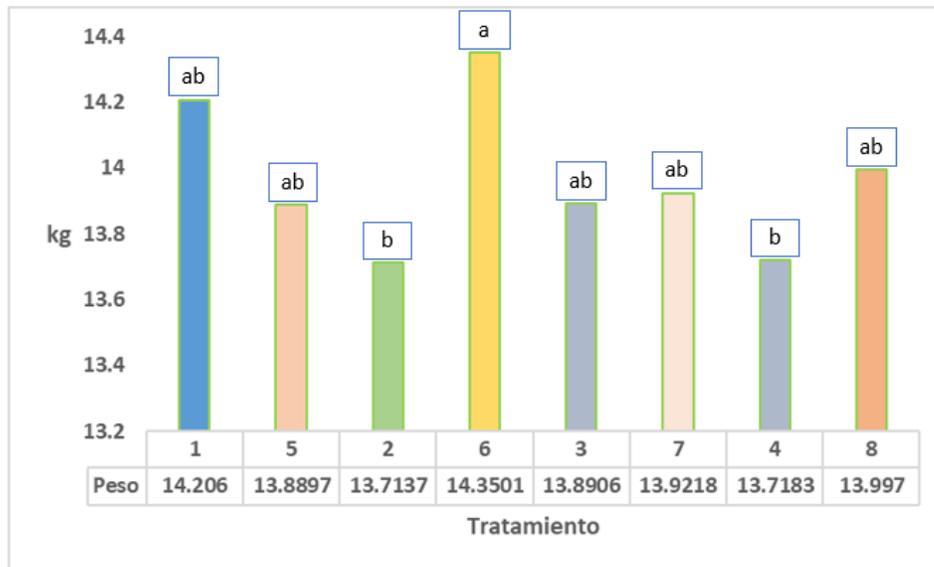


Figura 20. Valores promedio a través de las tres evaluaciones: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación. Peso de cladodios de nopal tunero cultivar Alfajayucan evaluadas en condiciones de invernadero (1. Plantas sanas + SN al 50%; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2, Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca^{2+} y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca^{2+} 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua

Discusión para la variable Largo de cladodios

En la Figura 21 es posible observar que los tratamientos en donde se usaron plantas engrosadas (5, 6, 7 y 8) presentan un largo menor a los tratamientos usando plantas sanas (1, 2, 3 y 4). La disminución en el largo de los cladodios sugiere que las plantas afectadas por el engrosamiento manifiestan reducción en tamaño (enanismo), acorazonamiento y un severo retraso en el crecimiento (Salgado et al., 2020), en comparación con cladodios sanos. La disminución en crecimiento de los cladodios probablemente se debe a que al incrementar el tejido parenquimatoso del cultivo los tejidos de conducción tienden a colapsar (Valadez et al., 2021), dificultando así el transporte de minerales desde el suelo a los tejidos donde se requiere. Cuando los tejidos de conducción no funcionan adecuadamente el cultivo comienza a presentar un decremento en su desarrollo y/o síntomas de marchitez.

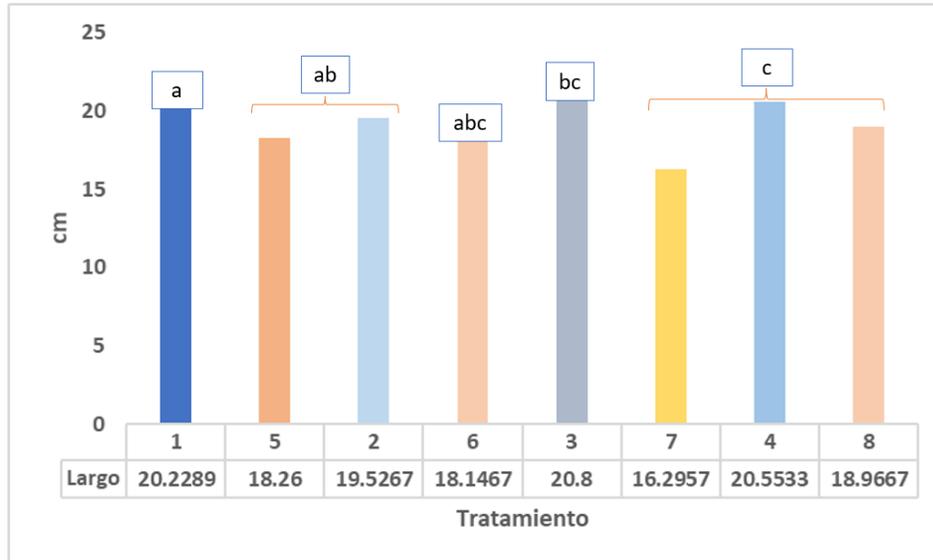


Figura 21. Valores promedio a través de las tres fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación. Largo de nopal tunero cultivar Alfajayucan evaluadas en condiciones de invernadero (1. Plantas sanas + SN al 50 %; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2. Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺ y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺ 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua).

Discusión para la variable Ancho de cladodios

En la figura 22 se observa que los tratamientos con mayor ancho promedio están presentes en los tratamientos 5 (20.23 cm) y 8 (20.37); los cuales corresponden a cladodios con presencia de engrosamiento, de la misma forma que los tratamientos 6 (18.10 cm) y 7 (18.66 cm) en los cuales la enfermedad también estaba presente. Este comportamiento distinto entre tratamientos con cladodios enfermos es posible explicarlo por el manejo aplicado entre las huertas donde se recolectó el material vegetal. Es decir, en las huertas con un manejo químico no se realizaban podas severas, como es el caso de la huerta orgánica; esto con la finalidad de inducir mayor proliferación de brotes nuevos esperando fueran sanos (Comunicación personal de los productores de las parcelas muestreadas). También es observable que los tratamientos en donde se establecieron las plantas sanas (1, 2, 3 y 4) presentan una media superior a la encontrada en los tratamientos (6 y 7), quizá debido al manejo (podas), las diferentes edades y distribución aleatorizada de plantas en los tratamientos. Existiendo mucha variación en los datos analizados.

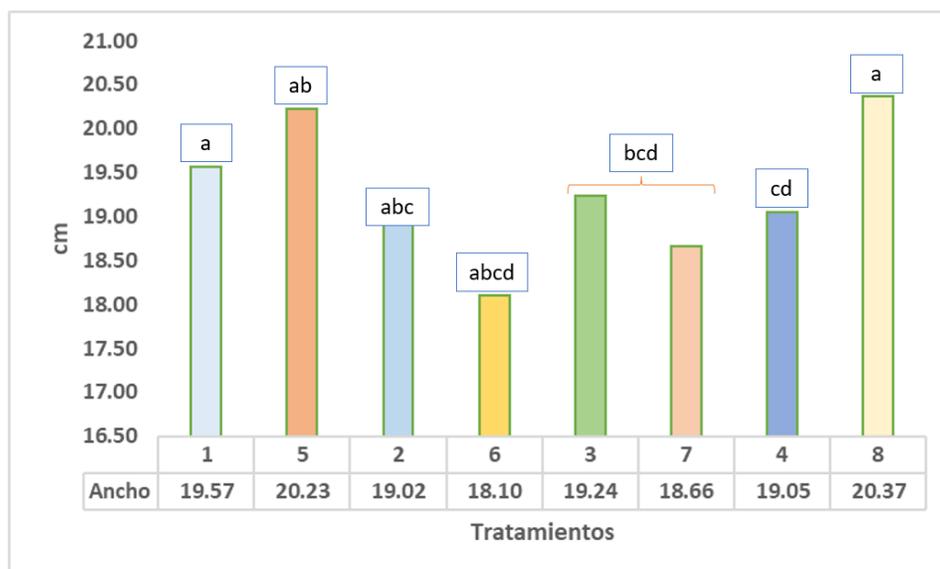


Figura 22. Valores promedio a través de las tres fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación. Ancho de cladodios de nopal tunero cultivar Alfajayucan evaluadas en condiciones de invernadero (1. Plantas sanas + SN al 50%; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2, Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺ y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺ 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua)

Discusión para la variable Grosor de cladodios

En la figura 23 se aprecia la tendencia en que los tratamientos 5, 6, 7 y 8 presentan un grosor superior al de los tratamientos 1, 2, 3, y 4; este comportamiento es probable que se deba a que los tratamientos del 5 al 8 provienen de plantas con síntomas de engrosamiento del cladodio. Estas alteraciones producidas en los cultivos se deben a que probablemente existe un desbalance hormonal que se manifiesta con disminución en el crecimiento (enanismo) y amarillamiento (Camarena y Torres, 2008). Valadez et al. (2021) encontraron una tendencia en donde el ácido giberélico (13.1%) se encontraba en mayor concentración que el ácido abscísico (36.4%) y en ácido indol acético (26.3%) en plantas con engrosamiento. Así como un decremento estadísticamente significativo para los nutrimentos N (67.6%), K (68.3%), Na (55.3) y Zn (36.2 %); mientras que para los elementos P (67.6%), Ca (68.3%), Mg (55.3 %), Mn (55.3%) y Fe (36.2%) se encontraron en concentraciones superiores en plantas engrosadas en comparación con la tendencia mostrada en cladodios no engrosados en donde los iones en mayor concentración fueron el K, Ca, N, Mn, Na y P (mayor a menor concentración “K>Ca”); así como hipertrofia e hiperplasia de tejidos engrosados.

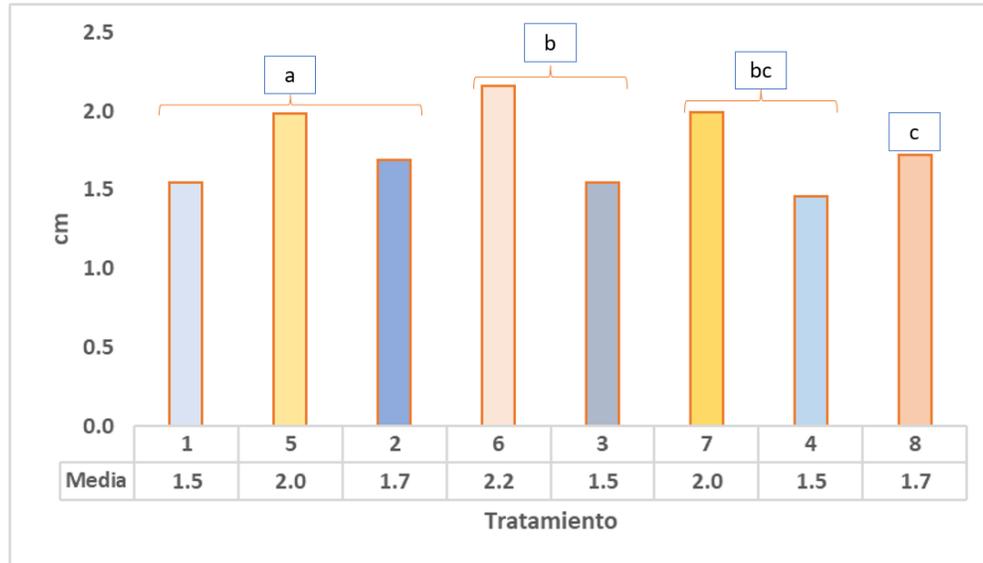


Figura 23. Valores promedio a través de las tres fechas de evaluación: 60, 80 y 90 días después de la primera aplicación. Ancho de nopal tunero cultivar Alfajayucan evaluadas en condiciones de invernadero (1. Plantas sanas + SN al 50 %; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2. Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca^{2+} y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca^{2+} 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua

Número de brotes emitidos a los 90 días

En la figura 24 se aprecia el comportamiento de las plantas presentes en cada uno de los tratamientos a los 90 días después de haber realizado la primera aplicación de las soluciones nutritivas correspondientes. Se observa que la emisión de brotes es mayor en los tratamientos donde se encuentran establecidas plantas asintomáticas; pudiéndose apreciar que en el tratamiento 1 se emitieron brotes en 80% de las plantas comprendidas en el mismo, aun cuando el tamaño y aparición de los brotes fue 16 días después con respecto al tratamiento 3 (plantas sanas +100 con 400 ppm de Ca^{2+}). Mientras que los tratamientos (4 y 8) en donde se aplicó solo agua, la emisión de brotes fue la mínima en todo el experimento.

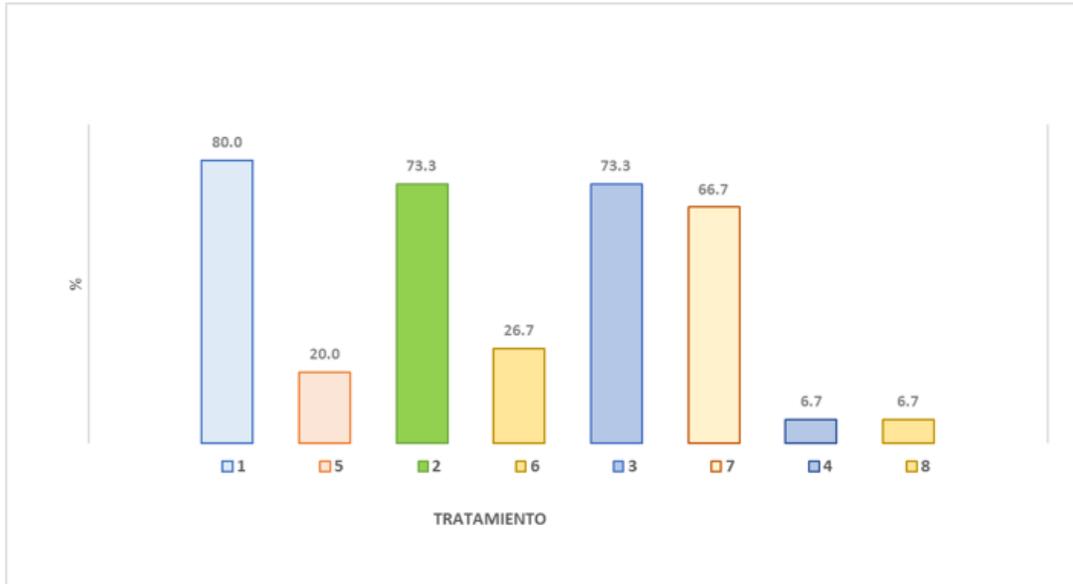


Figura 24. Comparación porcentual de brotes totales emitidos a los 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos (1. Plantas sanas + SN al 50 %; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 2, Plantas sanas + SN al 100%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%, 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca^{2+} y 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca^{2+} 4. Plantas sanas + agua y 8. Plantas engrosadas + agua) al cultivo de nopal tunero.

