



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA EN HORTICULTURA

**TRANSCRIPTÓMICA COMPARATIVA DURANTE EL DESARROLLO
DE FRUTOS DE *Opuntia albicarpa* Scheinvar Y *Opuntia joconostle*
F.A.C. Weber**

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

M.C. JESÚS JESÉ CORRAL MARTÍNEZ



APROBADA



Bajo la dirección de:

DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

Chapingo, Estado de México, junio de 2024.

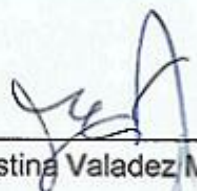


**TRANSCRIPTÓMICA COMPARATIVA DURANTE EL DESARROLLO DE
FRUTOS DE *Opuntia albicarpa* Scheinvar y *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber**

Tesis realizada por **Jesús Jesé Corral Martínez** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTORA:



Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR:



Dr. José Luis Rodríguez de la O

ASESOR:



Dr. José Oscar Mascorro Gallardo

ASESOR:



Dr. José de Jesús López Reynoso

LECTOR EXTERNO:



Dr. Karel Johan Estrada Guerra

ÍNDICE GENERAL

LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS USADAS	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
DATOS BIOGRÁFICOS	iv
RESUMEN GENERAL	v
GENERAL ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Género <i>Opuntia</i>	3
2.1.1. Importancia.....	3
2.1.2. Descripción de <i>Opuntia albicarpa</i> Scheinvar	5
2.1.3. Fenología y desarrollo de los frutos de tuna	6
2.1.4. Descripción de <i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	7
2.1.5. Fenología y desarrollo de los frutos de xoconostle	8
2.1.6. Metabolitos identificados en tuna	9
2.2. Transcriptómica.....	9
2.2.1. Definición.....	9
2.2.2. Desarrollo de la técnica.....	11
2.2.3. Análisis bioinformático	12
2.2.4. Transcriptómica en plantas	14
2.3. Literatura citada.....	16

III. Artículo 1: The genus <i>Opuntia</i> : main uses, lines of research and perspectives.....	24
IV. Artículo 2: Genetic changes detected during the development of <i>Opuntia albicarpa</i> fruits through transcriptomic analysis in the metabolism of carbohydrates and the biosynthesis of flavonoids.	51
V. TRANSCRIPTÓMICA DURANTE EL DESARROLLO DE FRUTOS DE <i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber	102
5.1. Resumen	102
5.2. Abstract.....	103
5.3. Introducción.....	104
5.4. Materiales y métodos	105
5.5. Resultados	109
5.6. Discusión	120
5.7. Conclusiones.....	124
5.8. Literatura citada	125
VI. GENES INVOLUCRADOS EN LAS VÍAS DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES EN TUNA (<i>Opuntia albicarpa</i> SCHEINVAR) Y XOCONOSTLE (<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber).	132
6.1. Resumen	132
6.2. Abstract.....	133
6.3. Introducción.....	134
6.4. Materiales y métodos	135
6.5. Resultados	137
6.6. Discusión	151
6.7. Conclusiones.....	155
6.8. Literatura citada	156

VII. CONCLUSIONES GENERALES	162
--	------------

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Estadísticas de datos crudos y limpios de RNA-seq de lecturas de <i>Opuntia joconostle</i>	111
Cuadro 2: Vías KEGG enriquecidas para <i>Opuntia joconostle</i>	114
Cuadro 3: Transcritos expresados diferencialmente por comparación de etapas de desarrollo en <i>O. albicarpa</i> y <i>O. joconostle</i>	140
Cuadro 4: Vías KEGG del metabolismo de carbohidratos enriquecidas significativamente por comparación de etapas de desarrollo en <i>O. albicarpa</i> y <i>O. joconostle</i>	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Flujo de trabajo general para análisis bioinformático de datos de RNA.seq mediante Galaxy.....	14
Figura 2: Fenología del desarrollo y maduración de frutos de xoconostle (<i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber).....	105
Figura 3: Cambios en peso fresco de lóculo, de cáscara y total durante el desarrollo de frutos de <i>Opuntia joconostle</i> F.A.C. Weber. Medias con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey, P=0.05).	110
Figura 4: A) Diagrama de Venn con el número de transcritos anotados con Diamond BlastX y BlastP contra la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot. B) Diagrama de Venn con el número de genes anotados con Diamond BlastX y BlastP.	113
Figura 5: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del almidón y la sacarosa del desarrollo de fruto de <i>O. joconostle</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	116
Figura 6: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del piruvato del desarrollo de fruto de <i>O. joconostle</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos ...	117
Figura 7: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato del desarrollo de fruto de <i>O. joconostle</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	118
Figura 8: Mapa de calor de la vía KEGG Biosíntesis de metabolitos secundarios del desarrollo de fruto de <i>O. joconostle</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	119
Figura 9: A) Diagrama de Venn con el número de proteínas detectadas en <i>O. albicarpa</i> y <i>O. joconostle</i> con Blastp. B) Diagrama de Venn con el número de proteínas detectadas en <i>O. albicarpa</i> y <i>O. joconostle</i> con Blastx.	139
Figura 10: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del almidón y la sacarosa del desarrollo de fruto de <i>O. albicarpa</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	143

Figura 11: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del almidón y la sacarosa del desarrollo de fruto de <i>O. joconostle</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	144
Figura 12: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del piruvato del desarrollo de fruto de <i>O. albicarpa</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	145
Figura 13: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del piruvato del desarrollo de fruto de <i>O. joconostle</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	146
Figura 14: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato del desarrollo de fruto de <i>O. albicarpa</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	147
Figura 15: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato del desarrollo de fruto de <i>O. joconostle</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	148
Figura 16: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo fructosa y manosa del desarrollo de fruto de <i>O. albicarpa</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	149
Figura 17: Mapa de calor de la vía KEGG Biosíntesis de flavonoides del desarrollo de fruto de <i>O. albicarpa</i> . En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.	150

ABREVIATURAS USADAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

RNA-seq: Secuenciación de ARN.

Kegg Pathway: Colección de mapas de rutas metabólicas dibujados manualmente que representan nuestro conocimiento de las redes de interacción, reacción y relación molecular

GO (Gene Ontology): es la mayor fuente de información del mundo sobre las funciones de los genes.

EC (Enzyme Commission): esquema de clasificación numérica para las enzimas, con base en las reacciones químicas que catalizan.

DET: Transcritos expresados diferencialmente.

DEG: Genes expresados diferencialmente.

KEGG-Ko: Funciones moleculares representadas en términos de ortólogos funcionales.

BlastP: Compara proteínas con una base de datos de proteínas.

BlastX: Compara nucleótidos con una base de datos de proteínas.

DEDICATORIA

A mi madre: Gudulia Martínez García†

A mi padre: Delfino Corral Pacheco

A mi esposa: Jazmín Sánchez Sosa

A mi hijo: Eithan Jesé Corral Sánchez

A mis hermanos: Darely, Adelina, Berenice, Alondra y Delfino

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de doctorado.

A la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) por las facilidades otorgadas para el cumplimiento del plan de estudios.

Al Departamento de Fitotecnia, Instituto de Horticultura y al programa de Doctorado en Ciencias en Horticultura por las facilidades prestadas para el uso de equipo y laboratorio.

Al productor Javier Daniel Sánchez Gutiérrez de San Martín de las Pirámides Estado de México, por las facilidades dadas para realizar los muestreos en su predio.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por el apoyo y conocimiento compartido para la culminación de la investigación.

Al Dr. José Luis Rodríguez de la O, Dr. José Oscar Mascorro Gallardo, Dr. José de Jesús López Reynoso por el acompañamiento y apoyo brindado durante el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Samir Samah por su disposición y la capacitación brindada en el análisis transcriptómico.

Al Dr. Karel Johan Estrada Guerra por su colaboración como lector externo.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre: Jesús Jesé Corral Martínez
Fecha de nacimiento: 14 de mayo de 1989.
Lugar de nacimiento: Santiago Yosondúa, Oaxaca.
Curp: COMJ890514HOCRRS00.



Desarrollo académico

Bachillerato: Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo.
Licenciatura: Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Cédula profesional: 08722894.
Maestría: Maestría en Ciencias en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo. Cédula profesional: 13087615.

Asesor de productores en la empresa Agropecuaria Tataltepec S.C. de R.L. en 2011. Personal operativo del proyecto “Incentivos a la producción de cultivos de Oleaginosas” en la Dirección General de Fomento a la Agricultura, SAGARPA durante 2016, 2017 y 2018. Subjefe de departamento en la Dirección General de Sanidad Vegetal del SENASICA durante 2019. Ha participado en el IX Congreso Internacional de Biotecnología SOCIBI, Tlaxcala 2022 con la presentación: «Avances en el análisis transcriptómico durante la maduración de frutos de *Opuntia albicarpa* Scheinvar»

RESUMEN GENERAL

TRANSCRIPTÓMICA COMPARATIVA DURANTE EL DESARROLLO DE FRUTOS DE *Opuntia albicarpa* Scheinvar Y *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber

El nopal es un cultivo de importancia histórica, económica y social en México, el cual tiene gran potencial por las propiedades que presenta. Perteneciente a la familia Cactaceae, el género *Opuntia* cuenta con aproximadamente 180 especies reportadas, 80 de las cuales están presentes en México. Diversas especies de *Opuntia* se cultivan esencialmente para el consumo de sus frutos y cladodios tiernos (nopalitos), además de múltiples usos como: forraje, medicina natural, biogás, tintes, cosméticos, biopolímeros, entre otros. El objetivo de la presente investigación fue obtener el transcriptoma de frutos en desarrollo de *Opuntia albicarpa* y *Opuntia joconostle* para conocer los cambios fisiológicos que ocurren durante el proceso de maduración. Para *O. albicarpa* el total de lecturas obtenido fue alrededor de 704 millones y un ensamble de 240,169 transcritos; mientras que para *O. joconostle* se obtuvieron alrededor de 573 millones de lecturas y un ensamble de 159,783 transcritos. Se detectaron cerca de 39,000 y 33,000 secuencias de proteínas con BlastP para *O. albicarpa* y *O. joconostle*, respectivamente. En las vías del Metabolismo de carbohidratos de *O. albicarpa* se detectaron genes cuya expresión fue en aumento (BGLU12, TPPA, TPS7, TPPG, BAM2, PFK6, FBA3, XYLA, AGAL3 y GALM) y genes cuya expresión tendió a la baja (ADG2, PGMP, WAXY, TPS9, SPS, BGLU44, SS1, SS, DPEP, PFK3, GOLS2, AGAL1, RFS, FBA2, CFBP1 y TPI); mientras que para *O. joconostle* la expresión de los genes del Metabolismo de carbohidratos tendió a la baja (SS, SS4, TPS5, DPE2, AMY3, AGPS1, AAE3, ACO3, MD1, rbcL, SHM7, GDCSP, PPD, PPCA, accD y IPMSA). Los resultados pueden ser utilizados para estudios genéticos y moleculares sobre el género *Opuntia* y con ello comprender mejor su biología.

Palabras clave: *Opuntia*, transcriptómica, tuna, maduración, genes

Tesis de Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Jesús Jesé Corral Martínez.

Director de tesis: Dra. Ernestina Valadez Moctezuma.

GENERAL ABSTRACT

COMPARATIVE TRANSCRIPTOMY DURING FRUIT DEVELOPMENT OF *Opuntia albicarpa* Scheinvar AND *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber

The nopal is a crop of historical, economic and social importance in Mexico, which has great potential due to the properties it presents. Belonging to the Cactaceae family, the opuntia genus has approximately 180 reported species, 80 of which are present in Mexico. Various species of *Opuntia* are grown essentially for the consumption of their fruits and tender cladodes (nopalitos), in addition to multiple uses such as: forage, natural medicine, biogas, dyes, cosmetics, biopolymers, among others. The objective of the present research was to obtain the transcriptome of developing fruits of *Opuntia albicarpa* and *Opuntia joconostle* to understand the physiological changes that occur during the maturation process. For *O. albicarpa* the total reads obtained were around 704 million and an assembly of 240,169 transcripts; while for *O. joconostle* around 573 million reads and an assembly of 159,783 transcripts were obtained. About 39,000 and 33,000 protein sequences were detected with BlastP for *O. albicarpa* and *O. joconostle*, respectively. In the Carbohydrate metabolism pathways of *O. albicarpa*, genes whose expression was increasing (BGLU12, TPPA, TPS7, TPPG, BAM2, PFK6, FBA3, XYLA, AGAL3 and GALM) and genes whose expression tended to decrease were detected. (ADG2, PGMP, WAXY, TPS9, SPS, BGLU44, SS1, SS, DPEP, PFK3, GOLS2, AGAL1, RFS, FBA2, CFBP1 and TPI); while for *O. joconostle* the expression of the Carbohydrate metabolism genes tended to decrease (SS, SS4, TPS5, DPE2, AMY3, AGPS1, AAE3, ACO3, MD1, rbcL, SHM7, GDCSP, PPD, PPCA, accD and IPMSA). The results can be used for genetic and molecular studies on the *Opuntia* genus and thus better understand its biology.

Keywords: *Opuntia*, transcriptomics, prickly pear, maturation, genes

Doctorate Thesis in Horticulture Sciences, Chapingo Autonomous University.

Author: Jesús Jesé Corral Martínez.

Thesis director: Dr. Ernestina Valadez Moctezuma.

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

Opuntia, comúnmente conocido en México como nopal, es un género de plantas perteneciente a la familia de las cactáceas; el género *Opuntia* se encuentra distribuido desde la provincia de Alberta, en Canadá, hasta la Patagonia en Argentina; principalmente en las zonas desérticas del sur de Estados Unidos de América, de México y de América del Sur (Granados-Sánchez & Castañeda-Pérez, 2003). El nopal tunero fue llevado por los colonizadores españoles a Europa y de ahí se introdujo a diferentes partes del mundo (Granados-Sánchez & Castañeda-Pérez, 2003). *Opuntia* crece en medios con temperaturas extremas, y presencia de lluvias erráticas, y se adapta a las variaciones en los niveles de CO₂ atmosférico; además, desempeña un papel importante en el ecosistema puesto que protege la fauna silvestre (Méndez-Llorente et al., 2008). Existen alrededor de 300 especies del género; cerca de 100 de ellas existen en México y aproximadamente el 40 % se localiza en el desierto Chihuahuense (Méndez-Llorente et al., 2008).

Desde la época prehispánica, las culturas que coexistían en el territorio mexicano utilizaban el nopal como alimento, como medicamento, en la construcción y en las artes; su uso se continuó en la época colonial, con las aplicaciones que desde la época precolombina se tenían (Anaya-Pérez, 2001). De las más de 300 especies del género *Opuntia*, únicamente de 10 a 12 de ellas, han sido aprovechadas por el hombre (Aguilar et al., 2008; Sáenz et al., 2006). Su uso es principalmente para alimentación; pero, también se aprovechan para forraje y en la industria para la obtención de alcohol, colorantes (cochinilla), jabón, pectinas y aceites; estudios más recientes le han atribuido propiedades medicinales ya que posee efecto hipoglucemiante (Aguilar et al., 2008; Sáenz et al., 2006).

La taxonomía de los nopales se ha basado en descriptores morfológicos; posteriormente se enriqueció con descriptores bioquímicos, fisiológicos citogenéticos (Reyes-Agüero et al., 2009; Scheinvar, 1995; Valdéz-Cepeda et al., 2003; Valdéz-Cepeda & Blanco-Macías, 2002;).

Inicialmente, las isoenzimas y los RFLP sirvieron como marcadores fiables para los análisis genéticos de las plantas (Jana & Pietrzak, 1988; Miller & Tanksley,

1990; Wang et al., 1992). Las técnicas basadas en PCR como RAPD, ISSR, AFLP y SSRs proporcionan marcadores de DNA que están dispersos a lo largo de los genomas y son más fáciles de analizar y reproducir (Vos et al., 1995; Welsh & McClelland, 1990; Zietkiewicz et al., 1994); pero pocos de estos marcadores se han asociado con genes.