En los cuadros 9 y 10 se aprecia la emisión y tamaño de los brotes a los 90 días después de haber realizado la primera aplicación con los tratamientos.

Cuadro 9. Comportamiento de los tratamientos (1, 2, 3 y 4) a los 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos.

T	Plantas por tratamiento		
1			
2			
3			
4			

T: Tratamientos; 1. Plantas sanas + SN al 50 %; 2. Plantas sanas + SN al 100%; 3. Plantas sanas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺; 4. Plantas sanas + agua; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%; 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺ y 8. Plantas engrosadas + agua.

Cuadro 10. Comportamiento de los tratamientos (5, 6, 7 y 8) a los 90 días después de la primera aplicación de los tratamientos.

T	Plantas por tratamiento		
5			
6			
7			
8			

T: Tratamientos; 5. Plantas engrosadas + SN al 50%; 6. Plantas engrosadas + SN al 100%; 7. Plantas engrosadas + SN al 100% con 400 ppm de Ca²⁺ y 8. Plantas engrosadas + agua.

En la figura 25 se observa el tratamiento 5 correspondiente a plantas enfermas con la solución nutritiva al 50%; en la cual se aprecian ligeros síntomas de engrosamiento



Figura 25. Síntomas de engrosamiento en el tratamiento 5 (Plantas enfermas +SN al 50%); Brotes dobles y el cladodio señalado presenta una ligera distorsión en la parte apical del brote.

En la figura 26 se observan cladodios con síntomas de engrosamiento y a las cuales se les está aplicando el tratamiento 6 (SN al 100%).



Figura 26. Síntomas de engrosamiento en el tratamiento 6 (Plantas enfermas +SN al 100%); A). Aparición de brote curvado en cara lateral del cladodio, B) Cladodio curvado y C) Cladodios con brotes dobles.

En la figura 27 se observan cladodios con síntomas de engrosamiento y a las cuales se les está aplicando el tratamiento 7 (SN al 100%+400 ppm de Ca^{2+}).

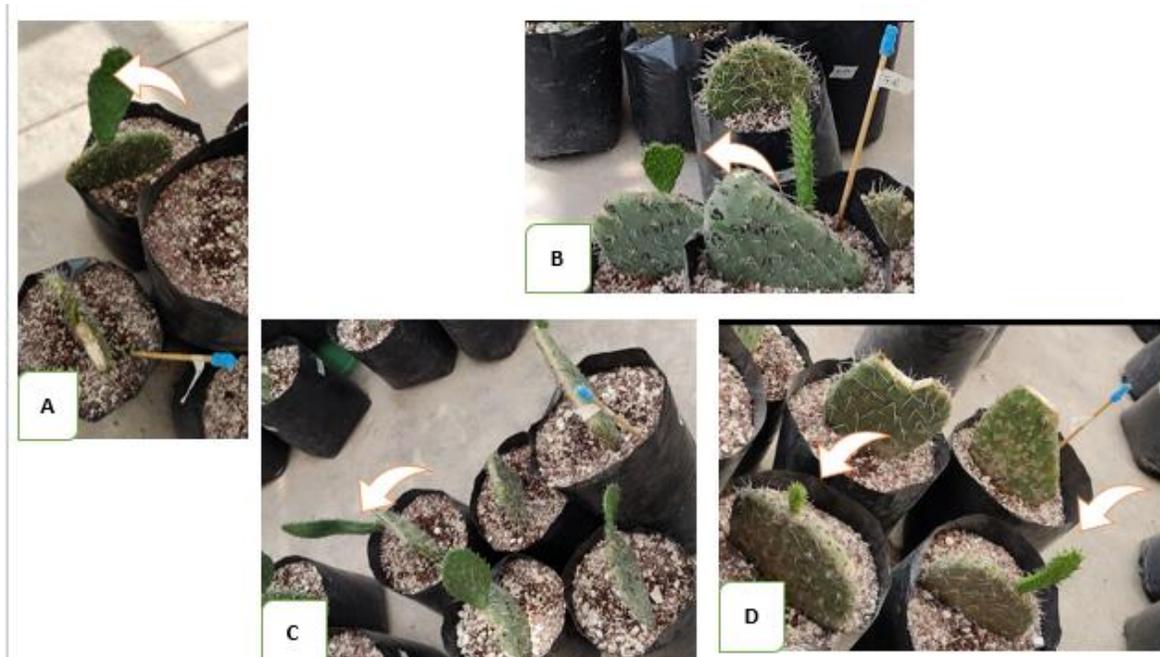


Figura 27. Síntomas de engrosamiento en el tratamiento 7 (SN al 100% con 400 ppm de Ca^{2+}); A) Deformación de cladodio, B) Acorazonamiento del brote, C) Gravitropismo positivo en el brote y D) Deformación de brotes.

Identificación molecular

Integridad de ADN extraído

Debido a que el nopal es una planta que presenta una cantidad considerable de polisacáridos, el proceso de extracción y purificación del DNA es complicado. En esta investigación se extrajo el DNA de tejido liofilizado y resultó bastante laborioso, debido a que los polisacáridos se concentraron aún más que en tejido fresco, como era de esperarse.

La cantidad de DNA finalmente obtenida fue baja para la mayoría de las muestras, pero su calidad fue la adecuada para realizar las evaluaciones con PCR (Relación 260/280 \geq 1.8). En el Cuadro 11 se muestran algunos de los resultados emitidos por el espectrofotómetro que indican la calidad de DNA.

Cuadro 11. Lecturas realizadas para la determinación de calidad en el espectrofotómetro en muestras de DNA de cladodios de Opuntia.

Muestra	Concentración (ng/uL)	Relación	
		260/280	260/230
6	34.91	1.69	1.01
9	58.3	1.18	0.2
10	46.89	1.36	0.12
12	61.47	1.85	0.81
20	61.89	1.71	0.34
24	93.71	1.2	0.83
39	104.91	1.25	0.75
44	112.84	1.25	0.18

PCR

Para la detección de la presencia de fitoplasmas en cladodios de nopal con y sin engrosamiento, se realizó la primera amplificación con PCR con primers P1 y P7 y mostraron amplificación 19 de las 44 muestras analizadas. En el gel de la Figura 28 se aprecia un barrido inferior de 1500 pb que es lo habitual en este tipo de amplificación. En el gel, las muestras que mostraron amplificación fueron tanto sanas (pozos 1 al 21) como enfermas (pozos 22-44). Con base en estos resultados es posible inferir que el par de iniciadores P1-P7 quizá reconozca varios tipos de fitoplasmas presentes en el tejido del cultivo de nopal.

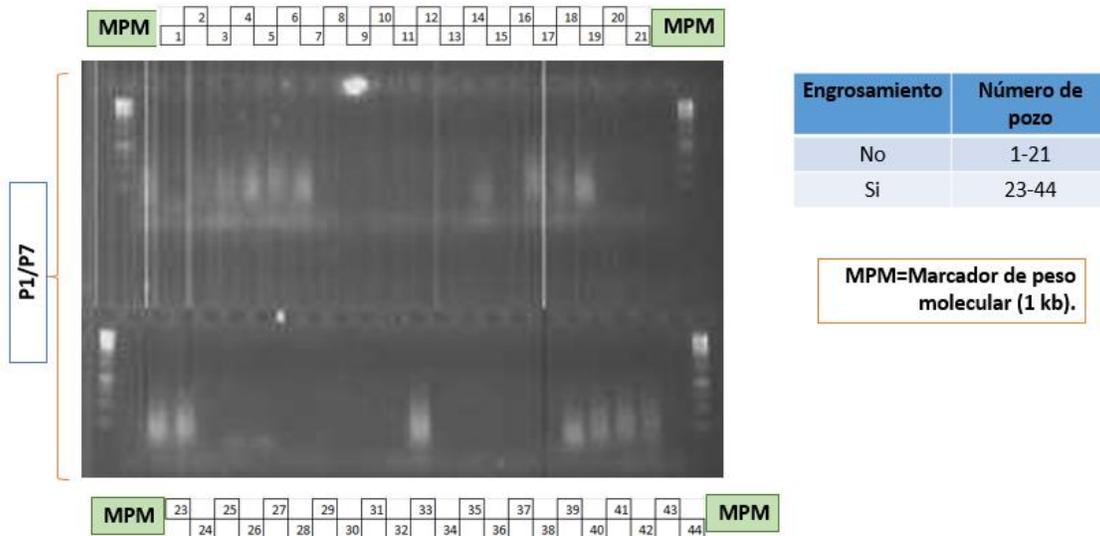


Figura 28. Amplificaciones en 44 muestras de cladodios con los primers P1 y P7 en gel de agarosa al 1.5 %.

PCR Anidada

Una vez obtenidos los productos de la primer PCR, se realizó la segunda amplificación con los primers R16F2/R16R2 que son específicos para la detección del *Candidatus phytoplasma*, que es uno de los microorganismos que se ha asociado al engrosamiento del cladodio del nopal. Los resultados obtenidos indicaron que 7 de las muestras sanas (muestras 1, 3, 4, 6, 7, 14 y 17) y tres de las engrosadas (muestras 24, 25 y 43) presentaron una banda de DNA de aproximadamente 1200 pb, lo que hace referencia al fragmento esperado (Figura 29)

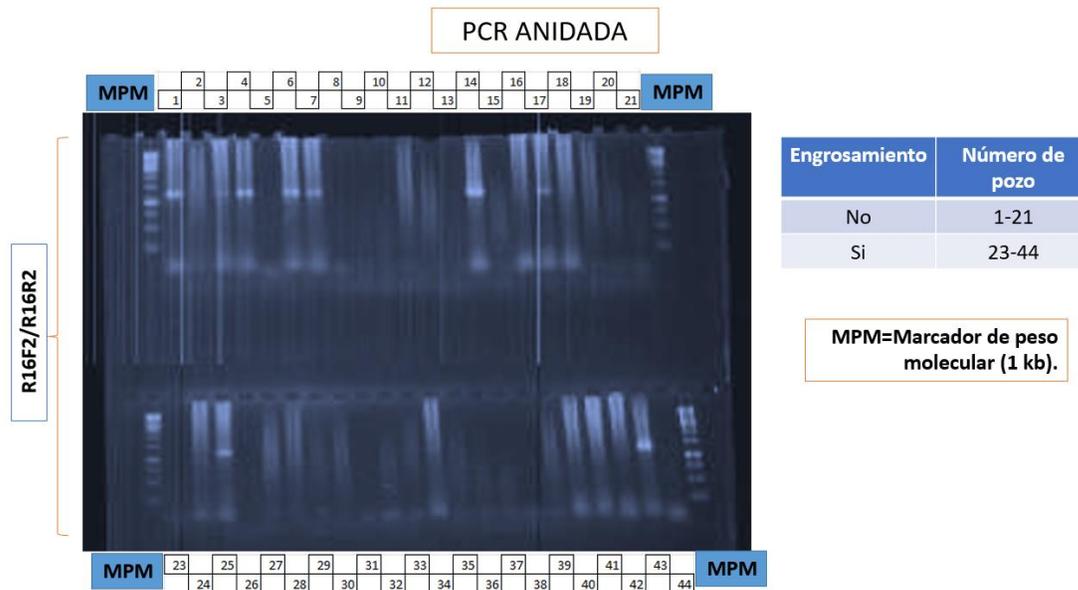


Figura 29. Amplificación anidada en muestras de cladodios con los primers R16F2/R16R2 en gel de agarosa al 1.5 %. en donde se muestra un fragmento de aproximadamente 1200 pb y que corresponde a la presencia de fitoplasmas.

La presencia de estas bandas en ambos tipos de muestras (sanas y enfermas) sugiere que la presencia de estos microorganismos no necesariamente sean la causa del problema del engrosamiento. Suaste (2012) encontró en muestras asintomáticas de nopal tunero la presencia de fitoplasmas. Nuestros resultados también coinciden con los reportados por Mendoza en el 2016, quienes detectaron la presencia de fitoplasmas en cladodios sanos y enfermos de nopal *Opuntia ficus-indica* cultivar Villanueva, y que posteriormente mediante un análisis RFLP, determinaron que pertenecían a los grupos 16SrI, 16SrII y 16SrIII.

Estos hallazgos en el presente estudio, así como en otros reportados, probablemente estén indicando que no necesariamente los fitoplasmas encontrados y asociados a la sintomatología del engrosamiento sean los responsables de la enfermedad; sino que este tipo de microorganismos pueden estar formando parte del microbioma endófito propio de este tipo de plantas que se desarrollan en una zona geográfica y en un ambiente determinados (Fonseca-García et al. 2016). Por otro lado, también es razonable considerar que la baja concentración de los

fitoplasmas que pudieran estar presentes en los tejidos los hace indetectables; o bien, a que los microorganismos tienen la capacidad de desplazarse a órganos diferentes con la finalidad de sobrevivir cuando existen condiciones adversas para ellos. Seemüller, (2004) hace referencia a que en la enfermedad conocida como declinamiento del peral se manifiesta un comportamiento similar: cuando existen bajas temperaturas los fitoplasmas se desplazan a las raíces, por lo que su detección en tallos no es posible, haciendo posible su detección en raíces solo en primavera cuando existen síntomas de la enfermedad. En el caso de esta investigación, solo se muestrearon cladodios en época de verano.