El fortalecimiento de la caracterización del nopal con marcadores moleculares ha permitido conocer de forma más eficiente la diversidad fenética y genética existente, apoyar su mejor ubicación taxonómica y contribuir en programas de mejoramiento genético para la creación de nuevas variedades (Illoldi-Rangel et al., 2012). Los perfiles de ADN detectados con RAPD e ISSR permitieron diferenciar 22 accesiones de nopal, de la misma forma que lo han logrado los caracteres morfológicos, así como observar la relación genómica entre las especies (Luna-Paez et al., 2007). Los marcadores moleculares representan herramientas confiables para la caracterización y diferenciación de las variedades de *Opuntia*, ya que no están influenciadas por el medio ambiente (Valadez-Moctezuma et al., 2016). Valadez-Moctezuma et al. (2015) utilizaron marcadores RAPD e ISSR, encontrando una ligera tendencia de separación entre tunas y xoconostles; Samah et al. (2015 y 2016) aplicaron marcadores bioquímicos, como proteínas de reserva de semillas y marcadores SSR y obtuvieron resultados similares. Valadez-Moctezuma et al. (2018) utilizaron cinco marcadores de retrotransposón IRAP, que permitió obtener una mejor tendencia a separar tunas de los tipos xoconostle.

Las tecnologías como la genómica y transcriptómica son importantes en la actualidad por su utilidad para establecer relaciones taxonómicas, identificación de especies y funcionalidad de los genes. De acuerdo con Lowe et al. (2017), la transcriptómica es una tecnología utilizada para estudiar el transcriptoma de un organismo; el contenido de información de un organismo se registra en el ADN de su genoma y se expresa mediante transcripción, donde el ARNm sirve como molécula intermediaria transitoria en la red de información; un transcriptoma captura de forma instantánea en el tiempo el total de transcripciones presentes en una célula.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El estudio de la biodiversidad en la era de las tecnologías “ómicas”, supone una disminución de tiempo y costos para caracterizar a nivel genómico, transcriptómico, proteómico, metabolómico, e incluso metagenómico, un gran número de especies que poseen características que han hecho su estudio muy complejo; las tecnologías “ómicas” permiten generar una cantidad masiva de datos que, junto con la bioinformática, representan alternativas tecnológicas modernas para responder a muchas preguntas e incertidumbres biológicas (Garavito *et al.*, 2017).

2.1. Género *Opuntia*

2.1.1. Importancia

De acuerdo con datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-SIAP (2023), para 2022 en México se registró una superficie cosechada de 43,547.78 ha y una producción de 444,080.55 t de tuna, donde el Estado de México se posiciona con la mayor superficie cosechada (15,817.6 hectáreas) y producción (154,978.09 t), equivalente al 35 % de la producción nacional.

Tradicionalmente y hasta la actualidad las plantas del género *Opuntia* sirven como fuente de frutos y vegetales para la alimentación, medicina, propósitos cosméticos, como forraje y como fuente de colorantes naturales; además, por su gran importancia en el desarrollo de la agricultura de desierto (Mendez-Farroñan, 2017). En los últimos años se ha reportado el potencial benéfico para la salud de algunos de sus compuestos bioactivos tales como, fenoles, flavonoides y betalaínas (Mendez-Farroñan, 2017).

El consumo de tuna aporta lípidos, proteínas, minerales, fibra, aminoácidos, vitamina C, compuestos fenólicos y pigmentos betalaínicos (Sumaya-Martínez et al., 2011). Los pigmentos, principalmente betalaínas, se encuentran en la pulpa y en la cáscara del fruto en algunas especies y variedades de *Opuntia*, estos pigmentos muestran una importante actividad antioxidante y un uso potencial como pigmentos naturales (Sumaya-Martínez et al., 2011).

Existe una amplia diversidad de variedades de nopal tunero con los tres colores típicos de frutas (blancas, rojas, amarillas y anaranjadas). La variedad Alfajayucan o Reyna tiene maduración temprana, produce frutos con alto contenido de azúcares (15.3 ° Brix), pocas semillas y cáscara delgada, lo que lo hace un fruto de alta calidad; Cristalina es la variedad que produce los frutos más grandes y de mayor peso de todas las variedades, el fruto es de maduración intermedia y aunque es una planta vigorosa, de rápido desarrollo y corto tiempo juvenil, tiene semillas grandes y menos azúcares (13.0 ° Brix) que otras variedades; la variedad Roja lisa es de maduración temprana, color rojo atractivo, con 14.9 ° Brix de contenido de azúcares, pocas semillas, cáscara gruesa que le permite una mayor vida de anaquel y receptáculo floral totalmente lleno; la variedad Amarilla Montesa produce fruta relativamente grande, color anaranjado muy atractivo a la vista, con 12.7 ° Brix de contenido de azúcares (Luna-Vázquez et al., 2012).

Diversos estudios cromosómicos efectuados en especies de *Opuntia* coinciden en el número básico de cromosomas ($x=11$); además de presentar poliploidía que va desde diploides ($2n=22$) hasta octaploides ($2n=88$). Muñoz-Urías et al. (2008) detectaron que existen diversos niveles de ploidía entre las diversas especies de *Opuntia*; indican que *O. cantabrigiensis* es diploide ($2n = 2x = 22$); *O. leucotricha* y *O. robusta* son tetraploides ($2n = 4x = 44$), *O. rastrera* es hexaploide ($2n = 6x = 66$) y *O. streptacantha* es octoploide ($2n = 8x = 88$). Ramírez-Godina et al. (2012)

analizaron características cromosómicas de *O. amyclaea*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha*, *O. ficus-indica*, *O. robusta* y *O. engelmanni*, en todos los casos presentaron 88 cromosomas $2n=8x$ (octaploides).

El xononostle presenta un mayor grosor de la cáscara que las tunas, el grosor de la cáscara disminuye conforme pasa el tiempo como consecuencia del proceso de maduración (Monroy-Gutiérrez et al., 2017). Los xoconostles presentan menor contenido de sólidos solubles totales a diferencia de las tunas; los valores de acidez titulable son similares entre los cultivares de tuna, y en xoconostles los valores son más altos (Monroy-Gutiérrez et al., 2017). Los xoconostles (*Opuntia* spp.) son frutas apreciadas por su mesocarpio carnoso y ácido, es una baya carnosa, ovoide prácticamente, cilíndrica; sus dimensiones y coloraciones varían según la especie, es de forma umbilicada en el extremo superior lo que se debe la cicatriz que deja la flor, tiene los llamados ahuates donde se distribuyen las espinas en las areolas y conserva la humedad, lo que lo hace un fruto jugoso y fresco (Guzmán-Maldonado et al., 2010).

2.1.2. Descripción de *Opuntia albicarpa* Scheinvar

Nombre común: Nopal de Alfajayucan, blanca de Alfajayucan o Reyna.

Planta arbórea, 2.5 a 5 m de altura, copa abierta; tronco definido de 1 m de largo y 30 cm de diámetro; cladodios glabros, abovados, hasta 48 cm de largo y 24 cm de ancho, verde grisáceo-amarillentos a verde-glaucos, recubiertos de una capa cerosa dispuesta en placas irregulares (Scheinvar, 1999). Hojas subuladas, ligeramente aplanadas de 4-5 mm de largo, verdes con el ápice purpúreo; areolas dispuestas en 10-11 series espiraladas, anchamente elípticas a subrotundadas de 4 mm de largo, aumentando mucho de dimensiones en el tronco, con lana marrón oscuro, de 1-2 mm de largo; glóquidas marrón oscuras; sin espinas en la base, 1-3 (-4)(-5), aciculares, punzantes, rígidas, aplanado-torcidas, divergentes y porrectas, de 3-5 cm, la inferior más corta, blancas con el ápice ambarino

(Scheinvar, 1999). Flores amarillo-anaranjadas, pasando a anaranjado-rojizas al final del día, de 8 cm de diámetro, pericarpelo piriforme, con areolas provistas de lana color marrón oscuro y glóquidas del mismo color, de 1-2 mm de largo; segmentos interiores del perianto amarillo-anaranjados pasando al final del día a color rojizo; filamentos con tintes purpúreos pasando a rosados; anteras amarillentas; estilo blanco; lóbulos del estigma 8, de color verde claro (Scheinvar, 1999). Fruto abovado de 6 a 9 cm de largo y 6-6.5 cm de ancho, externamente verdoso-blanquecino-amarillento, cáscara de 5-7 mm de ancho, cicatriz floral casi plana, areolas subcirculares a anchamente abovadas, de 3-4 mm de diámetro, distantes 12-14 mm entre sí, dispuestas en 7 series espiraladas, con lana amarillenta y glóquidas marrón rojizas; semillas abundantes, piriformes, discoidales a abovoides, angulosas, de 4 a 6 mm de largo y 3-4 mm de ancho, amarillo-grisáceas, con funículos jugosos y muy dulces; florece de febrero a junio y fructifica de julio a noviembre (Scheinvar, 1999).

2.1.3. Fenología y desarrollo de los frutos de tuna

La fenología de las plantas está relacionada al clima (temperatura, radiación y humedad), comprende fenómenos biológicos como la brotación de yemas, la inflorescencia y la maduración de los frutos, es indispensable reconocer cada uno de estos cambios biológicos para identificar los momentos clave para la toma de decisiones en relación con el manejo del cultivo; por lo tanto, es importante identificar la iniciación y finalización de la floración, la iniciación de la fase de fructificación y la duración del período de desarrollo del fruto (Amaya-Robles, 2009). El ciclo de desarrollo de los frutos de tuna a partir del inicio de floración en la planta hasta la completa maduración del fruto y el punto máximo de desarrollo y la madurez fisiológica de los frutos se obtiene 80 días después de la antesis (Amaya-Robles, 2009).

2.1.4. Descripción de *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber

Nombre común: Xoconostle, joconostle blanco, joconostle cenizo, nopal tempranillo, tuna xoconostle.

Hábito arbustivo, hasta 2.5 m de altura; tronco bien definido, alrededor de 20 cm de ancho, corteza grisácea; epidermis glabra a simple vista, pero con papilas digitiformes vistas al microscopio electrónico de barrido; estomas paracíticos, ligeramente hundidos; cladodios obovados, de 18 a 28 cm de largo, de 11.5 a 18.5 cm de ancho y cerca de 1.5 a 3 cm de espesor, de color verde, cubierto de una capa cerosa grisácea; aréolas 7 a 9 (12) series, angostamente piriformes, de 2 a 3 mm de largo y 1 a 2 mm de ancho, con fieltro corto, negruzco (Scheinvar et al., 2009). Glóquidas amarillas con la base marrón, cortas, dispuestas en la parte superior de la aréola; espinas 1 (2) (4) (6), principalmente en los bordes, ausente en la parte inferior de los cladodios, rígidas, desiguales, de 2 a 15 mm de largo, blancas, el ápice ambarino; cladodios juveniles con tubérculos prominentes; aréolas con fieltro marrón grisáceo claro; hojas subuladas, erectas, rosadas a rojizas; flores amarillas de 6.5 a 8 cm de largo (Scheinvar et al., 2009). Pericarpelo obovado de alrededor de 3.8 cm de largo y 2.3 cm de ancho, con aréolas dispuestas en 8 series, distantes 3 mm entre sí, con escama basal crasa; segmentos exteriores del perianto deltoides, el ápice mucronado y bordes dentados, amarillos verdosos con amplia estría mediana purpúrea; segmentos interiores marrón amarillentos, bordes superiores rectos, dentados, mucronados (Scheinvar et al., 2009). Estambres de un tercio del largo del perianto, filamentos blanco-amarillentos y anteras blancas; estilo cuneiforme, alrededor de 2 cm de largo, blanco en la base y rosado en la parte superior, lóbulos del estigma 5, papilosos, de aproximadamente 4 mm de largo, verdes con estría mediana rosada; granos de polen poliédricos, hexagonales, semitectados, reticulados, casi 61 μm , 14 poros, muros verrucosos (Scheinvar et al., 2009). Frutos

subglobosos, a veces piriformes, de 2 a 4 (5.5) cm de diámetro o de largo, con la cicatriz floral ligeramente hundida a hundida, estriada, cáscara muy delgada, verde a rosa rojizo cuando madura; aréolas chicas, dispuestas en 6 series, piriformes, distantes 1 cm entre sí y las series distantes 1.5 cm entre sí, lana marrón; espinas ausentes; pulpa gruesa, muy ácida, ligeramente perfumada, blanco rosado y rosa rojizo alrededor de las semillas; cámara ovárica céntrica, de 2 cm de largo y 3 cm de ancho (Scheinvar et al., 2009). Semillas dispuestas en el centro del fruto, lenticulares, rosadas, anguladas, de ca. 1.5 mm de diámetro; arilo lateral desigual ancho, con un mucrón característico; taza del hilo lateral subbasal; funículos secos; número cromosómico $2n = 66$ cromosomas (Scheinvar et al., 2009).

Existen 19 especies productoras de xoconostles distribuidas en el norte y centro del territorio mexicano, no obstante, se desconoce la superficie total que ocupan las especies cultivadas y silvestres; de estas especies, sólo *O. matudae* cv. Cuaresmero y *O. joconostle* cv. Burro se cultivan y explotan de forma comercial (Scheinvar, 2011).

2.1.5. Fenología y desarrollo de los frutos de xoconostle

En el Valle de México estas plantas florecen de mayo a agosto y los frutos maduros persisten durante más de seis meses en los cladodios, hasta ser cosechados (Scheinvar, 2009).

El ciclo reproductivo de *Opuntia joconostle* Weber es de 16 meses en la variedad cuaresmero y 11 en la variedad colorado, el patrón de crecimiento del fruto es variable en la variedad cuaresmero porque su ciclo es largo (224 días) y de maduración muy tardía (enero-abril); mientras que en la variedad colorado es de ciclo intermedio (142 días) y de maduración tardía (octubre-noviembre); el patrón de crecimiento de yema floral y fruto es sigmoidal simple con duración de 266

días en cuaresmero y 182 en colorado y el crecimiento transversal de pericarpio concluye en antesis y en esta fase se dispara el de lóculo que concluye en inicio de madurez (Sánchez-Venegas, 1993).

2.1.6. Metabolitos identificados en tuna

Los frutos de *Opuntia ficus-indica* contienen alcaloides fenólicos (betalaínas) como betacianina y betaxantina, y flavonoides glicosilados que exhiben diversas actividades farmacológicas; las betalaínas de color rojo y amarillo, que son pigmentos solubles en agua, se utilizan como colorantes alimentarios naturales (Stintzing et al., 2005).

Pooja (2016) evaluó metabolitos secundarios en *Opuntia dillenii*, donde encontró en los extractos de cladodio la presencia de fenoles, alcaloides, flavonoides, saponinas y glucósidos, mientras que los frutos mostraron la presencia de fenoles, alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, saponinas y taninos; entre los fitoquímicos detectados en el cladodio, se encontró que los fenoles (6.8%) eran los más representados, seguidos de los alcaloides (5.4%), los flavonoides (3.2%) y las saponinas (0.8%); del mismo modo, en los frutos, los fenoles fueron mayormente representados (5.2%), seguidos de alcaloides (4.3%), flavonoides (1.8%), saponinas (0.9%) y terpenoides (0.6%).

2.2. Transcriptómica

2.2.1. Definición

La transcriptómica es un área esencial para interpretar el funcionamiento del proceso transcripcional de los genes, el cual depende de estímulos intra o extracelulares que desencadenan cascadas de señalización en las que genes se expresan o reprimen de acuerdo con el tipo de estímulo inicial; para el estudio de los transcriptomas, también llamados estudios funcionales del genoma, la tecnología RNA-seq permite obtener la secuencia de los transcritos, cuantificar

el nivel de expresión génica de manera precisa y reproducible (Nookaew et al., 2012; Sims et al., 2014).

El estudio y análisis del transcriptoma es esencial para el entendimiento de la función de genes; de manera general se puede establecer que si un gen se expresa en una condición o célula determinada es porque cumple allí una función (Sedano & López, 2012). El estudio global del transcriptoma permite también establecer patrones de regulación génica coordinada, lo que contribuye no solo a dilucidar la función y agrupamiento de varios genes bajo un estímulo o condición específica, sino también a identificar elementos promotores comunes en varios genes; el RNA-seq no solo ha cambiado la manera de cómo se estudian los transcriptomas, sino que también ha permitido identificar y cuantificar nuevos y conocidos transcriptos relacionados con defensa vegetal (Sedano & López, 2012).

Gracias a que los costos de secuenciación han disminuido considerablemente, es viable secuenciar el genoma y los transcriptomas de virtualmente cualquier organismo pluricelular o de microorganismos cultivables *in vitro*; adicionalmente, el desarrollo tecnológico y el aumento de poder de cómputo hacen factible el análisis de transcriptomas en ordenadores personales (Barrett et al., 2012). Una muestra clara de la adopción y relevancia de la secuenciación como herramienta de estudio es el número creciente de genomas secuenciados depositados en el NCBI (Barrett et al., 2012).

El RNA-seq es una herramienta que permite evaluar el estado transcripcional de un organismo, órgano o tejido, típicamente para comparar distintos tratamientos, condiciones, o estadios de desarrollo (Van Verk et al., 2013; Wang et al., 2009). El RNA-seq permite detectar la transcripción de genes que se expresan en niveles bajos, además de polimorfismos de una sola base e isoformas, es decir,

variantes de transcritos que se obtienen mediante el procesamiento diferencial de pre mensajeros provenientes del mismo gen (Zhao et al., 2014).

2.2.2. Desarrollo de la técnica

En general, los estudios que utilizan al RNA-seq siguen una serie de pasos comunes, los cuales inician con la extracción de RNA total de las muestras biológicas de interés, enriquecimiento de RNA mensajero (mRNA), preparación de bibliotecas (“libraries”) para secuenciación y finalmente su secuenciación; el mRNA se utiliza para la síntesis de cDNA de ambas cadenas, cuya secuencia permite deducir la secuencia de nucleótidos del mRNA original (Rodríguez-Alonso & Shishkova, 2018). Se puede secuenciar a las moléculas completas de cDNA, o bien, se pueden fragmentar mediante métodos mecánicos y realizar una selección de fragmentos por tamaño, usualmente de entre 200-1,000 nucleótidos; la secuenciación de los fragmentos cortos es mucho más económica, y debido a ello es la técnica más utilizada; las secuencias cortas que se obtienen a partir de estos fragmentos de cDNA se les conoce como lecturas (“reads”), las cuales se pueden generar en los formatos de lecturas simples (“single-end”) cuando la secuenciación se realiza sólo en alguno de los extremos de cada fragmento, o bien como lecturas pareadas (“paired-ends”) cuando a partir del mismo fragmento se secuencian los dos extremos; ambos formatos de lectura permiten cuantificar los niveles de abundancia de transcritos (Rodríguez-Alonso & Shishkova, 2018). Una vez que se ensamblaron los contigs (lecturas), se mapean sobre ellos y se cuantifican; al normalizar el número de lecturas mapeadas sobre cada transcrito con base en la longitud de cada contig y el tamaño de la biblioteca de secuenciación, se puede calcular la abundancia relativa de cada transcrito en las muestras biológicas que se secuenciaron (Rodríguez-Alonso & Shishkova, 2018).

Actualmente las tres tecnologías principales para la secuenciación de transcriptomas son: la secuenciación por síntesis, la secuenciación por

semiconducción y la secuenciación en tiempo real de molécula única; de éstas, la secuenciación por síntesis, desarrollada por la compañía Solexa y comercializada por la compañía Illumina, es la más utilizada (Ari & Arikan, 2016).

2.2.3. Análisis bioinformático

Las lecturas que se obtienen mediante las plataformas de secuenciación deben ser preprocesadas para identificar y remover a los sitios no informativos; estos incluyen a las secuencias adaptadoras de la plataforma de secuenciación, bases ambiguas y bases no resueltas; la remoción de sitios no informativos resultará en lecturas de diversos tamaños, a partir de las cuales es necesario descartar también a las lecturas muy cortas, pues éstas son más propensas a ser mapeadas en más de un sitio (Zhang et al., 2014).

Una vez que las lecturas han sido preprocesadas, se procede al ensamblaje del transcriptoma; de manera general, los ensambladores descomponen virtualmente a las lecturas de secuenciación en fragmentos pequeños, conocidos como palabras o k-meros, los cuales se utilizan en rondas de alineamiento para encontrar a los k-meros que se superponen en los extremos 5' o 3' (Rodríguez-Alonso & Shishkova, 2018).

Una vez que las lecturas se han fusionado en contigs, es necesario asignar a cada uno de estos una identidad y función putativa; a este proceso se le conoce como anotación y se basa principalmente en la búsqueda por homología de secuencias caracterizadas y depositadas en bases de datos tales como RefSeq (Pruitt et al., 2012).

Uno de los objetivos más comunes de los experimentos de RNA-seq es identificar a los transcritos que se regulan de manera diferencial entre dos condiciones; los algoritmos para mapear lecturas sobre los contigs funcionan, básicamente, a

partir de alineamientos globales entre las lecturas procesadas y las secuencias de referencia (Rodríguez-Alonso & Shishkova, 2018).

Existen plataformas web como Galaxy que ofrece acceso a herramientas que permiten a investigadores sin experiencia en informática realizar análisis computacionales de grandes conjuntos de datos (Afgan et al., 2018). La secuenciación de ARN (RNA-seq) es la tecnología apropiada para estudios transcriptómicos y existen numerosas herramientas disponibles en Galaxy para analizar estos conjuntos de datos, principalmente para control de calidad (Andrews et al., 2012), y análisis de expresión diferencial (Varet et al., 2016).; el proyecto Galaxy es de acceso abierto, presenta características colaborativas y es respaldado por una activa comunidad de usuarios y desarrolladores (Vandel et al., 2020). En la Figura 1 se muestra el flujo de trabajo general para realizar el análisis bioinformático con herramientas de la plataforma Galaxy, y otras como EggNOG-Mapper (anotación funcional) Kobas (Vías Kegg y términos GO significativas) y Revigo (clasificación de términos GO), las cuales son de acceso abierto.

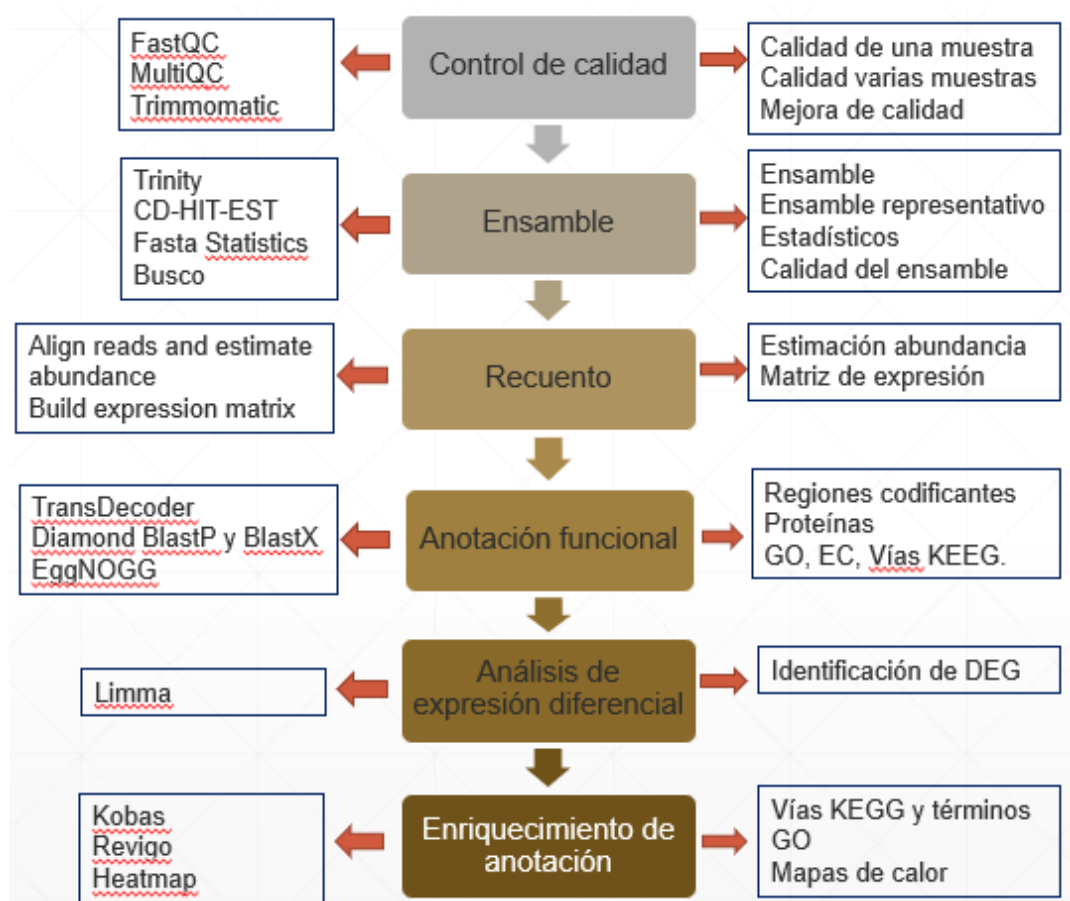


Figura 1: Flujo de trabajo general para análisis bioinformático de datos de RNA-seq mediante Galaxy.
Fuente: Elaboración propia

2.2.4. Transcriptómica en plantas

Entre las aplicaciones de la tecnología RNA-seq, destacan proyectos colaborativos como el OneKP, en el cual se secuenciaron los transcriptomas de más de 1,300 especies pertenecientes a distintas familias de plantas, que permitieron realizar análisis de transcriptómica comparativa para obtener filogenias moleculares con mejor resolución (Jiao et al., 2012; Yang et al., 2016). Detectar cambios en los niveles de expresión génica bajo diferentes condiciones

biológicas y/o tejidos celulares, para entender como los factores ambientales influyen en los estados de desarrollo y las funciones celulares (Mutz et al., 2013).

También ha servido para analizar la divergencia de regiones regulatorias para la subfuncionalización y neofuncionalización de factores transcripcionales y su importancia en la remodelación de redes de regulación genética (Sayou et al., 2014), además de la caracterización de interacciones planta-patógeno (Nagano et al., 2015), identificar y cuantificar transcritos nuevos y conocidos, relacionados con procesos bioquímicos como la fotosíntesis (Xu et al., 2013), la asimilación de nitrógeno (Gao et al., 2014), la síntesis de metabolitos de interés productivo y/o comercial, entre muchos otros (Han et al., 2013).

En el área de la biología evolutiva, el análisis del transcriptoma del tomate domesticado y de algunas especies silvestres se utilizó para comparar los patrones de expresión de distintos genes para identificar a aquellos que fueron seleccionados artificialmente durante la domesticación de esta solanácea, así como los tipos de presión evolutiva que actuaron sobre esta especie durante distintas etapas de su domesticación y diferentes eventos de hibridación con especies silvestres (Koenig et al., 2013).

Behringer et al. (2015) identificaron genes candidatos para la respuesta al estrés por sequía en el abeto europeo (*Abies alba* Mill.), se construyó una biblioteca de ADNc agrupada a partir de los cotiledones de seis plántulas de abeto estresadas por la sequía y seis sometidas a riegos, respectivamente; los análisis de expresión diferencial de estas bibliotecas revelaron 296 genes candidatos para la respuesta al estrés por sequía.

Perreira et al. (2018) realizaron un perfil transcriptómico de la expresión de genes relacionados con la respuesta al daño del ADN/mecanismos de remodelación de la cromatina en semillas de *P. vulgaris* en cuatro etapas de desarrollo distintas;

en la embriogénesis tardía, una alta expresión de genes relacionados con la detección y reparación de daños en el ADN sugiere que existe un control estricto de la integridad del ADN; al final del llenado y el inicio de la deshidratación de la semilla, la regulación positiva de los genes implicados en la detección de roturas de doble cadena de ADN sugiere que se desafía la integridad del genoma; la expresión de genes relacionados con la reparación por escisión de nucleótidos y la estructura de la cromatina se evidencia durante la etapa de desecación.

Afonso-Grunz et al. (2014) evaluaron los transcriptomas específicos de nódulos de raíz de garbanzo donde encontraron que muchas de las transcripciones expresadas diferencialmente codifican proteínas simplificadas en el metabolismo del azúcar, la defensa antioxidante, así como las respuestas al estrés biótico y abiótico de las células huésped, y algunas de ellas ya se sabe que contribuyen a la fijación simbiótica de nitrógeno en otras leguminosas.

El rápido desarrollo de las tecnologías de secuenciación, y de procesamiento de información masiva, permite actualmente que el RNA-seq ofrezca oportunidades diversas y atractivas en distintas áreas de la ciencia (Rodríguez-Alonso & Shishkova, 2018).

2.3. Literatura citada

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A. & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018update. *Nucleic Acids Research*, 46, 537–544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Afonso-Grunz, F., Molina, C., Hoffmeier, K., Rycak, L., Kudapa, H., Varshney, R. K., Devon, J. J., Winter, P. & Kahl, G. (2014). Genome-based analysis of the transcriptome from mature chickpea root nodules. *Frontiers in Plant Science*, 5, 325. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00325>

- Aguilar, C. N., Rodríguez, H. R., Saucedo, P. S. & Jasso, C. D. (2008). *Fitoquímicos Sobresalientes del Semidesierto mexicano: de la planta a los químicos naturales y a la biotecnología*. Path Design Saltillo.
- Amaya-Robles, J. E. (2009). *El cultivo de tuna Opuntia ficus-indica*. Gerencia Regional Agraria La Libertad.
- Anaya-Pérez, M. A. (2001). History of the use of *Opuntia* as forage in México. In: C. Mondragón-Jacobo & S. Pérez-González, (Eds.), *Cactus (Opuntia spp.) as forage*. FAO Plant Production and Protection Paper.
- Andrews, S. (2012). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. *Babraham Bioinformatics*. Recuperado el 15 de febrero de 2022 de <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Ari, Ş. & Arıkan, M. (2016). Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. In: K. Hakeem, H. Tombuloğlu & G. Tombuloğlu (Eds.) *Plant Omics: Trends and Applications*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31703-8_5
- Barrett, T., Wilhite, S.E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I.F., Tomashevsky, M., Marshall, K.A., Phillippy, K.H., Sherman, P.M., Holko, M., Yefanov, A., Lee, H., Zhang, N., Robertson, C.L., Serova, N., Davis, S. & Soboleva, A. (2012) NCBI GEO: archive for functional genomics data sets - update. *Nucleic Acids Research*, 41, D991-D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1193>
- Behringer, D., Zimmermann, H., Ziegenhagen, B. & Liepelt, S. (2015). Differential Gene Expression Reveals Candidate Genes for Drought Stress Response in *Abies alba* (Pinaceae). *PLoS ONE*, 10(4): Article e0124564. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124564>
- Garavito, A., González-Muñoz, A., Mosquera, J., Álvarez-Yela, A., Lopez-Alvarez, D., & Cristancho, M. (2017). Biodiversidad latinoamericana y sus perspectivas de estudio con tecnologías 'ómicas'. *Mexican Journal of Biotechnology*, 2(2) 98-129.
- Gao, J., Zhang, Y., Zhang, C., Qi, F., Li, X., Mu, S. & Peng, Z. (2014). Characterization of the Floral Transcriptome of Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) at Different Flowering Developmental Stages by Transcriptome Sequencing and RNASeq Analysis. *PLoS ONE*. 9(6): Article e98910. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098910>
- Granados-Sánchez, D. & Castañeda-Pérez. A. D. (2003). *El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia frutícola*. Trillas