Secuenciación

Se obtuvieron las secuencias de los 10 resultados positivos referentes a la detección con PCR del fragmento esperado de alrededor de 1200 pb. Seis de esas secuencias fueron útiles para lograr identificar al microorganismo detectado. Al realizar la comparación de las secuencias en la base de datos del NCBI (Figura 30) para las muestras seleccionadas, se determinó que las secuencias presentaban un porcentaje de similitud de 99.89% con *Cucumis sativus*, que es un fitoplasma del grupo *Candidatus Phytoplasma*.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓ 'Cucumis sativus' flat stem phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	'Cucumis sativus'...	1736	1736	100%	0.0	99.89%	1236	MZ918993.1
✓ 'Hevea brasiliensis' phytoplasma isolate RRII 105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	'Hevea brasiliensis'...	867	867	100%	0.0	83.44%	1215	KP025809.1
✓ Phytoplasma sp. RYL-GD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Phytoplasma sp. ...	760	760	99%	0.0	81.54%	1527	EU093079.1
✓ Brinjal little leaf phytoplasma clone TN-37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Brinjal little leaf p...	610	610	87%	5e-174	80.29%	1375	KP027520.1
✓ Lethal wilt oil palm phytoplasma clone LWP-16S23S-P4P1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lethal wilt oil pal...	603	603	89%	8e-172	79.86%	1479	KP702114.1
✓ Brinjal little leaf phytoplasma clone AP-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Brinjal little leaf p...	599	599	87%	1e-170	80.00%	1372	KP027515.1
✓ Brinjal little leaf phytoplasma clone TN-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Brinjal little leaf p...	542	542	89%	2e-153	78.65%	1420	KP027525.1
✓ Brinjal little leaf phytoplasma clone TN-45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Brinjal little leaf p...	523	523	89%	6e-148	78.21%	1394	KP027526.1
✓ 'Berberis vulgaris' flatten stem phytoplasma isolate Tehran 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	'Berberis vulgaris'...	505	505	82%	2e-142	78.75%	1246	KX370818.1
✓ 'Prunus armeniaca' apple proliferation phytoplasma isolate ESFY-Ch 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S rbo...	'Prunus armenia...	488	488	87%	2e-137	77.87%	1640	MG748694.1
✓ Candidatus Phytoplasma prunorum isolate ESFY-F2nR2-c2_SP6_Plate_1_8 16S ribosomal RNA gene, partial se...	Candidatus Phyt...	488	488	87%	2e-137	77.87%	1242	MH279543.1
✓ Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene isolate Trzebnica	Candidatus Phyt...	488	488	87%	2e-137	77.87%	1609	LT746087.1

Figura 30. Búsqueda de secuencias en la base de datos del National Center of Biotechnology information (NCBI).

CONCLUSIONES

Se apreció un comportamiento estadísticamente significativo en las variables evaluadas, sin embargo, para las variables Peso y Grosor en cladodios sanos y enfermos los tratamientos 5, 6, 7 y 8 presentan medias superiores. Mientras que para la variable Largo se observa un comportamiento inverso en los tratamientos 1, 2, 3 y 4. Por otro lado, hubo una respuesta positiva para la emisión de brotes en plantas sanas y enfermas en todas las soluciones nutritivas; pero las plantas sanas expuestas a la solución nutritiva al 100% adicionada con 400 ppm de Ca^{2+} la emisión de brotes se presentó en primer lugar en tiempo, seguido de la solución nutritiva al 100% en plantas sanas. Debido a que el crecimiento del cultivo es lento, es necesario continuar evaluando durante al menos un año más para determinar si existe correlación entre la nutrición y la manifestación del engrosamiento. Además de que se logró identificar mediante identificación molecular al fitoplasma *Cucumis sativus* del grupo *Candidatus* Phytoplasma en plantas con y sin engrosamiento provenientes del valle de México. Lo cual sugiere que estos microorganismos están presentes de manera endófito en el cultivo de nopal tunero y se pone en duda que sean los causantes del engrosamiento del cladodio de nopal.

LITERATURA CITADA

- Alonso Barrera, B., Mora Aguilera, G., Valdovinos Ponce, G., Ochoa Martínez, D. L., Rodríguez Leyva, E., Tlapal Bolaños, B., & Torre-Almaraz, R. D. L. (2015). Asociación de un Potexvirus como Agente Causal de Manchas Cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 75-86.
- Andrade, J. L., De la Barrera, E., García, C. R., Ricalde, M. F., Soto, G. V., & Cervera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (81), 37-50.
- Arango, C. H. M. (2018). Evaluación de métodos de propagación asexual del nopal (*Opuntia ficus indica*), y respuesta a diferentes sustratos en el municipio los santos Santander. *Agricolae & Habitat*, 1(1).
- Avina-Padilla, K., Parra-Cota, F., Ochoa-Sánchez, J. C., Perales-Segovia, C., & Martínez-Soriano, J. P. (2009). Phytoplasmas associated to diseases of ornamental cacti in Mexico. *Journal of Biological Sciences*, 9(3), 268-271.
- Baker, GC, Smith, JJ y Cowan, DA (2003). Revisión y nuevo análisis de cebadores 16S específicos de dominio. *Diario de métodos microbiológicos*, 55 (3), 541-555.
- Bertaccini A, Calari A, and Felker P. 2007. Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bulletin of Insectology* 60:257-258.
- Badii, M. H., & Flores, A. E. (2001). Prickly pear cacti pests and their control in Mexico. *Florida Entomologist*, 503-505.
- COMITÉ ESTATAL DE SANIDAD VEGETAL DEL ESTADO DE MÉXICO (CESAVEM), 2013. Cuida tu producción de nopal y tuna. SAGARPA, Toluca, Toluca estado de México.
- CONAZA, 2018 <https://www.gob.mx/conafor/articulos/las-zonas-aridas-son-mas-que-desierto#:~:text=Los%20ecosistemas%20%C3%A1ridos%20y%20semi%20%C3%A1ridos,en%20ese%20tipo%20de%20ecosistemas.>

- Del Rosario Rodicio, M., & del Carmen Mendoza, M. (2004). Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 22(4), 238-245.
- De La Torre-Almaráz, R., Salgado-Ortíz, H., Salazar-Segura, M., Pallás, V., Sánchez-Navarro, J. A., & Valverde, R. A. (2016). First report of Schlumbergera virus X in prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico. *Plant Disease*, 100(8), 1799.
- Dzul, A. S., Martínez, R. I. R., Martínez, D. O., Mejía, E. Z., Brito, D. P., Juárez, C. H., & Martínez, D. R. (2012). Virus associated with thickening of the cladodes of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* Mill.). *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(4), 100-107.
- Felker, P., Bunch, R., Russo, G., Preston, K., Tine, J. A., Suter, B., ... & Yim, W. C. (2019). Biology and chemistry of an Umbravirus like 2989 bp single stranded RNA as a possible causal agent for Opuntia stunting disease (engrosamiento de cladodios)-A Review. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 21, 1-31. Consultado en: <http://www.jpacd.org/jpacd/article/view/3>. Fecha de consulta: 03 de mayo del 2020.
- Fernández, F. D. (2015). Caracterización molecular y epidemiología de fitoplasmas pertenecientes al grupo 16Sr XIII (Mexican periwinkle virescence group; MPV) presentes en la Argentina.
- Fox, GE, Wisotzkey, JD y Jurtshuk Jr, P. (1992). Qué tan cerca es cerca: la identidad de la secuencia del ARNr 16S puede no ser suficiente para garantizar la identidad de la especie. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*, 42 (1), 166-170.
- Flores Flores, R. (2012). IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS A LA MANCHA NEGRA DEL NOPAL (*Opuntia ficus-indica* Mill) Y SU SENSIBILIDAD AL QUITOSANO.
- Fucikovsky ZL, Yanez MM de J, Alanis M. I., and Gonzalez pe. 2011. new hosts of 16srl phytoplasma group associated with edible *Opuntia ficus-indica* crop

- and its pests in Mexico. *African journal of microbiology research* 5:910-918.
<https://doi.org/10.5897/ajmr10.846>
- Gallegos, V.C., Mendez, G.S de I., y Mondragón, j.c. 2013. Producción sustentable de tuna en San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados, Fundación Produce San Luis Potosi. S.L.P. México. 187 p.
- Guzmán Loayza, D., & Chávez, J. (2007). Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(1), 41-45.
- Hemmati, C., Al-Subhi, AM, Al-Housni, M. y Al-Sadi, AM (2020). Primer informe de un fitoplasma del subgrupo 16SrIII-D asociado con la enfermedad fasciada de *Opuntia cylindrica* en Omán. *Planta Dis* , 105.
- HERNÁNDEZ GÓMEZ, M. F, (2017). Identificación de la especie del picudo que afecta a la espina del nopal (*Opuntia-ficus indica*) en el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México.
- Hernandez-Perez, R., Noa-Carrazana, J. C., Gaspar, R., Mata, P., & Flores-Estevez, 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.
- Hogenhout, SA, Oshima, K., AMMAR, ED, Kakizawa, S., Kingdom, HN y Namba, S. (2008). Fitoplasmas: bacterias que manipulan plantas e insectos. *Patología vegetal molecular* , 9 (4), 403-423.
- Jones, C. y Jacobsen, J. (2005). Nutrición vegetal y fertilidad del suelo. *Módulo de gestión de nutrientes*, 2 (11), 1
- Judith, O. M. (2015). Tolerancia genética de los nopales, *Opuntia* sps., cultivados en Jalisco, a la enfermedad “mancha negra” producida por *Pseudocercospora opuntiae*.
- Kostman, TA, Tarlyn, NM, Loewus, FA y Franceschi, VR (2001). La biosíntesis del ácido L-ascórbico y la conversión de los carbonos 1 y 2 del ácido L-ascórbico en ácido oxálico se produce dentro de idioblastos de cristal de oxalato de calcio individuales. *Fisiología vegetal*, 125 (2), 634-640.

- Kuboyama, T., Huang, CC, Lu, X., Sawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., ... y Namba, S. (1998). Un plásmido aislado del fitoplasma amarillento de cebolla fitopatógeno y su heterogeneidad en el fitoplasma mutante patógeno. *Interacciones moleculares planta-microbio*, 11 (11), 1031-1037.
- Langdon, R. (2008). Fertilizers: properties, applications and effects. Nova Science Pub Inc
- Lee I. M., R. E. Davis and D. E. Gundersen-Rindal (2000) Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology* 54:221-255
- Lobos, E., Passos de Silva, D. M., Mena-Covarrubias, J., Lagarzo, G., & Varone, L. (2013). Principales insectos plaga de las Opuntias en Argentina, México y Brasil. *CactusNet Newsletter*, 13, 137-158.
- López Collado, C. J., Malpica Vázquez, A., López Collado, J., García Pérez, E., & Sol Sánchez, Á. (2013). Crecimiento de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. en la zona central de Veracruz. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(SPE5), 1005-1014.
- Magro, S., & Pérez Maurice, M. B. (2017). Evaluación de nopales (*Opuntia ficus indica*) como fuente de calcio.
- Martínez-Salgado, F., Pérez-Moreno, J., Ochoa-Martínez, D. L., Rojas-Martínez, R. I., & Arellano-Ostoa, G. (2020). Etiología del engrosamiento del cladodio de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica* (L.) mill.) en México. *Agrociencia*, 54(4), 521-530.
- Mendoza, A. V., Hernández, A. F., & Suárez, J. B. (2008). DINÁMICA DE LAS PRINCIPALES PLAGAS DE NOPAL *Opuntia spp.* EN LA ZONA SEMIÁRIDA DE QUERÉTARO. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 7(1), 21-27.
- Mendoza Orozco, M. E. (2016). Acorazonamiento de cladodios en sistemas productivos de nopal *Opuntia sp* (Master's thesis, La autora).
- Mo, X. H., Qin, X. Y., Wu, J., Yang, C., Wu, J. Y., Duan, Y. Q., ... & Chen, H. R. (2003). Complete nucleotide sequence and genome organization of a

- Chinese isolate of tobacco bushy top virus. Archives of virology, 148(2), 389-397.
- Monje, J. L., & Lara, L. F. (2019). Revisión: Genómica de las interacciones entre fitoplasmas, hospederos vegetales e insectos vectores. BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS, 143-165.
- Ochoa, M. J., Rivera-López, L., & Gómez-Leyva, J. F. (2016). Método de selección en explantes in vitro de *Opuntia* sps. con resistencia a la mancha negra causada por *Pseudocercospora opuntiae*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo, 48(1), 21-31.
- Pablo Ríos, N. P., Hernández Tapia, A., & Cruz Rodríguez, J. A. (2015). Efecto del sombreado en el ataque del picudo (*Cactophagus spinolae*) en plantas de pitayo (*Stenocereus stellatus*) en Pizotlán, Morelos, México. In V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA (7 al 9 de octubre de 2015, La Plata).
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 31, 535-546.
- Panyagua, 2019. Manejo integrado del engrosamiento del cladodio en tres cultivares de nopal tunero en Teotihuacán, estado de México. Colegio de Posgraduados. Texcoco Edo. de México.
- Pimienta BE 1990. El nopal tunero. Primera edición. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara, Jalisco, México. 246 p.
- Quezada Salinas, A., Sandoval Islas, J. S., Alvarado Rosales, D., & Moreno Velázquez, M. (2013). Histopatología y patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal. Revista mexicana de micología, 38, 9-18.
- Torre-Almaraz, R. D. L., Salazar-Segura, M., & Ruiz-Medrano, R. (2007). Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. Agrociencia, 41(7), 763-773.
- Saenz, C. 2006. Utilización agroindustrial de nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, Producción y Protección vegetal, 162. Roma. ISSN 1020-4334.

- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., & Casas-Flores, S. (2011). Colonization of *Arabidopsis* roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 15-26.
- Santiago-Lorenzo, M., López-Jiménez, A., Saucedo-Veloz, C., Cortés-Flores, J. I., Jaén-Contreras, D., & Suárez-Espinosa, J. (2016). Nutritional composition of tender cactus stems produced under mineral and organic fertilization. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(4), 403-407.
- SADER, (2020). Panorama nacional de la mancha negra del nopal (*Pseudocercospora opuntiae*). Análisis estratégico de riesgos sanitarios
- Scheinvar, L., Olalde-Parra, G., & Gallegos-Vázquez, C. (2015). A new species of the genus *Opuntia* (Cactaceae) for the state of Veracruz, Mexico. *Botanical Sciences*, 93(1), 33-39.
- 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. Informe detallado.
- Seemüller, E. y Schneider, B. (2004). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' y 'Candidatus Phytoplasma prunorum', los agentes causales de la proliferación de manzanas, el declive de las peras y el amarillo de las frutas de hueso europeas, respectivamente. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*, 54 (4), 1217-1226.
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. In 6. *International Congress on Soilless Culture, Lunteren (Netherlands), 29 Apr-5 May 1984*. ISOSC.
- SIAP (Agricultural and Fishery Information System). 2020. secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. Consultado en: https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/. Fecha de consulta: 2 de noviembre del 2021.

- Smith, CJ y Osborn, AM (2009). Ventajas y limitaciones de los enfoques basados en PCR cuantitativa (Q-PCR) en ecología microbiana. *FEMS microbiología ecología*, 67 (1), 6-20.
- Solano, J. y Orihuela, A. (2008). Supervivencia y Producción de Brotes de Tuna (*Opuntia ficus-indica*) Utilizando Fracciones Mínimas. *Diario de la Asociación Profesional para el Desarrollo de Cactus*, 10 , 198-208.
- Suaste Dzul, A., Rojas Martínez, R. I., Zavaleta Mejía, E., & Pérez Brito, D. (2012). Molecular Detection of Phytoplasmas in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) with Thickening of the Cladode. *Revista mexicana de fitopatología*, 30(1), 81-85.
- Vanegas-Rico, J. M., Lomeli-Flores, J. R., Rodríguez-Leyva, E., Mora-Aguilera, G., & Valdez, J. M. (2010). Enemigos naturales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller en el centro de México. *Acta zoológica mexicana*, 26(2), 415-433.
- Valadez-Moctezuma, E., Ramírez-Alba, N. A., Sánchez-Ávila, A. S., Samah, S., Valdovinos-Ponce, G., & Soto-Hernández, R. M. (2021). Histological, hormonal and nutritional changes in *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes with thickening symptoms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115, 101688.
- Valdelamar, L. M. M., Díaz, A. S., & Flores, R. C. (2011). Secuenciación de fragmentos de ADN.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. y Kahl, G. (2005). Toma de huellas dactilares de ADN en plantas: principios, métodos y aplicaciones. Prensa CRC.
- Zambrano Uribe, JC (2008). Amplificación, secuenciación y clonación de regiones de los genes 16S-23S rRNA del cromosoma del fitoplasma que infecta *Fraxinus* sp. en Bogotá, Colombia.
- Zimmermann, H. G., Sandí, M. P., & Rivera, A. B. (2005). La situación de *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) en el Caribe y la posibilidad de su diseminación a México. *Informe para el Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA), Departamento de Cooperación Técnica y*

*División Conjunta FAO/OIEA y la Dirección General de Sanidad Vegetal
(DGSV-SAGARPA) como parte del. I*

**CAPITULO III. IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN
NOPAL TUNERO CON Y SIN SÍNTOMAS DE ENGROSAMIENTO EN EL VALLE
DE MÉXICO.**

**CHAPTER III. IDENTIFICATION OF MICROORGANISMS PRESENT IN
PRICKLY PEAR CACTUS WITH AND WITHOUT SYMPTOMS OF CACTUS
THICKENING IN THE VALLEY OF MEXICO.**

Samuel Tetla Solano¹, Ernestina Valadez-Moctezuma²

Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma de Chapingo
Texcoco Estado de México.

Keywords

Cladode thickening, identification, PCR.

Palabras clave

Engrosamiento del cladodio, identificación, PCR.

Abstract

The prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*) represents a production alternative for Mexico in areas with low water availability and soils unsuitable for agriculture. In the country, the state of Mexico is the main producer of prickly pear cactus, with the Alfajayucan cultivar standing out, whose characteristics in size, flavor, size and scarce seeds have made it a crop with good acceptance in the market. However, this cultivar is more prone to contract the disease called cladode thickening. This disease manifests itself with a thickening, yellowing and decrease in the growth of the cladodes, as well as the proliferation of small, tasteless fruits on the lateral faces of the stalks. This problem has been studied for more than three decades, associating the disease to phytoplasmas and viruses. However, the determination of the causal agent is not clear. To provide information on this pathology, an experiment was established in which cladodes with and without symptoms of

thickening in the valley of Mexico were subjected to molecular detection of phytoplasmas with specific primers for PCR and nested PCR, as well as sequencing of the amplified products of nested PCR. When these sequences were compared with the NCBI database, 99.89% similarity was found with *Cucumis sativus*, which is a phytoplasma of the *Candidatus phytoplasma* group.

Resumen

El nopal tunero (*Opuntia ficus-indica*) representa para México una alternativa de producción en zonas con baja disponibilidad hídrica y suelos no aptos para la agricultura. En el país el estado de México es el principal productor de Tuna, destacando en este la producción del cultivar Alfajayucan cuyas características en tamaño, sabor, tamaño y semillas escasas lo han convertido en un cultivo con buena aceptación en el mercado. Sin embargo, este cultivar es más propenso a contraer la enfermedad denominada como engrosamiento del cladodio. Esta enfermedad se manifiesta con un engrosamiento, amarillamiento y disminución en el crecimiento de los cladodios; así como en la proliferación de frutos pequeños e insípidos en las caras laterales de las pencas. Este problema se ha estudiado desde hace más de tres décadas asociando la enfermedad a fitoplasmas y virus. No obstante, la determinación del agente causal no es clara. Para aportar información ante esta patología, se estableció un experimento en donde cladodios con y sin síntomas de engrosamiento provenientes del valle de México, se les realizó la detección molecular de fitoplasmas con iniciadores específicos para PCR y PCR anidada, así como la secuenciación de los productos amplificados de PCR anidada. Al comparar estas secuencias con la base de datos del NCBI se encontró un 99.89% de similitud con *Cucumis sativus* que es un fitoplasma del grupo *Candidatus phytoplasma*

Introducción

El cultivo de nopal tunero en México es una alternativa de producción en zonas áridas y semiáridas, debido a que presenta adaptaciones biológicas que facultan su adaptación y desarrollo en condiciones extremas. Algunas de ellas son la presencia de hojas modificadas en forma de espina que reducen la evapotranspiración,

además de un tipo de metabolismo conocido como CAM (Crassulacean Acid Metabolism), el cual se caracteriza por presentar dos fases (oscura y luminosa). Así mismo, su propagación puede ser por semilla (sexual) o de manera vegetativa (asexual) a partir del tallo (Arango, 2018), lo que posibilita su desarrollo en condiciones extremas no aptas para otros cultivos (Guzmán y Chávez, 2007). El cultivo de nopal tunero en México es producido en 16 de las 32 entidades federativas; con una superficie cosechada de 43,393.4 ha, en donde las condiciones son precarias (Sáenz, 2016 y SIAP, 20). La aceptación de estos frutos por los consumidores radica en su sabor dulce, fresco y nutritivo que aporta proteína, grasas, fibra, azúcares, vitaminas y minerales tales como el calcio, fósforo, potasio, hierro y magnesio (SAGARPA, 2015).

La producción nacional de tuna es liderada por los estados de México, Puebla, Zacatecas, Guanajuato y Jalisco los cuales concentran un 92% del total producido (471, 427.35 toneladas). El mayor productor es el estado de México quien produjo un total 175, 629.65 ton, que representan el 37% de la producción nacional tunera con un valor aproximado de cuatrocientos ochenta y cuatro millones cien mil seiscientos pesos; los cuales son sustento de aproximadamente 6000 familias mexicanas (INEGI,2019; SIAP, 2020). Dentro de los principales cultivares en la entidad se encuentra la variedad Alfajayucan, seguida por la Tuna criolla, Tuna roja, Blanca cristalina, Amarilla, Blanca burrona, Pico chulo y Xoconostle (SIAP, 2020). El cultivar Alfajayucan presenta características deseables al consumidor (sabor dulce con textura firme, jugosa, con pocas semillas y buena vida de anaquel) y a la cosecha (menos espinas y mayor tolerancia a pudriciones). Sin embargo, este presenta mayor susceptibilidad a la enfermedad conocida como engrosamiento del cladodio. Esta enfermedad está caracterizada por presentar un amarillamiento en la planta, reducción gradual en el tamaño del fruto y del cladodio, seguido del engrosamiento de este, y la disminución en la producción (Gallegos et al., 2013; CESAVEM, 2013). El primer reporte de esta enfermedad lleva más de 3 décadas, en el cual se sugiere que la enfermedad es causada por Fitoplasmas (Pimienta, 1990). Con el tiempo las investigaciones continuaron apuntando a fitoplasmas; pero también a la presencia de virus presentes en los cladodios enfermos. Se ha llevado

a cabo la detección de ambos microorganismos mediante identificación molecular (Bertaccini et al., 2007; Fucikovsky et al., 2011; Suaste-Dzul et al., 2011 y Felker et al., 2019). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha identificado el agente causal responsable de la sintomatología mencionada, debido probablemente a la dificultad de comprobar los Postulados de Koch en este cultivo que es de lento desarrollo. Por otro lado, se ha observado que cuando las plantas de nopal están bajo condiciones de estrés debido al incremento de temperatura, estrés hídrico, pero sobre todo con mala nutrición, etc., pueden presentar síntomas de engrosamiento (Valadez et al. 2021). No obstante, no se ha prestado la suficiente atención en los aspectos nutricionales requeridos por el cultivo que determinen si existe una correlación entre la presencia de la enfermedad y un déficit nutrimental. Por lo que objetivo del presente estudio fue identificar molecularmente a microorganismos tipo Fitoplasmas asociados al engrosamiento del cladodio en el cultivo de nopal tunero cultivar Alfajayucan y determinar la correlación entre los niveles de fertilización y la manifestación de síntomas del engrosamiento del cladodio en el mismo cultivar Alfajayucan.

Materiales y métodos

El material genético recolectado fue del cultivar Alfajayucan proveniente de tres zonas ubicadas en los municipios de: Temascalapa [Huerta 1 (19°74'91'' Latitud Norte y 98°54' 49'' Longitud Oeste)], Teotihuacan de Arista [Huerta 2 (19° 44'59'' Latitud norte y 98° 55' 29'' Longitud Oeste)] y San Martin de las Pirámides [Huerta 3 (19° 71' 37'' Latitud Norte y 98° 83' 41'' Longitud oeste)]. Se recolectó un total de 142 cladodios con y sin síntomas de engrosamiento; 30, 36 y 76 plantas respectivamente, de los sitios descritos. Del total de cladodios recolectados 50 % correspondió a cladodios sintomáticos y el otro 50% asintomáticas. De estas muestras fueron seleccionadas 22 con síntomas y 22 sin síntomas de engrosamiento (Cuadro 1) y se cortó un fragmento de tejido aproximadamente 23 gramos para las pruebas moleculares. Estos fragmentos fueron liofilizados con un equipo Labconco modelo 7754041 de 18 L con las siguientes condiciones: vacío de 0.045 mBar a una temperatura de condensar de -45 °C.

Cuadro 1. Sitio de recolecta y cantidad de muestras seleccionadas para identificación molecular

Huerta	CLADODIOS	
	SANOS	ENFERMOS
1	5	5
2	7	7
3	10	10

La extracción de DNA se llevó a cabo con los métodos CTAB I y II (Weising et al. 2005), utilizando 50 mg de tejido liofilizado proveniente de cladodios sanos y engrosados de las 44 muestras antes descritas. Una vez extraído el DNA se verificó su integridad y calidad en un gel de agarosa 1%. La concentración, absorbancia y relación 260/280 fue determinada con un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Posteriormente se procedió a realizar PCR para amplificar un fragmento de aproximadamente 1800 pb del gen 16S (Zambrano, 2008) utilizando los primers P1: -5_AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GATT-3 y P7: -5- AAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG GATT-3, en un volumen final 25 μ L, utilizando el programa de termociclaje referido en la Figura 2. Esta amplificación genera muchos productos de PCR, ya que estos iniciadores pueden reconocer a diferentes tipos de fitoplasmas que viven dentro de la planta.

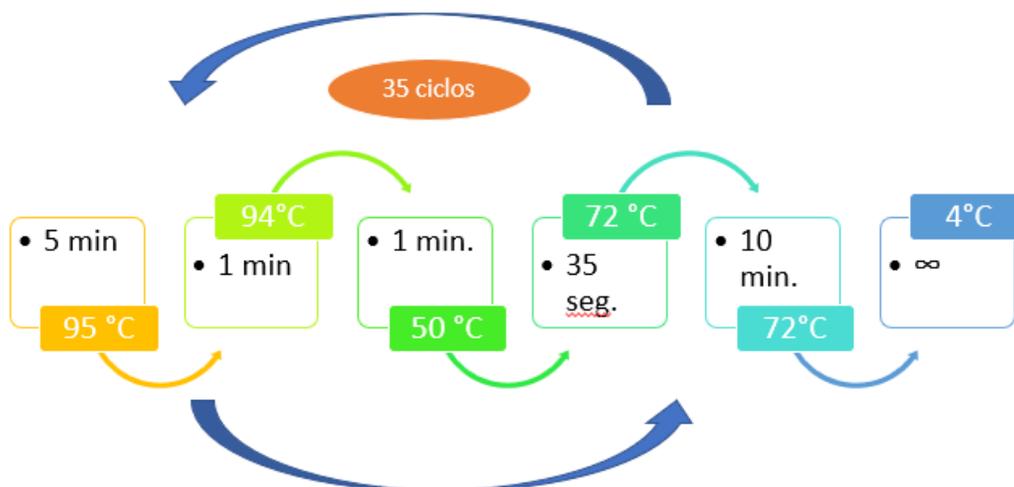


Figura 1. Programa utilizado en la amplificación con los primers P1 y P7 para PCR

Posteriormente sobre estos productos, se llevó a cabo un tipo de amplificación llamada “anidada” con un programa (Figura 2) y par de iniciadores diferentes

[R16F2/R16R2 (5'-GAA ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'/ 5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3') (Gundersen y Lee, 1996)].