- Guzmán-Maldonado, S. H., Morales-Montelongo, A. L., Mondragón-Jacobo, C., Herrera-Hernández, G., Guevara-Lara, F., & Reynoso-Camacho, R. (2010). Physicochemical, nutritional, and functional characterization of fruits xoconostle (*Opuntia matudae*) pears from Central-México Region. *Journal of Food Science*, 75(6), C485-C492. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01679.x>
- Han, X. J., Wang, Y. D., Chen, Y. C., Lin, L. Y., & Wu, Q. K. (2013). Transcriptome Sequencing and Expression Analysis of Terpenoid Biosynthesis Genes in *Litsea cubeba*. *PLoS ONE*, 8(10), Article e76890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076890>
- Iloldi-Rangel, P., Ciarleglio, M., Sheinvar, L., Linaje, M., Sánchez-Cordero, V. & Sarkar, S. (2012) *Opuntia* in México: Identifying Priority Areas for Conserving Biodiversity in a Multi-Use Landscape. *PLoS ONE*, 7(5): Article e36650. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036650>
- Jana, S., & Pietrzak, L. (1988). Comparative assessment of genetic diversity in wild and primitive cultivated barley in a center of diversity. *Genetics*, 119(4), 981-990.
- Jiao, Y., Leebens-Mack, J., Ayyampalayam, S., Bowers, J. E., McKain, M. R., McNeal, J., Rolf, M., Ruzicka, D. R., Wafula, E., Wickett, N. J., Wu, X., Zhang, Y., Wang, J., Zhang, Y., Carpenter, E. J., Deyholos, M. K., Kutchan, T. M., Chanderbali, A. S., Soltis, P. S., Stevenson, D. W., McCombie, R., Pires, J. C., Wong, G. K., Soltis, D. E. & Depamphilis, C. W. (2012) A genome triplication associated with early diversification of the core eudicots. *Genome Biology*, 13(3). <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-1-r3>
- Koenig, D., Jiménez-Gómez, J. M., Kimura, S., Fulop, D., Chitwood, D. H., Headland, L. R., Kumar, R., Covington, M. F., Devisetty, U. K., Tat AV, Tohge, T., Bolger, A., Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Xiong, G., Taylor-Teeple, M., Brady, S. M., Pauly, M., Weigel, D., Usadel, B., Fernie, A. R., Peng, J., Sinha, N. R. & Maloof, J. N. (2013). Comparative transcriptomics reveals patterns of selection in domesticated and wild tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(28), E2655-E2662. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309606110>
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology*, 13(5), Article e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
- Luna-Paez, A., Valadez-Moctezuma, E., Barrientos-Priego, A. F. & Gallegos-Vázquez, C. (2007). Characterization of *Opuntia* spp. by means of seed

- with RAPD and ISSR markers and its possible use for differentiation. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 9, 43-59.
- Luna-Vázquez, J., Zegbe-Domínguez, J. A., Mena-Covarrubias, J. & Rivera-Lozano, M. T. (2012). *Manejo de plantaciones de nopal tunero en el Altiplano Potosino*. [Folleto para Productores]. INIFAP.
- Mendez-Farroñan, S. J., Alaya-Bernabé, L. S., Masías, R. P. & Cedeño, E. V. (2017). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. como fuente de compuestos bioactivos para la salud y enfermedad. *UCV-Scientia*, 9(1).
- Mendez Llorente, F., Ramirez Lozano, R. G., Lopez Carlos, M. A., Rodriguez-Frausto, H., Arechiga Flores, C. F., Bonilla-Salazar, A., Nuñez-Gonzalez, M. A. & Aguilera-Soto, J. I. (2011). Performance and nutrient digestion of lambs fed incremental levels of wild cactus (*Opuntia leucotrichia*). *Journal of Applied Animal Research*, 39(3), 248-251. <https://doi.org/10.1080/09712119.2011.588406>
- Miller, J. C. & Tanksley, S. D. (1990). RFLP analysis of phylogenetic relationships and genetic variation in the genus *Lycopersicon*. *Theoretical and Applied Genetics*. 80, 437–448. <https://doi.org/10.1007/BF00226743>
- Monroy-Gutiérrez, T., Martínez-Damián, M.T., Barrientos-Priego, A. F., Gallegos-Vázquez, C., Rodríguez-Pérez, J. E., & Colinas-León, M. T. B. (2017). Evaluación de algunas características físicas y químicas de frutos de xocotuna, tuna y xoconostle en poscosecha. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(1), 189-197. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i1.82>
- Mutz, K. O., Heilkenbrinker, A., Lönne, M., Walter, J. G. & Stahl, F. (2013). Transcriptome analysis using next-generation sequencing. *Current Opinion in Biotechnology*. 24(1): 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2012.09.004>
- Muñoz-Urias, A., Palomino-Hasbach, G., Terrazas, T., García-Velázquez, A., & Pimienta-Barrios, E. (2008). Variación anatómica y morfológica en especies y entre poblaciones de *Opuntia* en la porción sur del Desierto Chihuahuense. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 83, 1-11. Recuperado el 09 de marzo de 2024, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0366-21282008000200001&lng=es&tlng=es
- Nagano, A.J., Honjo, M.N., Mihara, M., Sato, M. & Kudoh, H. (2015) Detection of plant viruses in natural environments by using RNA-Seq. *Methods in Molecular Biology*, 1236, 89-98. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1743-3_8

- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtapong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlén, M. & Nielsen, J. (2012). A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: a case study in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acids Research*, 40(20), 10084–10097, <https://doi.org/10.1093/nar/gks804>
- Perreira, J. R., Balestrazzi, A., Fevereiro, P. & De Sousa A. S. (2018). Maintaining Genome Integrity during Seed Development in *Phaseolus vulgaris* L.: Evidence from a Transcriptomic Profiling Study. *Genes*. 9(10), 463; <https://doi.org/10.3390/genes9100463>
- Pooja, S. (2016). Phytochemical screening for secondary metabolites of *Opuntia dillenii* Haw. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 4(5), 39-43. <https://www.plantsjournal.com/archives/2016/vol4issue5/PartA/4-4-38-365.pdf>
- Pruitt, K. D., Tatusova, T., Brown, G. R. & Maglott, D. R. (2012). NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic Acids Research*, 40, D130-D135. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1079>
- Ramírez-Godina, F., Robledo-Torres, V., Escobedo-Bocardo, L. & Portos-Gaona L. (2012). Estudio cromosómico y análisis cariotípico en especies de *Opuntia*. XXX VBBBO NY5, 305.
- Reyes-Agüero, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., Carlin, F. C. & González, D. A. (2009). *Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de Opuntia en la Altiplanicie Meridional de México*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.
- Rodríguez-Alonso, G. & Shishkova, S. (2018). Estudio del transcriptoma mediante RNA-seq con énfasis en las especies vegetales no modelo. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 37(3):75-88.
- Sáenz, C., Berger, H., Corrales, G.J., Galletti, L., García, C.V., Higuera, I. Mondragón, C., Rodríguez, F. A., Sepúlveda, E. & Varnero, M. T. (2006). *Utilización agroindustrial del nopal*. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Samah, S., Ventura-Zapata, E. & Valadez Moctezuma, E. (2015). Fractionation and electrophoretic patterns of seed protein of *Opuntia* genus. A preliminary survey as a tool for accession differentiation and taxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58, 187-194. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2014.12.005>

- Sánchez-Venegas, G. (1993). *Phenological and chemical characterization of Opuntia joconostle* Weber, at Sn. Martin de las Piramides, Mexico State. Colegio de Postgraduados.
- Sayou, C., Monniaux, M., Nanao, M. H., Moyroud, E., Brockington, S. F., Thévenon, E., Chahtane, H., Warthmann, N., Melkonian, M., Zhang, Y., Wong, G. K., Weigel, D., Parcy, F. & Dumas, R. (2014). A promiscuous intermediate underlies the evolution of LEAFY DNA binding specificity. *Science*, 343(6171), 645-648. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.1248229>
- Scheinvar, L. (1995). Taxonomy of utilized opuntias. En: G. Barbera, P. Inglese, E. Pimienta-Barrios (Eds). *Agro-Ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear*. 20–27.
- Scheinvar, L. (1999). *Opuntia albicarpa* Scheinvar, una nueva especie para la ciencia del Estado de México. *Revista del Jardín Botánico Nacional*, 20, 167-169. <https://www.jstor.org/stable/42597057>
- Scheinvar, L., Filardo-Kerstupp, S., Olalde-Parra, G. & Zavaleta-Beckler, P. (2009). *Diez especies mexicanas productoras de xoconostles: Opuntia spp y Cyllindropuntia imbricata* (Cactaceae). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Scheinvar, L., Gallegos Vázquez, C., Olalde-Parra, G., Sánchez-Cordero, V., & Linaje, M. (2011). *Estado del conocimiento de las especies del nopal (Opuntia spp.) productoras de xoconostles silvestres y cultivadas*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Sedano, S. & López C. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*. 16(2), 101-113. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209126216009>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). Producción Agrícola. Recuperado el 25 de enero de 2024 de <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sims, D., Sudbery, I., Ilott, N. E., Heger, A. & Ponting, C. P. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nature Reviews Genetics*, 15(2), 121-132. <https://doi.org/10.1038/nrg3642>
- Stintzing, F.C., Herbach, K.M., Mosshammer, M.R., Carle, R., Yi, W., Sellappan, S., Akoh, C.C., Bunch, R. & Felker, P., (2005). Color, betalain pattern, and antioxidant properties of cactus pear (*Opuntia* spp.) clones. *Journal of*

Agricultural and Food Chemistry, 53(2), 442–451.
<https://doi.org/10.1021/jf048751y>

- Sumaya-Martínez, M. T., Cruz-Jaime, S., Madrigal-Santillán, E., García-Paredes, J. D., Cariño-Cortés, R., Cruz-Cansino, N., Valadez-Vega, C., Martínez-Cárdenas, L. & Alanís-García, E. (2011). Betalain, acid ascorbic, phenolic contents and antioxidant properties of purple, red, yellow and white cactus pears. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6452-6468.
<https://doi.org/10.3390/ijms12106452>
- Valadez-Moctezuma, E., Samah, S. & Luna-Paez, A. (2015). Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant Systematics and Evolution*, 301, 737-747.
<https://doi.org/10.1007/s00606-014-1112-y>
- Valadez-Moctezuma, E., Flores-Cantorian, C. & Samah, S. (2018). Potential role of transposable elements to differentiate tuna and xoconostle *Opuntia* varieties. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 20, 101-112. <https://doi.org/10.56890/jpacd.v20i.31>
- Valdéz-Cepeda, R. D., Blanco-Macías, F. & Gallegos-Vázquez, C. (2003). Ordenación y clasificación numérica en nopal tunero mediante atributos de fruto. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 9(2), 81-95,
<https://www.researchgate.net/publication/315344449>
- Varet, H., Brillet-Guéguen, L., Coppée, J. Y. & Dillies, M. A. (2016) SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS ONE*, 11(6), Article e0157022.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157022>
- Van Verk, M. C., Hickman, R., Pieterse, C. M. J. & Van Wees, S. C. M. (2013). RNA-seq: revelation of the messengers. *Trends in Plant Science* 18, 175-179. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.02.001>
- Vandel, J., Gheeraert, C., Staels, B., Eeckhoutte, J., Lefebvre, P. & Dubois-Chevalier, J. (2020) GIANT: galaxy-based tool for interactive analysis of transcriptomic data. *Scientific Reports* 10(1), Article 19835.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-76769-w>
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Friters, A., Pot, J., Paleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23(21), 4407–4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>

- Wang, Z., Gersten, M. & Snyder, M. (2009). RNAseq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Welsh, J. & McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18(24), 7213–7218. <https://doi.org/10.1093/nar/18.24.7213>
- Xu, J., Li, Y., Ma, X., Ding, J., Wang, K., Wang, S., Tian, Y., Zhang, H. & Zhu, X. G. (2013). Whole transcriptome analysis using next-generation sequencing of model species *Setaria viridis* to support C4 photosynthesis research. *Plant Molecular Biology*, 83(1–2): 77–87. <https://doi.org/10.1007/s11103-013-0025-4>
- Yang, Y., Moore, M. J., Brockington, S. F., Soltis, D. E., Wong, G. K., Carpenter, E. J., Zhang, Y., Chen, L., Yan, Z., Xie, Y., Xie, Y., Sage, R. F., Covshoff, S., Hibberd, J. M., Nelson, M. N. & Smith, S. A. (2016). Dissecting molecular evolution in the highly diverse plant clade Caryophyllales using transcriptome sequencing. *Molecular Biology and Evolution*, 32(8), 2001-2014. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv081>
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T. & Stamatakis, A. (2014). PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics*, 30(5), 614-620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>
- Zhao, S., Fung-Leung, W. P, Bittner, A., Ngo, K. & Liu, X. (2014). Comparison of RNA-seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS ONE*, 9(1), Article e78644. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078644>

Artículo enviado a la revista: Journal of the Professional Association for Cactus Development

III. Artículo 1: The genus Opuntia: main uses, lines of research and perspectives.

The genus *Opuntia*: main uses, lines of research and perspectives.

Corral-Martínez Jesús Jesé¹, Tornos-Olmedo Josue Natan², Valadez-Moctezuma Ernestina*³

¹Programa de Doctorado en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Carr. México-Texcoco Km. 38.5, Texcoco, Estado de México 56230, México.

² Programa de Maestría en Protección Vegetal, Universidad Autónoma Chapingo, Carr. México-Texcoco Km. 38.5, Texcoco, Estado de México 56230, México.

³ Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Carr. México-Texcoco Km. 38.5, Texcoco, Estado de México 56230, México.

*Corresponding author: evaladezm@chapingo.mx

Received:.....;Accepted:

ABSTRACT

The nopal (*Opuntia* spp.) is an emblematic crop in Mexico, but also promising due to the characteristics that define it. The nopal belongs to the Cactaceae Family and the Opuntioideae genus, of which around 180 species have been reported and approximately 80 of them are present in Mexico. Nopales have been cultivated since the first mesoamerican civilizations for at least 14,000 years for the purposes of human food, livestock, and for the production of pigment obtained from cochineal, which is an insect that parasitizes these crops. The fruit of the nopal in Mexico is recognized as “tuna” or “prickly pear” in the rest of the world. In Mexico, different species/genotypes of *Opuntia* are cultivated, mainly to obtain fruits or tender cladodes that are consumed as vegetables (nopalitos) and for livestock feeding, among other multiple uses such as biopolymers, biogas, dyes, cosmetics, natural medicine, etc. In the last decade, important research has been carried out on the genus in order to better understand its biology, physiology and genetics. This review addresses relevant aspects, as well as promising perspectives.

Keywords: *Cladodium, prickly pear, functional food, line research, omics.*

INTRODUCTION

The nopal is the cactus that has the greatest agronomic importance worldwide (Casas & Barbera, 2002; Inglese, 2018). Species of the genus *Opuntia* are widely distributed and have great economic potential due, among other attributes, to the fruit obtained from them. These fruits are rich in carbohydrates, fiber, vitamin C, minerals, betalains, phenolic compounds and flavonoids; however, in addition, its mature cladodes (pencas) are used as a source of food for livestock; since they are rich in fiber, carbohydrates, mineral matter and protein; in traditional (local) medicine for having nutritional properties and biological activities (Aruwa et al., 2018) since they contain chlorophylls, flavonoids, polyphenols, dietary fiber, mucilage, vitamin C and minerals (Guevara-Figueroa et al., 2010) ; and varied industrial uses (Torres-Ponce et al., 2015).

In Mexico, the *Opuntia* genus has marked both historical and cultural importance; this plant is even part of the emblem of the Mexican flag (Tenorio-Escandón et al., 2022). Since pre-Hispanic times, the cactus was used as food, for medicine, in construction, in the arts and for various other benefits (Anaya-Pérez, 2001). This group of plants was of great economic relevance for the Aztec civilization (Inglese, 2018).

The nopal has been considered the plant of the future, not only because of its importance in food, but because it is a plant that tolerates high temperatures, its drought and their CAM metabolism; in addition to its adaptability to poor soils (Inglese, 2018), conditions that continue to increase in many places on the planet.

CONTENT

Due to the importance from the biological and social point of view of the genus *Opuntia*, below is a review of its description, their distribution and diversity, as well as the main uses of the fruits and cladodes, but some new lines of research are also mentioned. The above is because it is important to understand better the *Opuntia* genus for optimally to take advantage of its nutritional and functional properties, as well as its adaptability to drought conditions.

Origin and domestication of *Opuntia*.

There are no records about its origin; according to Casas and Barbera (2002), archaeological remains of nopales were found in the caves of the Ajuereado phase (14,000-8,000 BC). Bravo Hollis and Sánchez Mejorada (1991) mention that the domestication of *Opuntia ficus-indica* began 8000 years ago. Likewise, Reyes-Agüero et al. (2005a) indicate that its domestication took place in the south of the southern Mexican Plateau.

Hoffman (1995) indicates that, in the early stages of the use of the nopal, the organ of interest was the fruit, whose consumption by ancient Mexicans has been documented through the study of coprolites found in caves, demonstrating that these fruits were part of the diet of various tribes.

There are no records of the consumption of nopalitos, due to its perishability, no residues have been found in the archaeological sites studied. The ancient Mesoamericans may have been forced to consume tender shoots to quench their thirst.

They could also be used as emergency food in times of fruit scarcity (Inglese et al., 2018). An important stage of the domestication process was the identification of plants without thorns, or with few of them, a mutant character that limits the survival of the plant in the natural environment (Colunga García et al., 1986). Modern varieties of nopalitos are spineless and were originally obtained from backyard orchards (Inglese et al., 2018).

Distribution and diversity of Opuntia

It is distributed from the southeastern of the United States, Mexico and Brazil countries; mainly in South America. Mexico is the main center of origin and diversification of species, hosting the greatest genetic diversity (Aparicio-Fernández et al., 2017). Species of the genus are also distributed in other parts of the world such as western Asia, northern and southern Africa (Nefzaoui & Ben Salem, 2002), Australia (Freeman, 1992) and the Mediterranean (Vilá et al., 2003). Various species of *Opuntia* are found in cultivated and wild conditions in Spain, Portugal, Italy, Chile, the United States of America, Brazil, Argentina, Israel, South Africa, Algeria, Jordan, among others (Granados-Sánchez and Castañeda-Pérez, 2003).

The introduction of the nopal to Europe may have occurred before 1552. Its presence was reported in Italy around 1560, in the Netherlands and Germany in 1583, and in England in 1595 (Donkin, 1977). The cactus dispersed along the Mediterranean coast, and the Moors on their return from Spain to North Africa, took it with them since the cladodes tolerated long trips (Kiesling, 1999). Throughout the 18th century, cactus pears dispersed to China (1700), South Africa (1772), India (1780) and Indochina (Donkin, 1977; Inglese et al., 2018).

There are between 150 and 180 recognized species, including *Nopalea* within the genus *Opuntia* (Stuppy, 2002; Hunt et al., 2006). Mendez-Llorente et al. (2011) report 300 species of the genus, of which between 80 to 100 exist in Mexico and of them, about 40% live in the Chihuahuan Desert. On the other hand, 210 species have been reported distributed in America, from Canada to Patagonia (Anderson, 2001; Nyffeler and Eggli, 2010); of which, 76 wild species are recognized in Mexico (Reyes-Agüero et al., 2009).

Plant Description

The genus *Opuntia* contains the most represented species within it (Aparicio-Fernández et al., 2017). *Opuntia* plants are shrubby to arborescent, 1.7 to 3 meters high (*O. ficus-indica*), with a lignified and well-defined primary stem (Reyes-Agüero et al., 2005a) (Figure 1). The cladodes correspond to parts of the pseudo stem; in *O. ficus-indica* they are succulent and typically oblong to spatulate-oblong in shape, usually 30-40 cm long, sometimes longer (70-80 cm) and 18 to 25 cm wide. Anatomically, the cladode in a cross section is an eustele formed by epidermis, cortex and vascular tissue in a ring, and organized in groups of vascular vessels separated by parenchyma and medulla tissue, which forms the majority of the lush tissue (Inglese et al., 2018).

According to Boke (1944) glochidia and spines, are recognized as equivalent to leaves. Inglese et al. (2018) to point out that in *O. ficus-indica*, the spines have a rough surface, and the glochidia have a smooth surface; The glochidia are organized in groups of 7 to 12, in the cavities of the areolas. The thorns are white; one or two are long (1.0 to 1.5 cm); accompanied by two smaller ones.

The flowers are hermaphrodite and actinomorphic. They have sepals and petals that are oblong and fused at the base. The sepals are smaller, and the petals are bright, yellow or pink (Inglese et al., 2018). *O. ficus-indica* develops 20 or more flower buds per cladode, the stamens have a pair of anthers, each with two pollen sacs, it has an ovary with 6 to 12 carpels (usually 6) and the unilocular ovary contains up to 270 ovules (Reyes-Agüero).

The fruit of *O. ficus-indica* is a simple fleshy berry formed by a lower ovary sunk into the stem tissue of the receptacle. The peel originates from the receptacle, and it has the same morphology as the cladode (Inglese et al., 2018). The pulp is formed from the outer growth of trichomes that originate in the epidermal cells, of the funicle and the funicular envelope (Pimienta-Barrios and Engleman, 1985).

The root system is superficial and fleshy, which is distributed horizontally. Root distribution depends on the type of soil and crop management (Snyman, 2005). Under favorable soil conditions a tap root develops, which penetrates the soil up to approximately 30 cm. In drought conditions, succulent roots derived from the taproot develop, which can absorb moisture from greater depths. However, in any type of soil, masses of absorbent roots are observed in the superficial layer, up to a maximum depth of 30 cm, these can extend from 4 to 8 m (North and Nobel, 1992; Inglese et al., 2018).



Figure 1. *Opuntia albicarpa* Scheinvar plant, 5 years old with fruits. San Martín de las Pirámides, State of Mexico. Source: self made.

Ecophysiology, MAC type metabolism

Opuntia species present a CAM type metabolism (Crassulaceae Acid Metabolism), where plants fix CO₂, mainly at night with the use of the enzyme PEP carboxylase (PEPC), but the product of the four-carbon reaction is stored in vacuoles; then, during the consecutive light period, CO₂ is assimilated into the chloroplasts by the C₃ cycle (Taiz and Zeiger, 2002; Larcher, 2003). CAM metabolism is an example of adaptation to environmental stress and occurs in plants from sites with periods of low water or CO₂ availability (Andrade et al., 2007). This type of metabolism is found in more than 33 plant families (Winter and Smith, 1996; Cushman, 2001), among which cacti stand out, for example: *Carnegiea gigantea* (Bronson et al., 2011), *Opuntia* spp. (Mallona et al., 2011; Niechayev et al., 2023), *Cereus validus* (Nobel et al., 1984), *Mammillaria gracilis* (Balén et al., 2012), among others.

Among the adaptive advantages of CAM plants, the following stand out: high efficiency in water use, better potential in net CO₂ absorption, resistance to drought, and high biomass production, among others (Niechayev, 2019).

Opuntia species have developed anatomical, morphological and physiological adaptations, to survive and grow in arid environments with severe water stress that limits the survival of other plant species (Beccaro et al., 2015). Some adaptations are: development of lateral absorbing roots in a few hours in response to moisture availability (North et al., 1993; Dubrovsky et al., 1998), epidermis formed by a layer of epidermal cells and 6-7 layers of hypodermal cells, with thick primary walls (Inglese et al., 2018); cuticle that prevents the escape of water vapor, repels surface water and reflects solar radiation (Gibson and Nobel, 1986); surface in the form of an irregular plate that, by

absorbing water, increases the volume of the stem, without causing damage to the epidermis or hypodermis (Mauseth, 2000). The glochidia may have the function of condensing water from the air (Buxbaum, 1950). The thorns help reduce the temperature of the stem during the day, and their presence reduces the interception of light by the cladode, and the presence of mucilage that has the function of retaining water within the plant (Inglese et al., 2018).

Main uses

Fruit consumption

Most *Opuntia* species produce sweet-tasting fruits (prickly pears), and the rest produce sour-tasting fruits, which are known as xoconostles (Monroy-Gutiérrez et al., 2017). One of the main uses of *Opuntia* species is the consumption of fresh fruit. World prickly pear production is estimated at 500,000 tons, where Mexico contributes 80%, Italy 12.2% and South Africa with 3.7% (Inglese et al., 2018). According to data from the Agri-Food and Fisheries Information Service (SIAP), Mexico in 2022 recorded a harvested area of 43,547.78 hectares and a production of 444,080.55 tons of prickly pear (Figure 2), where the State of Mexico is positioned with the largest area (15,817.6 hectares) and their production of 154,978.09 tons, equivalent to 35% of national production.

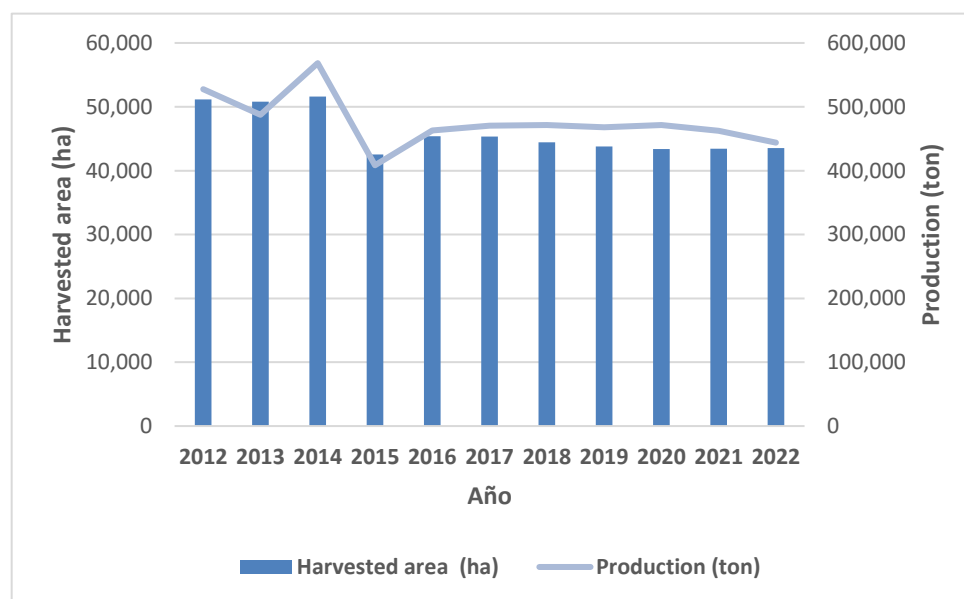


Figure 2. Harvested area and prickly pear production in Mexico for the period 2012-2022, including the xoconostle (Source: SIAP, 2023).

In prickly pear, the most cultivated species is *Opuntia ficus-indica*, whose fruit is juicy and has sweet pulp; there are varieties with greenish-white, yellow, orange, red or purple fruit (Inglese et al., 2018). The nutritional components of prickly pear are sugars, fiber, mucilage, pectins, proteins, amino acids, vitamins and minerals (Tesoriere et al., 2005). It presents bioactive compounds such as betalains (Azeredo, 2009; Fernández López et

al., 2010), vitamin C, carotenoids and dietary fiber (Morales et al., 2009; Sáenz et al., 2012); In addition, the pulp is rich in minerals such as calcium and magnesium (Stintzing et al., 2001).

Among the xoconostle-producing species are *O. oligacantha*, *O. joconostle* (Figure 3), *O. duranguensis*, *O. eliasenveriana*, *O. matudae*, *O. tezontepecana* (Pinedo-Espinoza et al., 2014). The xoconostle fruit contains soluble fiber, carbohydrates, vitamin C, phenolic compounds, flavonoids, tocopherols, betacyanins, betaxanthins, proteins and minerals (Guzmán-Maldonado et al., 2010; Morales et al., 2012; Monroy-Gutiérrez et al., 2017; Flores-Morales et al., 2021). *Opuntia matudae* is being established as a crop in central Mexico, after having been considered a wild species (Gallegos-Vázquez and Mondragón-Jacobo, 2011).



Figure 3. *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber plant, 5 years old with fruits. San Martín de las Pirámides, State of Mexico. Source: self made.

Cladode consumption

Gastronomic use

In Mexican gastronomy, the consumption of cactus cladodes is present throughout the national territory. There are various dishes based on “nopalitos”, these are based on “tender” nopal cladodes from which the thorns have been removed. Its consumption provides functional components, such as chlorophyll derivatives, amino acids and flavonoids; as well as dietary fiber and minerals (Stintzing and Carle, 2005). For 2022 in Mexico, a production of 852,384.2 tons was recorded, with the state of Morelos being the largest producer with 406,608.7 tons and an area of 4,219 hectares (SIAP, 2023).

Forage use

Opuntia is used as forage in countries such as Mexico, Brazil, South Africa and Tunisia (Inglese et al., 2018). Cladodes and fruit residues are an effective feed for ruminants such as cattle and sheep (Ben Salem and Abidi, 2009). Among the species used for forage in Mexico are *O. robusta*, *O. imbricata*, *O. cantabrigiensis*, *O. rastrera*, *O. lindheimeri*, *O. phaeacantha*, *O. streptacantha*, *O. leucotricha*, *O. ficus-indica*, *O. undulata*, *O. amychlaea*, *O. tomentosa* and *O. cochenillifera* (Flores and Aguirre, 1979; Ramírez-Tobías et al., 2007; Anaya-Pérez and Bautista-Zane 2008; Torres-Ponce et al., 2015). *Opuntia* plays an important role in meeting forage demand in semi-arid regions (Reyes-Agüero et al., 2005b; Felker et al., 2006). In addition, it is highly efficient in converting water into a dry matter (Nobel, 1995); in *O. ficus-indica*, productivity of up to 50 tons/ha/year of dry matter has been reported (Nobel et al., 1992) and in *O. amychlaea* of 45 tons/ha/year of dry matter under low irrigation conditions. (Nobel, 2001).

Nopal cladodes are rich in water, sugars, ash, calcium, potassium and vitamins A and C; however, are deficient in crude protein and fiber (Sawyer et al., 2001; Batista et al., 2003; Torres-Sales, 2010). It has been reported that a cladode water content is of 75 to 90% and 84 to 93% (Le Houerou, 1996; Torres-Ponce et al., 2015), so its consumption by livestock can provide a large part of the demand for water.

Cladodes are high in malic acid, which has been shown to reduce methane emissions (Mohammed et al., 2004; Newbold et al., 2005), so their integration into animal diets could reduce greenhouse gases (Inglese et al., 2018). Espino-García et al. (2020) found that a concentration of 4.5% of xoconostle dry matter in corn forage allowed reducing greenhouse gas emissions without reducing the digestibility of the feed by ruminants.

Due to the low crude protein content, options have been sought to supplement diets containing nopal (Inglese et al., 2018). Nopal combined with other ingredients (protein concentrates and forage) can be an excellent food for ruminant livestock in the arid regions (Torres-Sales, 2010). Hernandez et al. (2019) generated a nopal protein enrichment technology through aerobic fermentation of cladode fractions using *Saccharomyces cerevisiae* yeast (1%), Urea (1%) and Ammonium Sulfate (0.1%). They obtained optimal crude protein values (33.52%) for use as a complement in the animal diet.