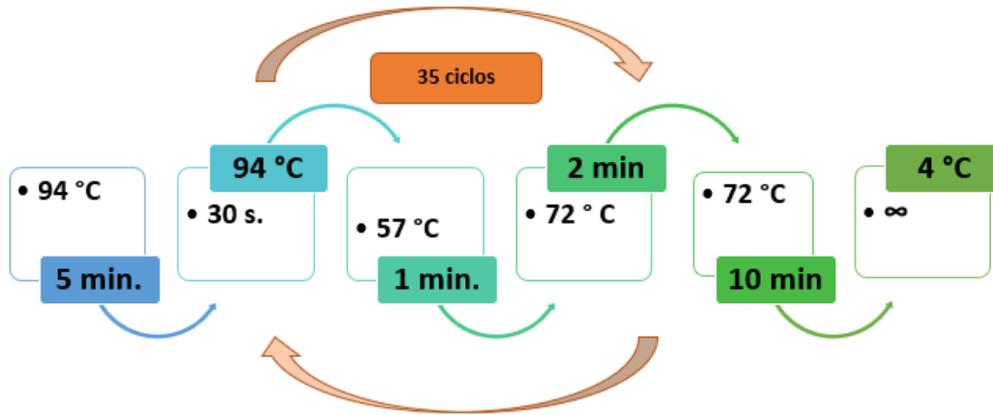


Figura 2. Programa utilizado en la PCR anidada

Secuenciación

A partir de las muestras amplificadas mediante PCR anidada se seleccionaron las que presentaran mejores características para secuenciarlas. Una vez obtenidas las secuencias se editaron con el programa Genious Prime para unir las secuencias forward y reverse de cada una de las muestras, para su posterior comparación en la base de datos National Center of Biotechnology information (NCBI).

Resultados y discusión

PCR

Para reconocer la presencia de fitoplasmas en cladodios de nopal con y sin engrosamiento, se realizó la primer amplificación con PCR con primers P1 y P7 y mostraron amplificación 19 de las 44 muestras. En el gel de la Figura 4 se aprecia un barrido inferior de 1500 pb que es lo habitual en este tipo de amplificación. En el gel, las muestras que mostraron amplificación fueron tanto sanas (pozos 1 al 21) como enfermas (pozos 22-44). Con base en estos resultados es posible inferir que el par de iniciadores P1-P7 quizá reconozca variados fitoplasmas presentes en el tejido del cultivo de nopal, además del posible agente causal de la enfermedad del engrosamiento el cladodio.

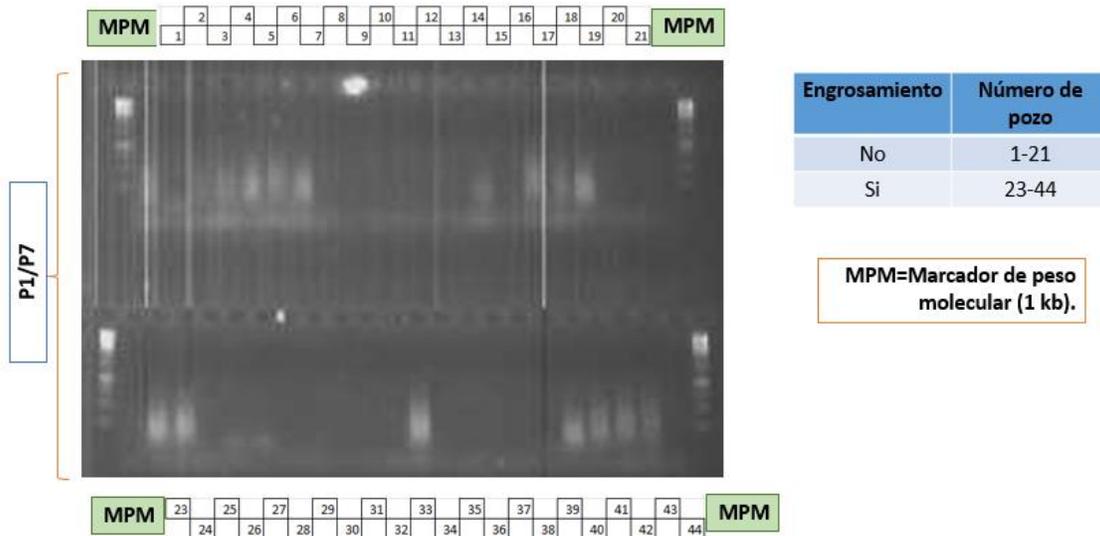


Figura 3. Gel de agarosa al 1.5 % para las reacciones con los primers P1 y P7.

PCR anidada

Una vez obtenidos los productos de PCR, se realizó la segunda amplificación con los primers R16F2/R16R2 que son específicos para la detección del *Candidatus phytoblasma*, que es un microorganismo que se ha asociado al engrosamiento del cladodio del nopal. Los resultados obtenidos indicaron que 7 de las muestras sanas (muestras 1, 3, 4, 6, 7, 14 y 17) y tres de las engrosadas (muestras 24, 25 y 43) presentaron una banda de DNA de aproximadamente 1200 pb, lo que hace referencia al fragmento esperado (Figura 4).

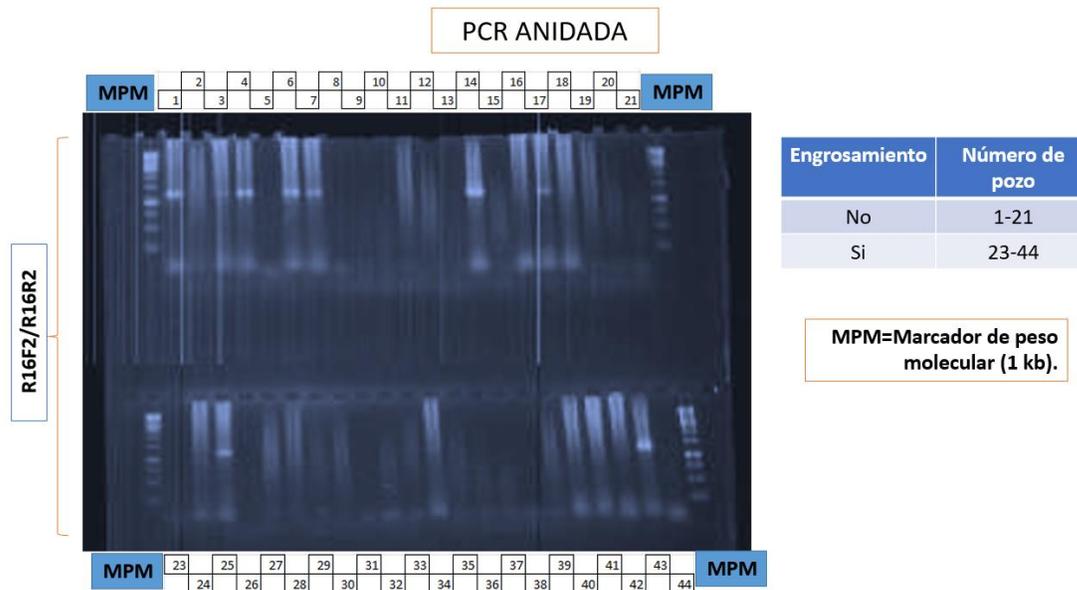


Figura 4. Gel de agarosa (1.5%), para muestras amplificadas con primers R16F2/R16R2

La presencia de la misma banda en ambos tipos de muestras (sanas y enfermas) sugiere que la presencia de estos microorganismos no necesariamente sean la causa del problema del engrosamiento. Suaste (2012) encontró en muestras asintomáticas de nopal tunero la presencia de fitoplasmas. Nuestros resultados también coinciden con los reportados por Mendoza en el 2016, quienes detectaron la presencia de fitoplasmas en cladodios sanos y enfermos de nopal *Opuntia ficus-indica* cultivar Villanueva, y que posteriormente mediante un análisis RFLP, determinaron que pertenecían a los grupos 16SrI, 16SrII y 16SrIII.

Estos hallazgos en el presente estudio, así como en otros reportados, probablemente estén indicando que no necesariamente los fitoplasmas encontrados y asociados a la sintomatología del engrosamiento sean los responsables de la misma; sino que este tipo de microorganismos pueden estar formando parte del microbioma endófito propio de este tipo de plantas en un ambiente determinado (Fonseca-García et al. 2016). Por otro lado, también es razonable considerar la baja concentración que hace indetectables a este grupo de microorganismos dependiendo de la época del año. Seemüller, (2004) reportó que en la enfermedad conocida como declinamiento del peral cuando existen bajas temperaturas, los

fitoplasmas se desplazan a las raíces, por lo que su detección en tallos no es posible, pero su detección en raíces solo es posible en primavera cuando existen síntomas de la enfermedad

Secuenciación

Se obtuvieron las secuencias de los 10 resultados positivos referentes a la detección con PCR del fragmento esperado de alrededor de 1200 pb. Seis de esas secuencias fueron útiles para lograr identificar al microorganismo detectado. Al realizar la comparación de las secuencias en la base de datos del NCBI para las muestras seleccionadas, se determinó que las secuencias presentaban un porcentaje de similitud de 99.89% con *Cucumis sativus* (Figura 6), que es un fitoplasma del grupo Candidatus Phytoplasma.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> 'Cucumis sativus' flat stem phytoplasma 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	'Cucumis sativus'...	1736	1736	100%	0.0	99.89%	1236	MZ918993.1
<input checked="" type="checkbox"/> 'Hevea brasiliensis' phytoplasma isolate RRII 105 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	'Hevea brasiliens...	867	867	100%	0.0	83.44%	1215	KP025809.1
<input checked="" type="checkbox"/> Phytoplasma sp. RYL-GD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Phytoplasma sp. ...	760	760	99%	0.0	81.54%	1527	EU093079.1
<input checked="" type="checkbox"/> Brinjal little leaf phytoplasma clone TN-37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Brinjal little leaf p...	610	610	87%	5e-174	80.29%	1375	KP027520.1
<input checked="" type="checkbox"/> Lethal wilt oil palm phytoplasma clone LWP-16S23S-P4P1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Lethal wilt oil pal...	603	603	89%	8e-172	79.86%	1479	KP702114.1
<input checked="" type="checkbox"/> Brinjal little leaf phytoplasma clone AP-32 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Brinjal little leaf p...	599	599	87%	1e-170	80.00%	1372	KP027515.1
<input checked="" type="checkbox"/> Brinjal little leaf phytoplasma clone TN-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Brinjal little leaf p...	542	542	89%	2e-153	78.65%	1420	KP027525.1
<input checked="" type="checkbox"/> Brinjal little leaf phytoplasma clone TN-45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Brinjal little leaf p...	523	523	89%	6e-148	78.21%	1394	KP027526.1
<input checked="" type="checkbox"/> 'Berberis vulgaris' flattened stem phytoplasma isolate Tehran 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	'Berberis vulgaris...	505	505	82%	2e-142	78.75%	1246	KX370818.1
<input checked="" type="checkbox"/> 'Prunus armeniaca' apple proliferation phytoplasma isolate ESFY-Ch 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S rbo...	'Prunus armenia...	488	488	87%	2e-137	77.87%	1640	MG748694.1
<input checked="" type="checkbox"/> Candidatus Phytoplasma prunorum isolate ESFY-F2nR2-c2_SP6_Plate_1_8 16S ribosomal RNA gene, partial se...	Candidatus Phyt...	488	488	87%	2e-137	77.87%	1242	MH279543.1
<input checked="" type="checkbox"/> Candidatus Phytoplasma prunorum partial 16S rRNA gene isolate Trzebnica	Candidatus Phyt...	488	488	87%	2e-137	77.87%	1609	LT746087.1

Figura 6. Búsqueda de secuencias en la base de datos del National Center of Biotechnology information (NCBI).

Conclusión

Mediante identificación molecular se logró identificar al fitoplasma *Cucumis sativus* del grupo *Candidatus* Phytoplasma en plantas con y sin engrosamiento provenientes del valle de México. Lo cual sugiere que estos microorganismos están presentes de manera endófitas en el cultivo de nopal tunero y se pone en duda que sean los causantes del engrosamiento del cladodio de nopal.

Referencias

- Andrade, J. L., De la Barrera, E., García, C. R., Ricalde, M. F., Soto, G. V., & Cervera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (81), 37-50.
- Arango, C. H. M. (2018). Evaluación de métodos de propagación asexual del nopal (*Opuntia ficus indica*), y respuesta a diferentes sustratos en el municipio los santos Santander. *Agricolae & Habitat*, 1(1). <http://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/agricolae/article/view/234>.
- Bertaccini A, Calari A, and Felker P. 2007. Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bulletin of Insectology* 60:257-258.
- COMITÉ ESTATAL DE SANIDAD VEGETAL DEL ESTADO DE MÉXICO (CESAVEM), 2013. Cuida tu producción de nopal y tuna. Sagarpa, Toluca, Toluca estado de México.
- INEGI, I. (2019). El INEGI da a conocer los resultados de la Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH) 2018.
- Felker, P., Bunch, R., Russo, G., Preston, K., Tine, J. A., Suter, B., ... & Yim, W. C. (2019). Biology and chemistry of an Umbravirus like 2989 bp single stranded RNA as a possible causal agent for *Opuntia* stunting disease (engrosamiento de cladodios)-A Review. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 21, 1-31.
- Fucikovsky ZL, Yanez MM de J, Alanis M. I., and Gonzalez pe. 2011. New hosts of 16S rDNA phytoplasma group associated with edible *Opuntia ficus-indica* crop and its pests in Mexico. *African journal of microbiology research* 5:910-918. <https://doi.org/10.5897/ajmr10.846>
- Gallegos, V.C., Mendez, G.S de I., y Mondragón, J.C. 2013. Producción sustentable de tuna en San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados, Fundación Produce San Luis Potosí. S.L.P. México. 187 p. <https://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/67838/Tesina%20Fernanda%20nopal%202017.pdf?sequence=3>
- Gundersen, DE y Lee, IM (1996). Detección ultrasensible de fitoplasmas mediante ensayos de PCR anidados utilizando dos pares de cebadores universales. *Phytopathologia mediterranea*, 144-151.
- Guzmán Loayza, D., & Chávez, J. (2007). Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(1), 41-45.
- Mendoza, A. V., Hernández, A. F., & Suárez, J. B. (2008). DINÁMICA DE LAS PRINCIPALES PLAGAS DE NOPAL *Opuntia* spp. EN LA ZONA SEMIÁRIDA DE QUERÉTARO. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 7(1), 21-27.
- Pimienta BE 1990. El nopal tunero. Primera edición. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara,
- 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. Informe detallado.
- Seemüller, E. y Schneider, B. (2004). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' y 'Candidatus Phytoplasma prunorum', los agentes causales de la proliferación de manzanas, el declive de las peras y el amarillo de las frutas de hueso europeas, respectivamente. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*, 54 (4), 1217-1226.
- SIAP (Agricultural and Fishery Information System). 2020. secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México.
- Suaste Dzul, A., Rojas Martínez, R. I., Zavaleta Mejía, E., & Pérez Brito, D. (2012). Molecular Detection of Phytoplasmas in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) with Thickening of the Cladodio. *Revista mexicana de fitopatología*, 30(1), 81-85.
- Valadez-Moctezuma, E., Ramírez-Alba, N. A., Sánchez-Ávila, A. S., Samah, S., Valdovinos-Ponce, G., & Soto-Hernández, R. M. (2021). Histological, hormonal and nutritional changes in *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes with thickening symptoms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115, 101688.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. y Kahl, G. (2005). Toma de huellas dactilares de ADN en plantas: principios, métodos y aplicaciones . Prensa CRC.
- Zambrano Uribe, JC (2008). Amplificación, secuenciación y clonación de regiones de los genes 16S-23S rRNA del cromosoma del fitoplasma que infecta *Fraxinus* sp. en Bogotá, Colombia.

APÉNDICE

Procesamiento de las muestras a liofilizar

1. Se clasificaron (Figura 1) las muestras recolectadas de cada una de las huertas.



Figura 1. Clasificación de cladodios recolectados con base al sitio de recolección

2. Una vez clasificadas se seleccionaron 22 cladodios sanos y 22 enfermos provenientes de las 3 huertas. A los cladodios seleccionados se les aplicó un proceso de lavado con agua de la llave y posteriormente se dejaron escurrir para eliminar el exceso de agua.

3. Donde se realizó el corte para obtener las muestras se le agregó cal para ayudar con el proceso de cicatrización y prevenir enfermedades, hasta que se realizó el trasplante e instalación del experimento en invernaderos de horticultura pertenecientes a la UACH. Cuando se finalizó el paso 1, se llevó a cabo el etiquetado de los cladodios seleccionados; para posteriormente cortar una muestra de 20 ± 3 gr de tejido las cuales se guardaron en bolsas de papel debidamente etiquetadas y el almacenamiento en un congelador a $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (la temperatura baja reduce la tasa metabólica originada del estrés producido por el corte). Posteriormente las muestras fueron liofilizadas.



Figura 2. Procesamiento de muestras para liofilización; A) Pesado de las muestras, B) Almacenamiento en refrigeración para su conservación y C) Sitio donde se liofilizaron las muestras.

Protocolo para llevar a cabo la lectura con el Nanodrop

1. Encender el nanodrop y abrir el programa del Nanodrop; seleccionando ácido nucleico.
2. Limpiar el lector y pedestal con Kleenex kimwipes (no dejan pelusa).
3. Agregar 2 microlitros con agua HPLC con la micropipeta en el lector, bajar el pedestal y llevar a cabo la lectura “measure” para calibrar el equipo. Es importante limpiar con papel Kimwipes entre cada una de las lecturas. Se deberá calibrar el equipo con Buffer TE (pH 7.6 u 8) cada 10 muestras para reducir la probabilidad de lecturas incorrectas.
4. Considerar cambiar el nombre de la muestra entre cada una de las lecturas. Las lecturas aparecen en la opción “Show Report”.

Determinación de humedad requerida en el periodo de diciembre a enero

Para realizar la determinación de humedad primero se llenaron bolsas de polietileno (40*40) sin agujeros con 11.38 kg en promedio de sustrato. Estas bolsas fueron saturadas con agua hasta que se visualizará el espejo de agua en la superficie de este con aproximadamente 4.5 L de agua. Posteriormente se colocó el sustrato saturado (11.38 peso seco+4.5 L (kg) de agua que logró contener en bolsas con las mismas características, pero perforadas y se escurrió durante 1 hora hasta que el sustrato se encontrará a capacidad de campo, con lo que fue posible determinar el volumen de agua que es capaz de retener mediante la diferencia del peso saturado menos el peso a capacidad de campo; esto permitió determinar que con 1 L (1 kg) el sustrato logra estar a capacidad de campo.

Determinación de cantidad e intervalos de riego con base a peso durante el periodo de diciembre a enero.

Una vez que se obtuvo la cantidad de agua que es capaz de retener el sustrato, cuando este se encuentra a capacidad de campo (1 L), se distribuyeron diez macetas con plantas de nopal trasplantadas y ubicadas en diferentes puntos del invernadero (figura 3); para posteriormente agregar agua y conseguir que se encuentre a capacidad de campo (C.C.). Una vez conseguida la C.C. se pesó a las plantas seleccionadas con una báscula digital Vinson con capacidad de 40 kg, a diario durante 19 días. Con lo cual fue posible establecer que las plantas en este periodo evapotranspiraron un promedio de 800 mL de agua (Figura 1 del apéndice). Al distribuir esta cantidad en los 19 días monitoreados, fue posible observar que las plantas evapotranspiran un promedio de 40 mL al día. Se decidió aplicar la solución nutritiva cada tercer día aplicando un volumen de 120 mL por cladodio en cada uno de los tratamientos. Para lo cual se realizó la calendarización de los riegos (Figura 3) a partir de la primera aplicación el 30 de enero del 2022.



Figura 3. Calendarización de la aplicación de los tratamientos a partir de la primera aplicación (30 de enero del 2022) y hasta el mes de agosto del 2022.

Es importante mencionar que esta cantidad no es constante por lo que al instalar el experimento se instalaron 10 plantas distribuidas en grupos de plantas en el invernadero (Figura 4), que permitirán monitorear la cantidad de agua evapotranspirada en meses posteriores.

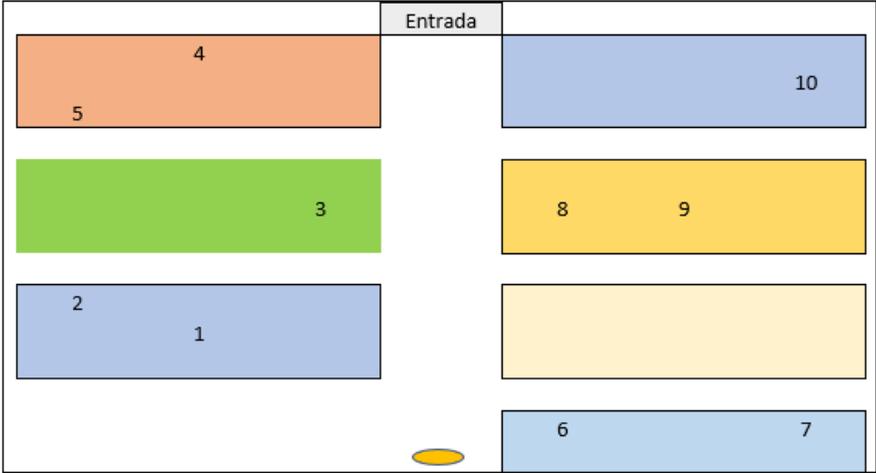


Figura 4. Distribución de plantas monitoreadas para realizar la determinación de humedad en 19 días de diciembre y enero.

Origen del agua utilizada en el trabajo de investigación

El agua que abastece a los invernaderos de horticultura proviene del pozo conocido como el “El Yucateco” (Figura 1) en las coordenadas geográficas 19°49′34″ latitud norte y 98° 88′47″ longitud oeste el cual se encuentra dentro de las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo.



Figura 5. Localización del pozo “El Yucateco” que abastece a los invernaderos en dónde se encuentra establecida el trabajo de investigación.

*

Cálculo de la solución nutritiva para nopal tunero

Se realizó el cálculo de la solución nutritiva (100% de concentración) descrita por Almaguer et, al. 2014 (Cuadro 2). Para nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*) de la variedad Villanueva, la cual fue ajustada para el cultivo de nopal tunero con base a la solución nutritiva considerada como universal para múltiples cultivos, propuesta por Steiner (1984) para los iones P, K y Mg, los cuales en cultivos frutícolas se requieren en mayor cuantía.

Cuadro 1. Solución nutritiva original y ajustada para nopal tunero

Tipo	Nutrimiento	mg. L ⁻¹ (Almaguer et, al. 2014)	Meq.L ⁻¹ (Almaguer et, al. 2014).	Solución nutritiva ajustada para nopal Tunero (Pineda y Tetla, 2021) al 100% (Meq. L ⁻¹).
Macroelementos	N	200	14.28	14
	P	60	1.93	2
	K	250	6.39	7.5
	Ca	200	10.00	10
	Mg	50	4.16	4.5
	S	100	0.25	6
Microelementos	Nutrimiento	Mg	mg	Mg
	Fe	0.5	0.5	0.5
	Mn	0.25	0.25	0.25
	B	0.25	0.25	0.25
	Cu	0.02	0.02	0.02
	Zn	0.01	0.01	0.01

Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. In 6. *International Congress on Soilless Culture, Lunteren (Netherlands), 29 Apr-5 May 1984*. ISOSC.

1. Para poder realizar el cálculo de la solución nutritiva fue necesario hacer la transformación de mg. L^{-1} a Meq. L^{-1} para posteriormente realizar el ajuste y balance iónico de los macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg, y S), teniendo en cuenta principios de electroneutralidad, iones presentes en el agua, así como carbonatos y bicarbonatos. En el cuadro 2, se describe la cantidad de iones que aporta el agua, los que requiere la solución nutritiva (SN) y la diferencia de la SN menos lo que aporta el agua será lo que se debe adicionar realmente con la solución nutritiva que se prepara.

Cuadro 2. Solución nutritiva al 100 % para nopal en Meq. L^{-1} utilizando el agua proveniente del pozo “El Yucateco” de la UACH

	Aniones					Cationes			
	NO_3^-	H_2PO_4^-	SO_4^-	Cl^-	HCO_3^-	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}	Na^+
Agua	---	---	1.55	0.5	---	0.2	1.39	1.23	1.38
Solución nutritiva	14.0	1.0	6.0	---	---	7.5	10	4.5	---
Solución nutritiva aporte	14	2	4.45	---	2 H	7.3	8.61	3.27	---

2. Para realizar el ajuste fue necesario balancear, para tal efecto se necesitó sacar la sumatoria de aniones y cationes (Cuadro 4). Para posteriormente sacar el promedio de ambos para repartir la diferencia de Meq.L^{-1} entre cada uno de los iones.

Cuadro 3. Diferencia entre cationes y aniones

Aniones:	Cationes
$\Sigma=14+2+6=20.45$	$\Sigma=2+7.3+8.61+3.27=21.18$
Media:	
$(20.45+21.18)/2=20.82$	

3. una vez que se obtuvo la media entre ambos iones fue necesario hacer el ajuste entre cada uno de los iones mediante un factor de corrección para ambos iones que posteriormente se repartió entre la sumatoria de aniones y cationes que se deben ajustar.

Cuadro 4. Ajuste de iónico de la SN para el cultivo de nopal.

Aniones		Cationes	
FC Aniones= $20.82-20.45=0.37$ $0.37/20.45=0.0180$		FC Cationes= $21.18-20.82=0.36$ $0.36/21.18=0.0169$	
NO ₃ ⁻	= $14+((0.0180*14))$ =14.25	K ⁺	= $7.3-(0.0170*7.3)$ =7.18
H ₂ PO ₄ ⁻	= $2+(0.0180*2)$ =2.04	Ca ²⁺	= $(8.61-(0.0170*8.61))-0.03$ =8.46
SO ₄ ⁻	= $4.45+(0.0180*4.45)$ =4.53	Mg ²⁺	= $3.27-(0.0170*3.27)$ =3.21
Sumatoria de aniones ajustados	= $14.25+2.04+4.53$ =20.82	Sumatoria de cationes ajustados	= $7.18+8.46+3.21$ =18.85+2.0 (Hidrógenos del ácido fosfórico) =20.85-0.03 de Ca por que el agua es rica en calcio =20.82

4. Cuando se realizó el balance iónico se procedió a hacer un cuadro en donde se deben acomodar las cantidades de iones para poder seleccionar la fuente de fertilizante (Cuadro 6).

Cuadro 5. Balance iónico para la SN de nopal tunero. Y cantidad de las fuentes nutrimentales.