Processed fruits and cladodes (agroindustrial use)

According to the SIAP, for 2022 prickly pear yields ranged between 1 and 22.2 tons/ha, while the yield of nopalitos was in a range between 1.2 and 146 tons/ha; Due to the above, alternatives have been generated in the agroindustrial processing of prickly pear and nopalitos to increase the value of the products obtained.

Xoconostles are used to make processed products such as jams, crystallized sweets, juices, homemade, soft drinks and wines (Filardo-Kerstupp & Peña-Ramirez, 2006); You

can also obtain flour, nectar, ate, syrup, ice cream, sauce and gummies (Scheinvar, 1999; Trejo-Trejo et al., 2019).

The prickly pear has been used to obtain various products such as jams, syrups, liqueurs, juices, sweets, vinegars, canned products and sauces (Sáenz et al., 2006; Corrales-García, 2011). Fruit bars have been made from dehydrated prickly pear pulp combined with apple or quince (Sepúlveda et al., 2003; Sáenz et al., 2006). Orozco et al. (2011) developed a jam using prickly pear pulp and peel, which had good characteristics of density, texture and fiber content. Likewise, dessert toppings (toppings) can be made from colored prickly pears (Morales et al., 2009).

With the “nopalitos” it is possible to make different preparations such as nopalitos in brine, pickled, sauces, pate (nopalitos puree with textured and flavored soy), cereals, sweets and liqueurs (Corrales and Flores, 2003; Corrales-García, 2011). The dehydrated cladodes are transformed into powder that can be used in the preparation of cookies, puddings, cereals, tortillas and food supplements such as capsules or tablets (Sáenz et al., 2010; Inglese et al., 2018).

Biotechnology applied to the species (Biotechnological uses)

Biopolymers

In recent years, experiments have been carried out with this type of plants, to formulate soft films that at a certain point can replace petroleum derivatives. Pascoe et al. (2019) developed a plastic film with good resistance characteristics, easy to process and biodegradable from dehydrated nopal cladodes. Ortiz & Arce (2016) formulated biopolymers from the cactus mucilage (*O. ficus-indica*) with a composition of 60% mucilage, 25% protein, 10% plasticizer and 5% natural wax, which exceeds resistance to the tension to other different edible films.

BioGas

A large number of plant species have been analyzed in order to be used for gas production. Ramírez-Arpide et al. (2018) carried out an experiment on the anaerobic codigestion of nopal cladodes and cow manure for the production of biogas, where they observed that the life cycle of the microorganisms through said biodigestion was energetically sustainable, since the energy return on investment was above the minimum recommended value (3.0).

In Mexico, there are companies that produce biogas based on cladodes and uses it for heating, fuel and electricity; In addition, the nitrogen-rich water left over from fermentation is used to irrigate the plantations, while the solid waste can be used as fertilizer or compost (Ciriminna et al., 2019). According to Tohá (1999), 3 kg of dry cladodes produce 1 m³ of biogas, which is equivalent to a yield of 10 kWh. Among the advantages of using biogas are fuel cost savings, fewer deforestation by reducing the use of wood as fuel, and savings on fertilizer costs (Inglese et al., 2018).

Dyes and cosmetics

Another important use that has been given to *Opuntia* species is the production of grana cochineal, mainly of the genus *Dactylopius*. This species is characterized by producing carminic acid; a chemical substance used as a high-quality red dye (Aguilera et al., 2005). This dye is mainly used for dyeing natural fibers, such as cotton, wool and vegetable fibers (Arroyo et al., 2014; González et al., 2015). In addition, carminic acid has been introduced as a base for various cosmetics. Arroyo et al. (2014) managed to develop a lipstick by staining the lacquer used, thus obtaining an intense carmine lipstick approved in accordance with market specifications. On the other hand, Martínez & Arroyo (2012) used the properties of carminic acid to make shampoo, generating one with characteristics such as pH, density, texture, similar to the standard one, but with a more intense red color.

Aguilera et al. (2005) produced grana cochineal in open-air cactus plants, under a green raffia canvas cover and under a clear plastic cover, obtaining a reduction in the biological cycle of the species, and a higher yield in cactus planted inside micro tunnels with clear plastic. Grana production in greenhouses has also been studied. Figueroa & Cázares (2003) planted nopales under a greenhouse and detected that the inverted hanging cladode system presented the highest production of the insect.

Medicine

Pimienta-Barrios et al. (2008) detected that the consumption of *O. joconostle* fruit peel can control serum glucose in individuals with type 2 diabetes mellitus, while in healthy people, it can help prevent states of hyperglycemia and alterations in the concentration of triglycerides and cholesterol. Other species such as *O. streptacantha* and *O. dillenii* have also been studied for their hypoglycemic effects (Torres-Ponce et al., 2015).

The red fruits of some *Opuntia* species are important sources of bioactive compounds, including ascorbic acid, carotenoids, taurine and flavonoids; its consumption can provide significant amounts of betacyanins, which are a potential colorant but are also an excellent source of antioxidant dietary compounds that can exert beneficial effects on health (Fernández-López et al., 2010). It has been found that xoconostle fruits have a greater antioxidant capacity than prickly pears; in addition, these fruits have a greater amount of antioxidants compared to other types of fruits such as tomato, orange and apple (Figueroa-Cares., 2010; Kaur 2012; Torres-Ponce et al., 2015; Monroy-Gutiérrez et al., 2017).

Due to the high-fiber content in the fruits of *Opuntia* species, it has been used with lipid-lowering effects by drying fruits and/or cladodes, and consuming it in the form of dietary fiber or flour. Studies have been carried out with people with dyslipidemia, overweight and/or obesity, finding that cholesterol and triglyceride levels are reduced with the consumption of cactus fiber (Muñoz et al., 2014; Torres-Ponce et al., 2015). *Opuntias* have also been studied in relation to their analgesic, anti-inflammatory, healing, diuretic, anti-uric, antiviral effects, among others (Arauza, 2008).

Electricity generation

Apollon et al. (2020) used four opuntia species for sustainable electricity generation using a plant-based biobattery design. A higher total electricity production of 285.12 J in four weeks and the best performance with an average power density of 103.6 mW m⁻³ was achieved in *O. albicarpa*. Furthermore, in the study the energy generation of 3.66 Wh m⁻² was achieved. The species *O. ficus-indica* and *O. albicarpa* showed significant height in the first two months (P value <0.05), which opens the way to the impact of electricity generation during plant growth.

Relevant research in Opuntia

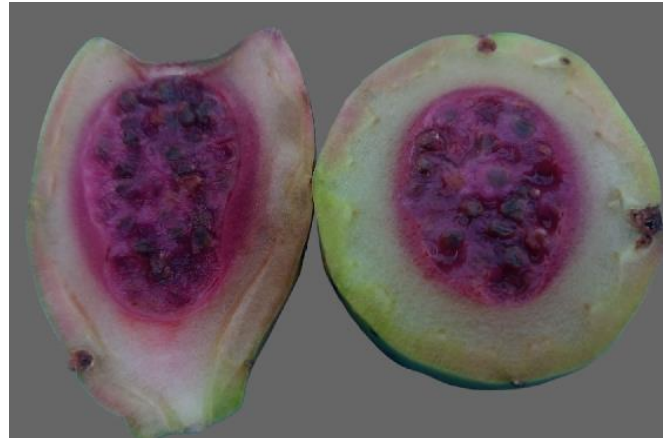
In order to know in detail the biology, physiology and genetics of the Opuntia genus, a large number of studies have been carried out; below, the main aspects studied of this type of plants are described.

Morphological variation of prickly pear and xoconostle

The prickly pear (Figure 4a) is a sweet fruit with hundreds of seeds, its peel is thin and its pulp is very juicy. The xoconostle (Figure 4b) is an acidic fruit, it has a thick shell and very little pulp, its maturation is slow and the fruit remains on the plant for a long time (CONABIO, 2023). Studies have been carried out to group accessions of prickly pear cactus and xoconostle using morphological traits. Reyes-Agüero et al. (2005b) analyzed 42 morphological attributes of 243 variants of Opuntia in the Southern Highlands of Mexico, identifying three groups: plants with large fruits and spineless cladodes, plants with large fruits and cladodes with prominent spines, and less domesticated plants. Gallegos-Vazquez et al. (2011) evaluated 29 varieties of prickly pear cactus and 4 varieties of xoconostle using 24 quantitative characters of cladodes, flowers and fruits; where they differentiated three groups: varieties of xoconostle, nine varieties producing nopalitos and nopales, and 16 varieties with yellow and green fruits. De Luna-Valadez et al. (2019) identified six groups of xoconostles based on the morphometry of the cladodes, flowers and fruit in 36 cultivars in Zacatecas.



a



b

Figure 4a. Cross section of prickly pear fruit (*O. albicarpa* Scheinvar) **Figure 4b.** Cross and longitudinal section of xoconostle fruit (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber).

Source: self made.

Genetic improvement

Inglese et al. (2018) indicated that nopal genetic improvement programs have been developed in Mexico, Brazil, Italy and the USA. In Italy, hybridization and embryo culture have been developed, generating 12 prickly pear selections suitable for the Mediterranean. In Brazil, it focuses on the development of improved varieties of nopal for forage. In the United States, germplasm is evaluated looking for adaptation to arid soils, high levels of salinity, selenium and boron.

In Mexico, Gallegos-Vázquez and Mondragon-Jacobo (2011) reported 3 improved varieties in terms of fruit quality. Several researches has been carried out to obtain parthenocarpic fruits: Ortiz et al. (1991) obtained greater parthenocarpic growth in prickly pear applying gibberellic acid and auxins; Muratalla-Lúa et al. (2002) managed to obtain seedless fruits; Varela-Delgadillo et al. (2018) induced the formation of parthenocarpic fruits in *O. albicarpa* Scheinvar, *O. megacantha* Salm-Dick and *O. ficus-indica* L. with the emasculation of flowers in pre-anthesis and the application of 50, 100 and 200 ppm of acid gibberellic (AG3); Livera-Muñoz et al. (2023) induced parthenocarpy in fruits of the 'MX CP-30 Rojo' and 'MX CP-40 Amarillo' genotypes by applying a solution of growth regulators (gibberellic acid, benzyl adenine and indole butyric acid).

Ploidy and Genome

Chromosomal studies carried out in *Opuntia* species, and they coincide in the basic number of chromosomes ($x=11$); and the polyploidy level ranges from $2n=2x=22$ (diploid) to $2n=8x=88$ (octaploid) (Grant, 1982; Omar et al., 2021). Segura et al. (2007) using flow cytometry identified four levels of ploidy: diploid, tetraploid, hexaploid and octaploids in 23 species of *Opuntia*.

Polyploidy is favored by hybridization (Inglese et al., 2018), generating more resistant and aggressive species than diploids (Pinkava, 2002). In *Opuntia*, there are a large number of polyploids, which contributes to great morphological variability, the existence of numerous different species and the variation within each population of the same species (Scheinvar et al., 2015). Hybridization is common in cultivated plants, which is why in *O. ficus-indica* they have identified high levels of ploidy in cultivars compared to wild plants (Mondragón-Jacobo and Bordelon, 1996). The above was demonstrated by Caruso et al. (2010), who analyzed 62 *Opuntia* genotypes with SSR markers, identifying that the number of peaks generated by each SSR is related to the known ploidy level of the taxa; the lowest number of amplicons were produced from the diploid species *O. Cochenillifera* and *O. quimilo* and the highest number of amplicons was obtained from the octaploid cultivated varieties. The ploidy level of *Opuntia* spp., depends on the origin of the population; species growing in different regions from those of origin, have lower genetic diversity (Omar et al., 2021). According to Palomino et al. (2016), the presence of endopolyploidy and polyploidy in *Opuntia* provides adaptive advantages in arid and semi-arid environments.

Genetic-molecular markers

The use of genetic-molecular markers in *Opuntia* has various applications: it allows a more precise estimate of the genetic diversity among existing accessions (Escalante-González et al., 2012), it increases the efficiency of improvement by allowing individuals to be selected in the juvenile stage (Mondragón-Jacobo, 2003), can be used for evolutionary history studies (Griffith, 2004), to show the hybrid origin of *Opuntia* species (Griffith & Porter, 2009; Caruso et al., 2010), to distinguish individuals of the same species (genetic fingerprinting) (Hensen et al.,) and conservation planning (Hensen et al., 2009).

Among the genetic-molecular markers used in *Opuntia*, the following stand out: Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD), Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR), Simple Sequence Repeat (SSR), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), nuclear microsatellites (SSRn), markers ITS and total proteins. Some examples of these studies were reported by: Luna-Paez et al. (2007) characterized 22 varieties of cactus with RAPD and ISSR markers using seed DNA and separated in polyacrylamide gels. Griffiths (2004) analyzed the evolutionary history of *O. ficus-indica* by means of Bayesian phylogenetic analysis of nrITS (nuclear ribosomal ITS) DNA sequences. Hensen et al. (2009) used six highly polymorphic ISSRs and two (EST)-SSRs loci in obtaining genetic fingerprints of 62 genotypes of Mexican, Israeli and Sicilian origin. Caruso et al. (2010) used microsatellites to conclude that *O. ficus-indica* is a group of multiple unrelated clones derived from different parental species and selected for common agronomic characteristics. Escalante-González et al. (2012) used RAPD-type molecular markers to estimate the genetic diversity of 15 nopal accessions in Nuevo León, Mexico. Valadez-Moctezuma et al. (2015) analyzed 52 *Opuntia* cultivars with agronomic and economic importance, classified into 12 different species using RAPD and ISSR markers. Espinoza-Sanchez et al. (2014) analyzed 85 representative *Opuntia* genotypes (wild and cultivated) using AFLP genetic-molecular markers. Samah et al. (2015a) used 13 SSR markers and

88 opuntia accessions to explore the genetic relationships between them, the markers generated unique prints for each species, which confirms their usefulness in the analysis of the genetic diversity of opuntia. Samah et al. (2015b) studied variation among 102 mexican opuntia accessions using total seed proteins and seed storage proteins. García-Zambrano et al. (2018) used AFLP to molecularly differentiate 36 xoconostle accessions, obtaining an average diversity index (ID) of 0.8124, as well as differences between xoconostle accessions, presenting a high degree of similarity. Reis et al. (2018) used SSRn markers on a set of 19 *Opuntia* spp portuguese accessions to assess genetic diversity.

Genomic, transcriptomic, metagenomics resources

The characterization and evolution of the available gene pool are essential for genetic improvement programs for cactus pear (Inglese et al., 2018). For this reason, some specific genes have been identified: Collazo-Siqués et al. (2003) cloned and characterized ACC synthase-1 and ACC oxidase-1 genes in the *Opuntia* genome, where ACCS-1 showed enhanced expression in ripening fruit tissues and ACCO-1 is highly induced in ripening tissues.

Mallona et al. (2011) sequenced cDNA from different organs and developmental stages of *Opuntia ficus-indica* where they identified genes involved in circadian regulation and CAM metabolism. They also reported that the SAND protein gene (SAND) and the beta tubulin 6 genes (TUB) were appropriate for the quantification of gene expression in this species. They found three types of expression profiles: PEP carboxylase kinase (PPCK) oscillated with a periodicity of 24 h; NADP malic enzyme (NADP-ME) and pyruvate phosphate dikinase (PPDK) were adapted to 12-h cycles; and phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and malate dehydrogenase (MDH) were arrhythmic.

Valadez-Moctezuma et al. (2023) through transcriptomic analysis, obtained a total of 8383, 7890 and 5300 transcripts for the de novo assembly of RNA from young cladodes and developing fruits of *O. ficus-indica*, *O. robusta* and *O. joconostle*, respectively; differentially expressed transcripts (DET) between cladode and fruit resulted in the significant enrichment of 13 KEGG pathways (networks of molecular interactions within cells) and 80 GO terms (gene ontology of gene functions), where genes such as FULL, CYP75B1 and CMB1 were upregulated in the fruits of all three species.