Selección de fuentes de Fertilizante para la SN						Fuentes y cantidades para la SN al 100%		
	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H ⁺	Total	Fuente	Cantidad (Meq. L ⁻¹)	
+	NO ₃ ⁻	5.82	8.43	0.00	0.00	14.25	Nitrato de potasio	5.82
	H ₂ PO ₄ ⁻	1.0	X	X	1.04	2.04	Nitrato de calcio	8.43
	SO ₄ ⁻	0.36	X	3.21	0.96	4.53	Fosfato de potasio	1
	Total	7.18	8.43	3.21	2.0	20.82	Sulfato de potasio	0.36
						Sulfato de magnesio	3.21	
						Ácido fosfórico	1.04	

X=Estas fuentes no se pueden utilizar por que forman precipitados insolubles y taponean goteros en sistemas automatizados

Ácido sulfúrico 0.96

5. Una vez que se tiene la cantidad para cada una de las fuentes se convirtió de **Meq.L⁻¹ a Mg.L⁻¹**

$$\text{Meq} \cdot \text{Peq} = \text{Mg.L}^{-1}$$

Meq=Miliequivalentes

Peq=Peso equivalente

- a) Nitrato de potasio (K^+NO_3^-): $5.82 \cdot 101 = 718.11 \text{ Mg. L}^{-1}$
- b) Nitrato de calcio ($\text{Ca}^{2+} (\text{NO}_3)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): $8.43 \cdot 118 = 842.5 \text{ Mg. L}^{-1}$
- c) Fosfato de potasio $\text{K}^+\text{H}_2\text{PO}_4^-$: $1 \cdot 136 = 13.72 \text{ Mg. L}^{-1}$
- d) Sulfato de magnesio ($\text{Mg}^{2+} \text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$): $3.21 \cdot 123 = 394.83 \text{ Mg. L}^{-1}$
- e) Ácido fosfórico ($\text{H}_3^+ \text{PO}_4^-$): $= 1.04 \cdot 98 \cdot (1/1.7) \cdot (100/85) \cdot (1/1000)$
 $= 1.04 \cdot 98 \cdot (0.588) \cdot (1.1765) \cdot (0.001)$
 $= 0.1335 \text{ mL.L}^{-1}$
- f) Ácido sulfúrico

Para el caso de los ácidos se utilizan Meq, Peq, densidad, concentración y un factor de corrección para poder expresar en mL.L^{-1} y no en Mg. L^{-1}

Para cuando se tienen calculados los macro nutrientes de la solución nutritiva se utilizará un quelato que contiene todos los nutrientes descritos en el cuadro 7.

Cuadro 6. Cantidades aportadas por un producto (Quelato) y cantidad necesaria de micronutrientes para la SN de nopal tunero al 100 %

Quelato (% P/P).	Micronutrientes necesarios en la SN al 100% (mg/ L^{-1}).
Fe: 7.5	Fe: 0.750
Mn: 3.5	Mn 0.375
B: 0.65	B: 0.375

Cu: 0.28
Zn: 0.7
Mo: 0.26

Cu: 0.030
Zn 0.375
Mo: 0.015

Una vez que se obtuvo la cantidad requerida de quelato se procede a calcular las cantidades necesarias para cada microelemento.

Cuadro 7. Cálculo de micronutrientes para la SN de nopal tunero al 100%

A) Fe: 100 mg de Quelato → 7.5 mg de Fe. L ⁻¹ X mg de Quelato → 0.5 mg de Fe. L ⁻¹ X=6.67 mg de Quelato L ⁻¹	B) Mn: 6.67 mg de quelato/L ⁻¹ → 7.5% de Mn Mn=0.23345 mg.L⁻¹ **=0.25 mg de Mn	C) B: 6.67 mg de Quelato → 0.65 % de B B=0.043355 mg.L⁻¹ S: 0.02 mg de B
Satisfecho (S): 0.5 mg de Fe		
D) Cu: 6.67 mg de Quelato → 0.28% de Cu Cu=0.0187 mg. L⁻¹ **=0.02 mg de Cu.L ⁻¹	E) Zn: 6.67 mg de Quelato → 0.7% de Zn Zn=0.04669 mg. L⁻¹ El Quelato no satisface necesidad de Zn (0.25 mg de Zn.L ⁻¹): 0.20531 mg de Zn/Peso molecular del Zn=Meq 0.20531/65.38= 0.00314 Meq de Zn Sulfato de zinc (ZnSO⁴ H₂O): Peq de ZnSO ₄ H ₂ O Zn=65.38*1 S=32.00*1 O=16*6 H=1*2 Peq=195.38 Meq*Peq=mg. L ⁻¹ 0.00314*195.38= 0.61 mg Sulfato de Zn	F) Mo: 6.67 mg de Quelato →0.26% de Mo Mo= 0.017 mg.L⁻¹ S: Mo=0.01
	S: Quelato: 6.67 mg.L ⁻¹ + Sulfato de zinc:0.61 mg. L ⁻¹	

S=Satisfecho, **=No satisfecho pero las cantidades son ínfimas.
Las cantidades calculadas al 100% en este cuadro solo se convirtieron al
150 %.

Es importante considerar que los tratamientos basados en la Solución nutritiva ajustada para nopal tunero al 100 %; deben calcularse nuevamente para los tratamientos en las distintas concentraciones(50% y 100 % + 400 ppm de Ca 2+); puesto que al hacer el ajuste en miliequivalentes son de gran relevancia los iones disueltos en el agua, carbonatos y bicarbonatos, ya que estos interfieren en la cantidad necesaria que se debe suplir con las fuentes de fertilización (fertilizantes hidrosolubles) y la cantidad de ácido necesaria para que los nutrientes en solución se encuentren en una solución con un pH óptimo para que el cultivo pueda absorber y asimilar los nutrientes; siendo que bajo estas condiciones (pH entre 5.5 y 6.5), la capacidad de intercambio catiónico es mayor en la solución nutritiva. Además de que una conductividad eléctrica debe ser 2 dS, para que los nutrientes en solución no presenten problemas al absorberlos (Jones y Jacobsen, 2005; Langdon, 2008).

Cuadro 8. Fuentes de fertilización, ácidos y micronutrientes utilizados para la solución de nopal tunero en diferentes concentraciones (Almaguer, 2014)

Necesidad	Fuente	Formula	gr/200 L (agua UACH)			
			Agua	50%	100%	SN con 400 ppm Ca 2+
Macroelementos	Nitrato de potasio	K+NO3 (Ca2+ (NO3)2	Testigo	57.57	117.56	0.00
	Nitrato de calcio	7H2O		81.42	198.95	334.41
	Nitrato de magnesio	(Mg2+(NO-3)2 6H2O)		0.00	0.00	0.00
	Fosfato de potasio	K+H2PO4-		26.38	27.2	0.54
	Sulfato de potasio	(K2SO-4)		9.57	6.26	125.11
	Sulfato de magnesio	(Mg2+ SO4 7H2O):		00.00	78.97	79.46
	Sulfato de calcio	CaSO42H2O		0.00	0.00	36.12
	Cloruro de calcio	CaCl2		0.00	0.00	23.42
			mL de acido			
	Ácido sulfúrico	H2 SO4		6.29	12.58	0.00
	Ácido fosfórico	(H3+ PO4-)		7.05	14.11	2.00
	Ácido nítrico	HNO-3)		0	0	0.00
			gr /200 L agua (Chapingo)			
Microelementos	Quelato			0.13	0.27	0.27
	Sulfato de Zinc			0.012	0.024	0.02

Cuadro 9. Sitio de recolección, clave en el invernadero y peso inicial al momento del trasplante

Sitio de recolección	Cladodios sin engrosamiento		Cladodios con engrosamiento	
	Clave	Peso (gr)	Clave	Peso (gr)
Huerta 1 Temascalapa, Edo. de México.	S1 P1	920	E1 P	770
	S1 P2	820	E1 P2	595
	S1 P3	745	E1 P3	865
	S1 P4	640	E1 P4	700
	S1 P5	675	E1 P5	695
	S1 P6	805	S1 P6	435
	S1 P7	650	S1 P7	700
	S1 P8	935	E1 8	700
	S1 P9	615	E1 9	485
	S1 P10	570	E1 10	525
	S1 P11	530	E1 11	490
	S1 P12	405	---	---
	S1 P13	650	---	---
	S1 P14	755	---	---
	S1 P15	785	---	---
	S1 P16	700	---	---
	S1 P17	810	---	---
	S1P18	475	---	---
Huerta 2 Teotihuacan de Arista, Edo. de México	S2 P1	505	E2 P2 L	485
	S2 P2	415	E2 P3	465
	S2 P3	535	E2 P4	420
	S2 P4	385	E2 P5	625
	S2 P5	605	E2 P6	725
	S2 P6	560	E2 P7	670
	S2 P7	525	E2 P8	790
	S2 P8	660	E2 P9	620
	S2 P9	885	E2 P10	675
	S2 P10	380	E2 P11	670
	S2 P11	485	E2 P12	810
	S2 P12	470	E2 P13	615
	S2 P13	595	E2 P14	1165
	S2 P14	760	E2 P15	710
	S2 P15	830	E2 P16	815
	S2 P16	705	E2 P17	1040
	S2 P17	335	E2 P18	825
---	---	E2 P19	825	
---	---	E2 P20	600	
Huerta 3 San Martin de las Pirámides, Edo. de México	S3 P1	360	E3 P1	1435
	S3 P2	835	E3 P2	965
	S3 P3	750	E3 P3	550
	S3 P4	950	E3 P4	430
	S3 P5	740	E3 P5	670
	S3P6	675	E3 P6	1530
	S3 P7	855	E3 P7	555

S3 P8	595	E3 P8	695
S3 P9	365	E3 P9	1235
S3 P10	565	E3 P10	1600
S3 P11	700	E3 P11	665
S3 P12	820	E3 P12	890
S3 P13	790	E3 P13	600
S3 P14	525	E3 P14	915
S3 P15	950	E3 P15	555
S3 P16	625	E3 P16	635
S4 P1	450	E3 P17	635
S4 P2	765	E3 P18	790
S4 P3	885	E4 P1	680
S4 P4	755	E4 P2	680
---	---	E4 P3	425
S4 P6	730	E4 P5	740
S4 P7	915	E4 P6	935
S4 P8	575	E4 P7	730
S4 P9	580	E4 P8	880
S4 P10	690	E4 P9	710
S4 P11	315	E4 P10	895
S4 P12	690	E4 P11	705
S4 P13	710	E4 P12	275
S4 P14	705	E4 P13	745
S4 P15	505	E4 P14	390
S4 P16	425	E4 P15	715
S4 P17	620	E4 P16	735
S4 P18	605	E4 P17	635
S4 P19	690	E4 P18	1130
S4 P20	490	E4 P19	790
S4 P21	535	E4 P20	660
S4 P22	790	E4 P21	785
S4 P23	540	E4 P22	785

Claves: S1= Planta sana de la huerta 1; S2=Planta sana de la huerta 2; S3 y S4=Plantas sanas provenientes de la huerta 3; E1= Planta enferma de la huerta 1; E2= planta enferma de la huerta 2; E3 y E4=Planta enferma de la huerta 3. ---= sin datos.

Ejemplo:

S1 P1= Sana de la huerta 1, Planta 1

Cuadro 10. Brotes contabilizados a partir de la aparición del primer brote

DDA	Tratamientos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
52	0	0	3	0	0	0	0	0
55	0	1	3	0	0	0	0	0
59	0	2	4	0	0	0	0	0
68	3	3	0	1	1	2	5	0
70	0	0	0	0	0	2	0	1
73	0	2	0	0	0	2	0	0
75	0	0	0	0	1	1	0	0
77	0	0	0	0	1	0	2	2
79	1	0	0	0	0	0	0	0
81	0	1	0	0	0	0	0	2
85	0	2	1	0	1	0	2	0
89	0	1	0	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0	1	0	0

*DDA: Días después de la prime aplicación

Cuadro 11. Cuantificación de brotes, así como largo y ancho de los mismos

Tratamiento	Planta	Número de brotes	Brote									Brotos/tratamiento
			1			2			3			
			Fecha	Largo	Ancho	Fecha	Largo	Ancho	Fecha	Largo	Ancho	
T1 R1	1	1	13/04/2022	12.2	6	0	0	0	0	0	0	
	2	1	17/04/2022	9.6	4.7	0	0	0	0	0	0	
	3	2	13/04/2022	14.7	6.6	17/04/2022	12.3	4.2	0	0	0	
	4	1	25/04/2022	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	
	5	1	17/04/2022	7.1	4.6	0	0	0	0	0	0	
T1 R2	1	1	13/04/2022	16.9	7.7	0	0	0	0	0	0	12
	2	1	13/04/2022	13.9	6.9	0	0	0	0	0	0	
	3	1	25/04/2022	2.3	1.8	0	0	0	0	0	0	
	4	1	13/04/2022	16.8	7.8	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T1R3	1	1	13/04/2022	19.8	7.4	0	0	0	0	0	0	
	2	1	17/04/2022	6.7	3.5	0	0	0	0	0	0	
	3	1	25/04/2022	1	1	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
T2R1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2	1	25/04/2022	2.3	0.5	0	0	0	0	0	0	
	3	1	30/03/2022	22.8	8.3	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	1	26/03/2022	24.7	8.9	0	0	0	0	0	0	
T2R2	1	2	21/04/2022	4.8	2.6	25/04/2022	1	1	0	0	0	11
	2	1	08/04/2022	20.6	6.4	0	0	0	0	0	0	
	3	1	08/04/2022	20.1	7.2	0	0	0	0	0	0	
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

	1	1	08/04/2022	21	8.8	0	0	0	0	0	0
	2	1	13/04/2022	21.5	8.1	0	0	0	0	0	0
T2 R3	3	2	13/04/2022	19.6	7.6	17/04/2022	15.4	6.3	0	0	0
	4	1	30/03/2022	21.5	8.1	0	0	0	0	0	0
	5	2	19/04/2022	9.2	4.7	29/04/2022	0.5	0.5	0	0	0
	1	1	30/03/2022	23.7	12.4	0	0	0	0	0	0
	2	1	23/03/2022	32.1	10.1	0	0	0	0	0	0
T3 R1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	23/03/2022	27	8.7	0	0	0	0	0	0
	5	1	30/03/2022	23.9	9.4	0	0	0	0	0	0
	1	1	25/04/2022	1	1	0	0	0	0	0	0
	2	1	30/03/2022	20.8	7.7	0	0	0	0	0	0
T3 R2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	23/03/2022	26.2	10.6	0	0	0	0	0	0
	5	1	26/03/2022	25	11.2	0	0	0	0	0	0
	1	1	26/03/2022	22.8	8.9	0	0	0	0	0	0
	2	1	0	7.2	3.9	0	0	0	0	0	0
T3 R3	3	1	30/03/2022	19.4	9.2	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	1	26/03/2022	22.1	7.6	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1	08/04/2022	20.6	7.9	0	0	0	0	0	0
T4 R1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4R2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

11

1

	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T4R3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5R1	3	2	15/04/2022	3.6	2.5	17/04/2022	4.9	2.9	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5R2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	25/04/2022	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	0	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T5R3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6R1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	2	08/04/2022	4.6	2.6	30/04/2022	0.5	0.5	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6R2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3

4

	2	2	10/04/2022	15.1	7.2	08/04/2022	15.4	7.6	0	0	0
	3	3	10/04/2022	17.2	6.6	13/04/2022	13.5	5.9	30/04/2021	0.5	0.5
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	1	17/04/2021	6.1	3.5	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T6R3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	13/04/2022	10.2	5.6	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7R1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	3	1	25/04/2022	0.5	0.5	0	0	0	0	0	0
0	4	1	17/04/2022	7.2	3.1	0	0	0	0	0	0
0	5	1	17/04/2022	3.1	2.6	0	0	0	0	0	0
T7R2	1	1	08/04/2022	18.6	7.2	0	0	0	0	0	0
0	2	1	08/04/2022	22.8	9.7	0	0	0	0	0	0
0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	4	1	08/04/2022	20.6	8.2	0	0	0	0	0	0
0	5	1	08/04/2022	23.2	8.1	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T7R3	3	1	25/04/2022	1	1	0	0	0	0	0	0
	4	1	0	6.2	3.3	0	0	0	0	0	0
	5	1	08/04/2022	20.9	7.1	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T8R1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

10

1

	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T8R2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1	10/04/2022	10.5	7.7	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T8R3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

VII. LITERATURA CITADA

- Alonso Barrera, B., Mora Aguilera, G., Valdovinos Ponce, G., Ochoa Martínez, D. L., Rodríguez Leyva, E., Tlapal Bolaños, B., & Torre-Almaraz, R. D. L. (2015). Asociación de un Potexvirus como Agente Causal de Manchas Cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 75-86.
- Andrade, J. L., De la Barrera, E., García, C. R., Ricalde, M. F., Soto, G. V., & Cervera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (81), 37-50.
- Arango, C. H. M. (2018). Evaluación de métodos de propagación asexual del nopal (*Opuntia ficus indica*), y respuesta a diferentes sustratos en el municipio los santos Santander. *Agricolae & Habitat*, 1(1).
- Avina-Padilla, K., Parra-Cota, F., Ochoa-Sánchez, J. C., Perales-Segovia, C., & Martínez-Soriano, J. P. (2009). Phytoplasmas associated to diseases of ornamental cacti in Mexico. *Journal of Biological Sciences*, 9(3), 268-271.
- Baker, GC, Smith, JJ y Cowan, DA (2003). Revisión y nuevo análisis de cebadores 16S específicos de dominio. *Diario de métodos microbiológicos*, 55 (3), 541-555.
- Bertaccini A, Calari A, and Felker P. 2007. Developing a method for phytoplasma identification in cactus pear samples from California. *Bulletin of Insectology* 60:257-258.
- Badii, M. H., & Flores, A. E. (2001). Prickly pear cacti pests and their control in Mexico. *Florida Entomologist*, 503-505.
- COMITÉ ESTATAL DE SANIDAD VEGETAL DEL ESTADO DE MÉXICO (CESAVEM), 2013. Cuida tu producción de nopal y tuna. SAGARPA, Toluca, Toluca estado de México.
- CONAZA, 2018 <https://www.gob.mx/conafor/articulos/las-zonas-aridas-son-mas-que->

- Fucikovsky ZL, Yanez MM de J, Alanis M. I., and Gonzalez pe. 2011. new hosts of 16srl phytoplasma group associated with edible *Opuntia ficus-indica* crop and its pests in Mexico. African journal of microbiology research 5:910-918. <https://doi.org/10.5897/ajmr10.846>
- Gallegos, V.C., Mendez, G.S de I., y Mondragón, j.c. 2013. Producción sustentable de tuna en San Luis Potosí. Colegio de Postgraduados, Fundación Produce San Luis Potosi. S.L.P. México. 187 p.
- Guzmán Loayza, D., & Chávez, J. (2007). Estudio bromatológico del cladodio del nopal (*Opuntia ficus-indica*) para el consumo humano. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 73(1), 41-45.
- Hemmati, C., Al-Subhi, AM, Al-Housni, M. y Al-Sadi, AM (2020). Primer informe de un fitoplasma del subgrupo 16SrII-D asociado con la enfermedad fasciada de *Opuntia cylindrica* en Omán. *Planta Dis* , 105.
- Hernández Gómez, M. F, (2017). Identificación de la especie del picudo que afecta a la espina del nopal (*Opuntia-ficus indica*) en el Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, México.
- Hernandez-Perez, R., Noa-Carrazana, J. C., Gaspar, R., Mata, P., & Flores-Estevez, 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.
- Hogenhout, SA, Oshima, K., AMMAR, ED, Kakizawa, S., Kingdom, HN y Namba, S. (2008). Fitoplasmas: bacterias que manipulan plantas e insectos. *Patología vegetal molecular* , 9 (4), 403-423.
- Jones, C. y Jacobsen, J. (2005). Nutrición vegetal y fertilidad del suelo. *Módulo de gestión de nutrientes*, 2 (11), 1
- Judith, O. M. (2015). Tolerancia genética de los nopales, *Opuntia* sps., cultivados en Jalisco, a la enfermedad “mancha negra” producida por *Pseudocercospora opuntiae*.
- Kostman, TA, Tarlyn, NM, Loewus, FA y Franceschi, VR (2001). La biosíntesis del ácido L-ascórbico y la conversión de los carbonos 1 y 2 del ácido L-

ascórbico en ácido oxálico se produce dentro de idioblastos de cristal de oxalato de calcio individuales. *Fisiología vegetal*, 125 (2), 634-640.

- Kuboyama, T., Huang, CC, Lu, X., Sawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., ... y Namba, S. (1998). Un plásmido aislado del fitoplasma amarillento de cebolla fitopatógeno y su heterogeneidad en el fitoplasma mutante patógeno. *Interacciones moleculares planta-microbio*, 11 (11), 1031-1037.
- Langdon, R. (2008). *Fertilizers: properties, applications and effects*. Nova Science Pub Inc
- Lee I. M., R. E. Davis and D. E. Gundersen-Rindal (2000) Phytoplasma: Phytopathogenic Mollicutes. *Annual Reviews in Microbiology* 54:221-255
- Lobos, E., Passos de Silva, D. M., Mena-Covarrubias, J., Lagarzo, G., & Varone, L. (2013). Principales insectos plaga de las Opuntias en Argentina, México y Brasil. *CactusNet Newsletter*, 13, 137-158.
- López Collado, C. J., Malpica Vázquez, A., López Collado, J., García Pérez, E., & Sol Sánchez, Á. (2013). Crecimiento de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. en la zona central de Veracruz. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 4(SPE5), 1005-1014.
- Magro, S., & Pérez Maurice, M. B. (2017). Evaluación de nopales (*Opuntia ficus indica*) como fuente de calcio.
- Martínez-Salgado, F., Pérez-Moreno, J., Ochoa-Martínez, D. L., Rojas-Martínez, R. I., & Arellano-Ostoa, G. (2020). Etiología del engrosamiento del cladodio de nopal tunero (*Opuntia ficus-indica* (L.) mill.) en México. *Agrociencia*, 54(4), 521-530.
- Mendoza, A. V., Hernández, A. F., & Suárez, J. B. (2008). DINÁMICA DE LAS PRINCIPALES PLAGAS DE NOPAL *Opuntia spp.* EN LA ZONA SEMIÁRIDA DE QUERÉTARO. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 7(1), 21-27.
- Mendoza Orozco, M. E. (2016). Acorazonamiento de cladodios en sistemas productivos de nopal *Opuntia sp* (Master's thesis, La autora).

- Mo, X. H., Qin, X. Y., Wu, J., Yang, C., Wu, J. Y., Duan, Y. Q., ... & Chen, H. R. (2003). Complete nucleotide sequence and genome organization of a Chinese isolate of tobacco bushy top virus. *Archives of virology*, *148*(2), 389-397.
- Monje, J. L., & Lara, L. F. (2019). Revisión: Genómica de las interacciones entre fitoplasmas, hospederos vegetales e insectos vectores. *BISTUA REVISTA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BASICAS*, 143-165.
- Ochoa, M. J., Rivera-López, L., & Gómez-Leyva, J. F. (2016). Método de selección en explantes in vitro de *Opuntia* spp. con resistencia a la mancha negra causada por *Pseudocercospora opuntiae*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, *48*(1), 21-31.
- Pablo Ríos, N. P., Hernández Tapia, A., & Cruz Rodríguez, J. A. (2015). Efecto del sombreado en el ataque del picudo (*Cactophagus spinolae*) en plantas de pitayo (*Stenocereus stellatus*) en Pizotlán, Morelos, México. In V Congreso Latinoamericano de Agroecología-SOCLA (7 al 9 de octubre de 2015, La Plata).
- Palomino-Camargo, C., & González-Muñoz, Y. (2014). Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, *31*, 535-546.
- Panyagua, 2019. Manejo integrado del engrosamiento del cladodio en tres cultivares de nopal tunero en Teotihuacán, estado de México. Colegio de Posgraduados. Texcoco Edo. de México.
- Pimienta BE 1990. El nopal tunero. Primera edición. Universidad de Guadalajara. CECSA Guadalajara, Jalisco, México. 246 p.
- Quezada Salinas, A., Sandoval Islas, J. S., Alvarado Rosales, D., & Moreno Velázquez, M. (2013). Histopatología y patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal. *Revista mexicana de micología*, *38*, 9-18.
- Torre-Almaraz, R. D. L., Salazar-Segura, M., & Ruiz-Medrano, R. (2007). Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia*, *41*(7), 763-773.

- Saenz, C. 2006. Utilización agroindustrial de nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, Producción y Protección vegetal, 162. Roma. ISSN 1020-4334.
- Salas-Marina, M. A., Silva-Flores, M. A., Uresti-Rivera, E. E., Castro-Longoria, E., Herrera-Estrella, A., & Casas-Flores, S. (2011). Colonization of Arabidopsis roots by *Trichoderma atroviride* promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 15-26.
- Santiago-Lorenzo, M., López-Jiménez, A., Saucedo-Veloz, C., Cortés-Flores, J. I., Jaén-Contreras, D., & Suárez-Espinosa, J. (2016). Nutritional composition of tender cactus stems produced under mineral and organic fertilization. *Revista fitotecnia mexicana*, 39(4), 403-407.
- SADER, (2020). Panorama nacional de la mancha negra del nopal (*Pseudocercospora opuntiae*). Análisis estratégico de riesgos sanitarios
- Scheinvar, L., Olalde-Parra, G., & Gallegos-Vázquez, C. (2015). A new species of the genus *Opuntia* (Cactaceae) for the state of Veracruz, Mexico. *Botanical Sciences*, 93(1), 33-39.
- 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. Informe detallado.
- Seemüller, E. y Schneider, B. (2004). 'Candidatus Phytoplasma mali', 'Candidatus Phytoplasma pyri' y 'Candidatus Phytoplasma prunorum', los agentes causales de la proliferación de manzanas, el declive de las peras y el amarillo de las frutas de hueso europeas, respectivamente. *Revista Internacional de Microbiología Sistemática y Evolutiva*, 54 (4), 1217-1226.
- Steiner, A. A. (1984). The universal nutrient solution. In 6. *International Congress on Soilless Culture, Lunteren (Netherlands), 29 Apr-5 May 1984*. ISOSC.
- SIAP (Agricultural and Fishery Information System). 2020. secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México. Consultado

en: https://nube.siap.gob.mx/avance_agricola/. Fecha de consulta: 2 de noviembre del 2021.

- Smith, CJ y Osborn, AM (2009). Ventajas y limitaciones de los enfoques basados en PCR cuantitativa (Q-PCR) en ecología microbiana. *FEMS microbiología ecología*, 67 (1), 6-20.
- Solano, J. y Orihuela, A. (2008). Supervivencia y Producción de Brotes de Tuna (*Opuntia ficus-indica*) Utilizando Fracciones Mínimas. *Diario de la Asociación Profesional para el Desarrollo de Cactus*, 10 , 198-208.
- Suaste Dzul, A., Rojas Martínez, R. I., Zavaleta Mejía, E., & Pérez Brito, D. (2012). Molecular Detection of Phytoplasmas in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) with Thickening of the Cladode. *Revista mexicana de fitopatología*, 30(1), 81-85.
- Vanegas-Rico, J. M., Lomeli-Flores, J. R., Rodríguez-Leyva, E., Mora-Aguilera, G., & Valdez, J. M. (2010). Enemigos naturales de *Dactylopius opuntiae* (Cockerell) en *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller en el centro de México. *Acta zoológica mexicana*, 26(2), 415-433.
- Valadez-Moctezuma, E., Ramírez-Alba, N. A., Sánchez-Ávila, A. S., Samah, S., Valdovinos-Ponce, G., & Soto-Hernández, R. M. (2021). Histological, hormonal and nutritional changes in *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes with thickening symptoms. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 115, 101688.
- Valdelamar, L. M. M., Díaz, A. S., & Flores, R. C. (2011). Secuenciación de fragmentos de ADN.
- Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K. y Kahl, G. (2005). Toma de huellas dactilares de ADN en plantas: principios, métodos y aplicaciones. Prensa CRC.
- Zambrano Uribe, JC (2008). Amplificación, secuenciación y clonación de regiones de los genes 16S-23S rRNA del cromosoma del fitoplasma que infecta *Fraxinus* sp. en Bogotá, Colombia.
- Zimmermann, H. G., Sandí, M. P., & Rivera, A. B. (2005). La situación de *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae) en el Caribe y la posibilidad de su diseminación a México. *Informe para el Organismo Internacional de*

Energía Atómica (OIEA), Departamento de Cooperación Técnica y División Conjunta FAO/OIEA y la Dirección General de Sanidad Vegetal (DGSV-SAGARPA) como parte del. IAE