Likewise, the sequencing of the genome of *Opuntia* organelles can be used for evolutionary studies, molecular improvement and development of molecular markers. Köhler et al. (2020) assembled the chloroplast genome of *Opuntia chemilo* and detected a length of 150,374 bp, a GC content of 33–39.6%, and 130 genes (87 protein-coding, 35 tRNA, and 8 rRNA). Chen et al. (2022) assembled the chloroplast genome of *Opuntia sulphurea*, which has a length of 122,740 bp, 100 genes, (65 encoding proteins, 31 tRNA and rRNA genes) and a GC content of 35.39%. Liu et al. (2024) sequenced the total DNA of *O. cochenillifera* and assembled the mitochondrial genome, which has a length of 1,156,235 bp, a GC content of 43.06%, 54 protein-coding genes, and 346 simple repeats;

Furthermore, they detected 47,935 bp segments homologous to the chloroplast genome (35% of the total length of the chloroplast genome).

Recently, metagenomic studies have been carried out in *Opuntia* species. Fonseca-García et al. (2018) through metagenomic analyzes in the rhizosphere and phyllosphere of CAM plants including *O. robusta*, detected a great diversity of microorganisms, which may be required for the fitness and survival of plants in arid environments. Karray et al. (2020), in *O. ficus-indica* detected that the microbiomes of bacterial and archaeal cacti changed in the rhizosphere and endosphere as a function of the aridity gradient. Lyra et al. (2021) in *O. ficus-indica* also found that the structure and diversity of the bacterial community are different in arid areas and are influenced by environmental and soil conditions.

PERSPECTIVES

There are possibilities for improvement and development in *Opuntia* genus, among which are: integrating molecular, morphological and biogeographic data to better understand its diversity (Chessa, 2010); carry out promotion and marketing campaigns at a local and international level to increase consumption (Caplan, 1990); carry out adequate management of the orchards to increase the productivity and quality of the fruit (Ochoa, 2003); conduct research to reduce seed content and removal of glochids (spines); promote human consumption of cladodes; exploit multifunctional properties such as medicinal, nutraceutical and cosmetic; greater use of nopal for forage in arid and semi-arid areas; and increase plantations to reduce the accumulation of CO₂ in the atmosphere and thus the greenhouse effect (Inglese et al., 2018).

Aruwa et al. (2018) by reviewing the phytochemical composition of the different plant parts of *Opuntia* species, applications and valorization of *Opuntia* by-products; They conclude that *Opuntia* will continue to be an endless source of products with functions for the food industry and other industries; Furthermore, it can contribute to global food and subsistence security, as well as the health sector. Inglese et al., (2018) indicates that more studies are required to find new active compounds and their industrial and pharmaceutical applications.

Due to the considerable importance and the great diversity of uses that *Opuntias* have, these plants can be used as a basis for new research to develop new products or improve existing ones. Using transcriptomic, genomic, proteomic and metabolomic data, it is possible to obtain gene expression profiles, know the metabolic activity in different organs of the plant, identify important secondary metabolites, isolate genes to obtain compounds such as pectins or flavonoids synthetically, in addition to do genetic improvement and gene editing of species of commercial interest.

ETHICS STATEMENT

Not applicable.

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

AVAILABILITY OF SUPPORTING DATA

Not applicable.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

FUNDING

This research project was funded by the General Directorate of Research and Postgraduate Studies of the Chapingo Autonomous University, project no PRJNA803369.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The following statements should be used “conceptualization, Valadez-Moctezuma and Corral-Martínez; methodology, Valadez-Moctezuma; validation Valadez-Moctezuma; investigation, Corral-Martínez, Tornos-Olmedo; writing—original draft preparation, Corral-Martínez, Tornos-Olmedo; writing—review and editing, Corral-Martínez, Tornos-Olmedo; supervision, Valadez-Moctezuma; funding acquisition, Valadez-Moctezuma”.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the the National Council of Humanities, Science and Technology of Mexico and Chapingo Autonomous University for their support.

REFERENCES

- Aguilera, C.; Cázares, C. L.; Soto-Hernández, M. & Márquez, L. 2005. Producción de grana-cochinilla (*Dactylopius coccus* costa) en plantas de nopal a la intemperie y en microtúneles. *Agrociencia*, 39(2), 161-171.
- 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.
- Anaya-Pérez, M.A. 2001. History of the use of *Opuntia* as forage in México. In: Mondragón-Jacobo, C.; Pérez González, S. (Eds.) *Cactus (Opuntia spp.) as forage*. FAO Plant Production and Protection Paper No. 169. Roma, Italia. 5-12 pp.
- Anaya-Pérez, M.A. & Bautista-Zane, R. 2008. El nopal forrajero en México: del siglo XVI al siglo XX. *Agricultura, sociedad y desarrollo*, 5(2), 167-183.
- Anderson, E.F. 2001. *The Cactus Family*. Timber Press. Portland, Oregon, USA. 776 p.

- Aparicio-Fernández, X.; Loza-Cornejo, S.; Torres-Bernal, M.; Velázquez-Placencia, N. & Arreola-Nava, H. 2017). Physicochemical characteristics of fruits from wild *Opuntia* species from two semiarid regions of Jalisco, Mexico. *Polibotánica*, 0(43).
- Apollon, W.; Kamaraj, S.K.; Silos-Espino, H.; Perales-Segovia, C.; Valera-Montero, L.L.; Maldonado-Ruelas, V.A.; ... & Gómez-Leyva, J.F. 2020. Impact of *Opuntia* species plant bio-battery in a semi-arid environment: demonstration of their applications. *Applied Energy*, 279.
- Arauz, J.C.G. 2008. Efectos biofuncionales del Nopal y la Tuna. *Horticultura internacional*, 71, 18-19.
- Arroyo, G.C.; Herrera, C.M.; Vargas, L.S. & Pérez, A. 2014. Aplicación de la grana cochinilla en las áreas: Textily cosméticos. *Ciencias Agropecuarias*, 51-60.
- Aruwa, C.E.; Amoo, S.O. & Kudanga, T. 2018. *Opuntia* (Cactaceae) plant compounds, biological activities and prospects – A comprehensive review. *Food Research International*, 112, 328–344.
- Azeredo, H.M.C. 2009. Betalains: properties, sources, applications, and stability – a review. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 44: 2365–2376.
- Batista, A.M.V.; Mustafa, A.F.; Santos, G.R.A.; De Carvalho, F.F.R.; Dubeux, J.C.B.; Lira, M.A. & Barbosa, S.B.P. 2003. Chemical composition and ruminal dry matter and crude protein degradability of spineless cactus. *J. Agron. Crop Sci.*, 189: 123–126.
- Beccaro, G.L.; Bonvegna, L.; Donno, D.; Mellano, M.G.; Cerutti, A.K.; Nieddu, G.; Chessa, I. & Bounous, G. 2015. *Opuntia* spp. Biodiversity conservation and utilization on the Cape Verde Islands. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 62(1): 21–33.
- Ben Salem, H. & Abidi, S. 2009. Recent advances on the potential use of *Opuntia* spp. in livestock feeding. *Acta Hort.*, 811: 317 – 326.
- Bravo Hollis, H. & Sánchez Mejorada, H. 1991. Las cactáceas de México. Vol. 3. Mexico D.F., National Autonomous University of Mexico.
- Boke, N.H. 1944. Histogenesis of the leaf and areole in *Opuntia cylindrica*. *Am. J. Bot.*, 31: 299–316.
- Bronson D.R.; English N.B.; Dettman D.L.; Williams D.G. 2011. Seasonal photosynthetic gas exchange and water-use efficiency in a constitutive CAM plant, the giant saguaro cactus (*Carnegiea gigantea*). *Oecologia* 167: 861–871
- Buxbaum, F. 1950. Morphology of cacti. Pasadena, CA, USA, Abbey Garden Press.
- Caplan, K. 1990. Marketing strategies for cactus pear and cactus pear leaves for 1990's. In P. Felker, ed. Proceedings of the First Annual Texas Prickly Pear Council, Texas A&M University, Kingsville, Texas, USA.
- Caruso, M.; Currò, S.; Las Casas, G.; La Malfa, S.; Gentile, A. 2010. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *O. ficus-indica* cultivated genotypes and their relation with related species. *Plant Syst Evol* 290:85–97.
- Casas, A. & Barbera, G. 2002. Mesoamerican domestication and diffusion. In P.S. Nobel, ed. Cacti: Biology and uses, pp.143–162. Berkeley, CA, USA, University of California Press.
- Chen, J.; Zhang, S.; Tang, W.; Du, X.; Yuan, Y. & Wu, S. 2022. The complete chloroplast genome sequence of *Opuntia sulphurea* (Cactaceae). *Mitochondrial DNA Part B*, 7(2), 361-362.

- Chessa, I. 2010. Cactus pear genetic resources conservation, evaluation and uses. *Cactusnet Newsletter*, 12 [Special issue]: 45–53.
- Ciriminna, R.; Chavarría-Hernández, N.; Rodríguez-Hernández, A. I. & Pagliaro, M. 2019. Toward unfolding the bioeconomy of nopal (*Opuntia* spp.). *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 13(6), 1417-1427.
- Collazo-Siques P.; Valverde M.E.; Paredes-López O.; Guevara-Lara F. 2003. Expression of ripening-related genes in prickly pear (*Opuntia* sp.) fruits. *Plant Foods Hum Nutr* 58:317–326
- Colunga García, M.P.; Hernández Xolocotzi, E. & Castillo, A. 1986. Variación morfológica, manejo agrícola y grados de domesticación de *Opuntia* spp. en El Bajío guanajuatense. *Agrociencia*, 65: 7–49.
- CONABIO. 2023. Nopales. Diversidad natural y cultural. Consulted: April 03, 2024. Source: <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/nopales>
- Corrales, G.J. & Flores, V.C. 2003. Nopalitos y tunas: producción, comercialización, poscosecha e industrialización. Universidad Autónoma de Chapingo, CIESTAAM Programa nopal. pp: 39–96.
- Corrales-García, J. 2011. Perspectivas agroindustriales de la poscosecha de nopalito y la tuna. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 5-2011.
- Cushman, J.C. 2001. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiol* 127: 1439–1448
- Donkin, R.A. 1977. Spanish red: An ethnographic study of cochineal and the *Opuntia* cactus. *Trans. Am. Philos. Soc.*, 67(5): 1–77.
- Dubrovsky, J.G.; North, G.B. & Nobel, P.S. 1998. Root growth, developmental changes in the apex, and hydraulic conductivity for *Opuntia ficus-indica* during drought. *New Phytol.*, 138: 75–82.
- Escalante-González, J.G.; García-Zambrano, E.A.; Gutiérrez-Diez, A.; Vázquez-Alvarado, R.E.; Torres-Castillo, J.A.; Sinagawa-García, S.R.; ... & García-Zambrano, J.I. 2012. Incremento de la diversidad genética del banco de germoplasma de Nopal usando marcadores moleculares tipo RAPD. *Phyton* (Buenos Aires), 81(2), 143-148.
- Espino-García, J.J.; Campos-Montiel, R.G.; González-Lemus, U.; Torres-Cardona, M.; Sánchez-Santillán, P. & Almaraz-Buendía, J. J. G. 2020. In vitro fermentation of maize stover mixed with xoconostle (*Opuntia matudae* Sheinvar) and the effect on gas production. *Livestock research for rural development*, 32(2). Consulted: March 11, 2024. Source: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20203121006>
- Espinoza-Sánchez, E. A.; Silos Espino, H.; Flores Benitez, S.; Valera Montero, L. L.; Rodríguez Salazar, E.; Gallegos Vázquez, C. & Guzmán Maldonado, H. S. 2014. Agrupamiento de genotipos de nopal (*Opuntia* spp.) de México por medio de la técnica de AFLPs y características del fruto. *Phyton* (Buenos Aires), 83(2), 299-306.
- De Luna-Valadez, J. M.; Gallegos-Vázquez, C.; Valdez-Cepeda, R. D. & Scheinvar, L. 2016. Caracterización morfométrica de variantes silvestres de xoconostle (*Opuntia* spp.) de Zacatecas, México. *Agro Productividad*, 9(4).

- Felker, P.; Paterson, A.; Jenderek, M.M. 2006. Forage potential of *Opuntia* clones maintained by the USDA National Plant Germplasm System (NPGS) collection. *Crop Sci* 46:2161–2168
- Fernández-López, J. A.; Almela, L.; Obón, J. M. & Castellar, R. 2010. Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods for Human Nutrition*, 65, 253-259.
- Figueroa, M. R. & Cázares, C. L. 2003. Producción de grana cochinilla *Dactylopius coccus* (homoptera: dactylopiidae) en invernadero. *Agrociencia*, 37(2), 149-155.
- Figueroa-Cares, I.; Martínez-Damián, M.T.; Rodríguez-Pérez, E.; Colinas-León, M.T.; Valle-Guadarrama, S.; Ramírez-Ramírez, S.P. & Gallegos-Vázquez, C. 2010. Contenido de pigmentos, otros compuestos y capacidad antioxidante en 12 cultivares de tuna (*Opuntia* spp.) de México. *Agrociencia*, 44(7), 763-771.
- Filardo-Kerstupp, S. & Peña-Ramírez, M. J. 2006. Validación de una mermelada elaborada con Xoconostle (*Opuntia matudae* Scheinvar). Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). *Alfa Editores Técnicos*, 18-29.
- Flores-Morales, A.; Atriano-Hernández, L.M.; Sánchez-Contreras, Á. & González-Flores, T. 2021. Caracterización morfológica y bromatológica del fruto de xoconostle en diferentes estadios de maduración. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 8(2), 9-19.
- Flores V.C.A. y Aguirre R.J.R. 1979. El nopal como forraje. Universidad Autónoma Chapingo, México. 91 p.
- Fonseca-García, C.; Desgarenes, D.; Flores-Núñez, V.M. y Partida-Martínez, L.P. 2018. The microbiome of desert CAM plants: lessons from amplicon sequencing and metagenomics. In *Metagenomics* (pp. 231-254). Academic Press.
- Freeman, D.B. 1992. Prickly pear menace in eastern Australia 1880-1940. *Geographical review*, 413-429.
- Gallegos-Vázquez, C.; Barrientos-Priego, A. F.; Reyes-Agüero, J. A.; Núñez-Colín, C. A. & Mondragón-Jacobo, C. 2011. Clusters of commercial varieties of cactus pear and xoconostle using UPOV morphological traits. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 13, 10-22.
- Gallegos-Vázquez, C. & Mondragón-Jacobo, C. 2011. Cultivares selectos de tuna, de México al Mundo. Chapingo, Mexico, Autonomous University of Chapingo, SNICS-SAGARPA. 159 pp.
- García-Zambrano E.A.; Ojeda-Zacarías, M.C.; Gutiérrez-Soto, J.G.; Sinagawa-García, S.R.; Gutiérrez-Díez, A.; Martínez-De La Cerda, J. ... & García-Zambrano, J. I. 2018. Molecular differentiation of Xoconostle (*Opuntia* spp.) using AFLP molecular markers. *Phyton*, 87, 87.
- Gibson, A.C. & Nobel, P.S. 1986. The cactus primer. Cambridge, MA, USA, Harvard University Press.
- González, G.G.; Figueroa, G.A. & De Los Ángeles Barrón Hernández, M. 2015. Uso de la grana cochinilla en la elaboración de productos artesanales. *Jóvenes en la ciencia*, 1(2), 1-7. Consulted: March 09, 2024. Source: <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/2289>

- Granados-Sánchez, D. y Castañeda-Pérez, A.D. 2003. El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Editorial Trillas. México, D. F. 227 p.
- Grant, V. 1982. Natural pentaploids in the *Opuntia lindheimeri-phaecantha* group in central Texas *Bot. Gaz.* 140 (2): 208-215.
- Griffith, M.P. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *Am. J. Bot.*, 91(11): 1915–1921.
- Griffith, M.P. & Porter, M. 2009. Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). *Int. J. Plant Sci.*, 170(1): 107–116.
- Guevara-Figueroa, T.; Jiménez-Islas, H.; Reyes Escogido, M.; Mortensen, A.; Laursen, B.B.; Lin, L.W.; De León Rodríguez, A.; Fomsgaard, I.S. & Barba de la Rosa, A.P. 2010. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of comercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *J. Food Compos. Anal.*, 23: 525–532
- Guzmán-Maldonado, S.H.; Morales-Montelongo, A.L.; Mondragón-Jacobo, C.; Herrera-Hernández, G.; Guevara-Lara, F. & Reynoso-Camacho, R. 2010. Physicochemical, nutritional, and functional characterization of fruits xoconostle (*Opuntia matudae*) pears from Central-México Region. *Journal of Food Science*, 75(6), C485-C492.
- Helsen, P.; Verdyck, P.; Tye A. & Van Dongen, S. 2009. Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galapagos). *Plant Syst Evol.*, 279: 1–10.
- Hernández, A.F.; Rodríguez, F.J. M.; Herrera, C. M.; Herrera, G. G.; Arriaga, O. E.; Salazar, J. O., & Bautista, C. H. 2019. Semi-solid fermentation of nopal (*Opuntia* spp) for use as an animal protein supplement. *Revista de Geografía Agrícola*, (63), 87-100.
- Hoffmann, W. 1995. Ethnobotany. In G. Barbera, P. Inglese & E. Pimienta Barrios, eds. Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear, FAO Plant Production and Protection Paper No. 132. Rome, FAO. pp. 12–19.
- Hunt, D.; Taylor, N. & Charles, G. 2006. The New Cactus Lexicon. DH Books, Milborne Port
- Inglese, P.; Mondragon, C.; Nefzaoui, A.; Saenz, C.; Taguchi, M.; Makkar, H. & Louhaichi, M. 2018. Ecología del Cultivo, Manejo y Usos del Nopal; Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Rome, Italy. 229 p.
- Karray, F.; Gargouri, M.; Chebaane, A.; Mhiri, N.; Mliki, A. & Sayadi, S. 2020. Climatic aridity gradient modulates the diversity of the rhizosphere and endosphere bacterial microbiomes of *Opuntia ficus-indica*. *Frontiers in microbiology*, 11, 542192.
- Kaur, M.; Kaur, A. & Sharma, R. 2012. Pharmacological actions of *Opuntia ficus-indica*: A Review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(7), 15-18.
- Kiesling, R. 1999. Origen, domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 3: 50–59.
- Köhler, M.; Reginato, M.; Souza-Chies, T.T. and Majure, L.C. 2020 Insights Into Chloroplast Genome Evolution Across Opuntioideae (Cactaceae) Reveals Robust Yet Sometimes Conflicting Phylogenetic Topologies. *Front. Plant Sci.* 11:729.
- Larcher, W. 2003. Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. Springer, Berlín. 514 p.

- Le Houerou, H.N. 1996. The role of cacti (*Opuntia* spp.) in erosion control, land reclamation, rehabilitation and agricultural development in the Mediterranean Basin. *J. Arid Environ.*, 33: 135–159.
- Lyra, M.; Do Carmo, C.D.; Taketani, R.G.; Freitas, A.D.S.; Silva, C.E.E.; Mergulhão, A.C. ... & Giachetto, P.F. 2021. Structure and diversity of bacterial community in semiarid soils cultivated with prickly-pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 93.
- Livera-Muñoz, M.; Muratalla-Lúa, A.; Flores-Almaraz, R.; Ortiz-Hernández, Y.D.; González-Hernández, V.A.; Castillo-González, F.; Hernández-Ramírez, C.; Varela-Delgadillo, O.E.; López-Soto, M.; Valdez-Carrasco, J.M.; et al. 2023. Parthenocarpic Cactus Pears (*Opuntia* spp.) with Edible Sweet Peel and Long Shelf Life. *Horticulturae* 10, 39.
- Liu, J.; Feng, Y.; Chen, C.; Qi, Z. & Yan, X. 2024. Genomic insights into the clonal reproductive *Opuntia cochenillifera*: mitochondrial and chloroplast genomes of the cochineal cactus for enhanced understanding of structural dynamics and evolutionary implications. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1347945.
- Luna-Paez, A.; Valadez-Moctezuma, E.; Barrientos-Priego, A. F. & Gallegos-Vázquez, C. 2007. Characterization of *Opuntia* spp. by Means of Seed with RAPD and ISSR Markers and Its Possible Use for Differentiation. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 9, 43-59.
- Mallona, I.; Egea-Cortines, M. & Weiss, J. 2011. Conserved and divergent rhythms of crassulacean acid metabolism-related and core clock gene expression in the cactus *Opuntia ficus-indica*. *Plant physiology*, 156(4), 1978-1989.
- Martínez, B. I. & Arroyo, G. 2012. Aplicación del insecto grana cochinilla en productos cosméticos. Memoria de Veranos de la Investigación Científica UG, ISBN: 978-607-441-191-1. Consulted: February 18, 2024. Source: <http://www.academicos.ugto.mx/memoria/PDF/s204-26.PDF>
- Mauseth, J.D. 2000. Theoretical aspects of surface-to-volume ratios and water-storage capacities of succulent shoots. *Am. J. Bot.*, 88: 1107–1115.
- Mohammed, N.; Lila, Z.A.; Ajisaka, N.; Hara, K.; Mikuni, K.; Kanda, S. & Itabashi, H. 2004. Inhibition of ruminal microbial methane production by β -cyclodextrin iodopropane, malate and their combination in vitro. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 88: 188–195.
- Mondragón-Jacobo, C. & Bordelon, B.B. 1996. Cactus pear (*Opuntia* spp. Cactaceae) breeding for fruit production. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*, 1:19–35.
- Mondragón-Jacobo, C. 2003. Caracterización molecular mediante RAPDs de una colección de nopal de (*Opuntia* spp. Cactaceae) del centro de México, como base del mejoramiento genético. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 9(1), 97-114.
- Monroy-Gutiérrez, T.; Martínez-Damián, M.T.; Barrientos-Priego, A.F.; Gallegos-Vázquez, C.; Cruz-Alvarez, O. & Vargas-Madriz, H. 2017. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante en frutos de xocotuna, tuna y xoconostle (*Opuntia* spp.). *Chilean journal of agricultural & animal sciences*, 33(3), 263-272.
- Morales, M.; Sáenz, C. & Robert, P. 2009. Bioactives compounds in toppings from colored cactus pear cultivated in Chile. *Acta Hortic.*, 811: 127–130.

- Morales, P.; Ramírez-Moreno, E.; De Cortes Sanchez-Mata, M.; Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C. 2012. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* FAC Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Research International*, 46(1), 279-285.
- Muratalla-Lúa, A.; Livera-Muñoz, M.; González-Hernández, V.A. Tuna fresa sin semilla: Reseña de un nuevo concepto de calidad de fruto de nopal (*Opuntia ficus-indica*) hecho realidad. 2002. In Memorias del XIX Congreso Nacional de Fitogenética. Saltillo, Coahuila, México; Sociedad Mexicana de Fitogenética: Chapingo Estado de Mexico, Mexico. p. 259.
- Nefzaoui, A. & Salem, H. B. 2002. Forage, fodder, and animal nutrition. *Cacti: Biology and uses*, 199-210.
- Newbold, C.J.; Lopez, S.; Nelson, N.; Ouda, J.O.; Wallace, R.J. & Moss, A.R. 2005. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation in vitro. *Br. Food J.*, 94: 27–35.
- Niechayev, A.N.; Pereira, P.N. & Cushman, C.J. 2019. Understanding trait diversity associated with crassulacean acid metabolism (CAM), *Current Opinion in Plant Biology*, 49:74-85.
- Niechayev, N.A.; Mayer, J.A. & Cushman, J.C. 2023. Developmental dynamics of Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Opuntia ficus-indica*. *Annals of Botany*. 132(4), 869-879.
- Nyffeler, R. & Eggli, U. 2010. A Farewell to Dated Ideas and Concept Molecular Phylogenetics and a Revised Suprageneric Classification of the Family Cactaceae. *Schumannia* 6:109-149.
- Nobel, P. S.; Lüttge, U.; Heuer, S. & Ball, E. 1984. Influence of applied NaCl on crassulacean acid metabolism and ionic levels in a cactus, *Cereus validus*. *Plant physiology*, 75(3), 799-803.
- Nobel, P.S. 1995. Environmental biology. In G. Barbera, P. Inglese & E. Pimienta Barrios, eds. Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO Plant Production and Protection Paper No. 132. Rome, Italia, pp. 36–48.
- Nobel, P. S. 2001. Ecophysiology of *Opuntia ficus-indica*. In: Mondragon-Jacobo, C. and Pérez González, S. (Eds.) Cactus (*Opuntia* spp.) as forage. FAO plant production and protection Paper No. 169. Roma, Italia. pp 13-20.
- Nobel, P.; Cavelier, J. and Andrade, J.L. 1992. Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. *J. Exp. Bot.* 43:641-648.
- North, G.B. & Nobel, P.S. 1992. Drought-induced changes in hydraulic conductivity and structure in roots of *Ferocactus acanthodes* and *Opuntia ficus-indica*. *New Phytol.*, 120: 9–19.
- North, G.B.; Huang, B. & Nobel, P.S. 1993. Changes in structure and hydraulic conductivity for root junctions of desert succulents as soil water status varies. *Bot. Acta*, 106: 126–135.

- Mendez-Llorente F.; Ramírez-Lozano, R.G.; Aguilera-Soto, J.I. and Arechiga-Flores, C.F. 2008. Performance and nutrient digestion of lambs fed incremental levels of wild cactus (*Opuntia leucotrichia*). 2008. In: Conference on International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development University of Hohenheim. 7-9. Tropentag, Dinamarca 1-7 pp.
- Muñoz, L.F.M.; Díaz, Y.; González, C. M.; Medina, E.; Barrera, E. & Cardona, E. 2014. Efecto de la administración oral de nopal deshidratado sobre el perfil de lípidos en individuos con dislipidemia y sobrepeso/obesidad. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(1), 87-93.
- Ochoa, M.J. 2003. Cactus pear (*Opuntia* spp.) varieties: main characteristics in Republic Argentina. *Cactusnet Newsletter*. 31 pp.
- Omar, A.A.; ElSayed, A. I. & Mohamed, A. H. 2021. Genetic diversity and ecotypes of *Opuntia* spp. *Opuntia* spp.: Chemistry, Bioactivity and Industrial Applications, 181-199.
- Orozco, M.L.; Flores, J.J.; Soto, G.J.; & Ramírez, J. 2011. Formulación de una mermelada a partir de pulpa y cáscara de tunas (*Opuntia* spp.) elaborada a nivel planta piloto. *Acta Universitaria*, 21(2).
- Ortiz, S.P. & Arce, M.M. 2016. Producción y Caracterización de Películas de Biopolímero de Nopal *Opuntia ficus-indica* (L.). Research Gate GmbH. Vol. 15.
- Ortiz, H.Y.D.; Barrientos Pérez, F.; Colinas León, M.T. y Martínez, G.A. 1991. Ácido geberélico, auxinas y sus efectos sobre el fruto de nopal tunero. *Agrociencia Ser. Fitociencia*, 2:17–32.
- Palomino, G.; Martínez, J.; Méndez, I.; Muñoz-Urías, A.; Cepeda-Cornejo, V. & Pimienta-Barrios, E. 2016. Nuclear genome size, ploidy level and endopolyploidy pattern in six species of *Opuntia* (Cactaceae). *Caryologia*, 69(1), 82-89.
- Pascoe, O. S.; Martínez, C. M. & Echavarría, J. M. V. Formulación de una película plástica natural utilizando nopal verdura. Consulted: March 05, 2024. Source: https://biblioteca.univa.mx/Anuario/2014/2014_2_formulacion.pdf
- Pimienta-Barrios, E. & Engleman, E.M. 1985. Desarrollo de la pulpa y proporción, en volumen de los componentes del lóculo maduro en tuna (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller). *Agrociencia*, 62: 51–56.
- Pimienta-Barrios, E.; Méndez-Morán, L.; Ramírez-Hernández, B.C.; De Alba-García, J.E.G. & Domínguez-Arias, R.M. 2008. Effect of Xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) fruit consumption of glucose and seric lipids. *Agrociencia*, 42(6), 645-653.
- Pinedo-Espinoza, J.M.; Gallegos-Vázquez, C.; Trápala-Islas, A.; Franco-Bañuelos, A. & Hernández-Fuentes, A. 2014. Caracterización morfológica de 10 genotipos de nopales productores de Xoconostles (*Opuntia* spp.) de Hidalgo y Zacatecas México. *Revista Científica Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 2(2), 71-79.
- Pinkava, D.J. 2002. On the evolution of the continental North American Opuntioideae. En: Hunt D.R. y Taylor N.P. Eds. Studies in the Opuntioideae (Cactaceae). *Succulent Plant Research*. Vol. 6., pp. 59-98.
- Ramírez-Arpide, F.R.; Demirer, G.N.; Gallegos-Vázquez, C.; Hernández-Eugenio, G.; Santoyo-Cortés, V.H. & Espinosa-Solares, T. 2018. Life cycle assessment of

- biogas production through anaerobic co-digestion of nopal cladodes and dairy cow manure. *Journal of Cleaner Production*, 172, 2313-2322.
- Ramírez-Tobías, H.M.; Reyes-Agüero, J.A.; Pinos-Rodríguez, J.M. & Aguirre-Rivera, J.R. 2007. Efecto de la especie y madurez sobre el contenido de nutrientes de cladodios de nopal. *Agrociencia*, 41(6), 619-626.
- Reyes-Agüero, J.A.; Aguirre Rivera, J.R. & Hernández, H.M. 2005a. Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia*; 39: 395–408.
- Reyes-Agüero, J.A.; Aguirre Rivera, J.R. & Flores Flores, J.L. 2005b. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia*, 30(8), 476-484.
- Reyes-Agüero, J.A.; Aguirre-Rivera, J.R.; Carlin, C.F.; González, D.A. 2009. Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de *Opuntia* en la Altiplanicie Meridional de México. UASLP, SAGARPA, CONACYT, México. 350 p.
- Reis, C.M.; Raimundo, J. & Ribeiro, M.M. 2018. Assessment of genetic diversity in *Opuntia* spp. Portuguese populations using SSR molecular markers. *Agronomy*, 8(4), 55.
- Sáenz, C.; Berger, H.; Corrales García, J.; Galletti, L.; Garcia del Cortazar, V.; Higuera, I.; Mondragón, C.; Rodríguez Feliz, A.; Sepúlveda, E. & Varnero M.T., 2006. Utilización agroindustrial del nopal. FAO Plant Production and Protection Paper No. 162. Rome, FAO. 165 pp.
- Sáenz, C.; Sepúlveda, E.; Pak N. & Lecaros, M. 2010. Chemical and physical characterization of cactus cladodes (*Opuntia ficus-indica*) powder. *Ital. J. Food Sci.*, 22(4):416–422.
- Sáenz, C.; Yoong, M.; Figuerola, F.; Chiffelle, I. & Estévez, A.M. 2012. Cactus pear cladodes powders as dietary fibre source: purification and properties. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 63(3): 283–289.
- Samah, S.; De Teodoro Pardo, C. V.; Serrato Cruz, M. A. & Valadez-Moctezuma, E. 2015a. Genetic Diversity, Genotype Discrimination, and Population Structure of Mexican *Opuntia* sp., Determined by SSR Markers. *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 146-159.
- Samah, S.; Ventura-Zapata, E. & Valadez-Moctezuma, E. 2015b. Fractionation and electrophoretic patterns of seed protein of *Opuntia* genus. A preliminary survey as a tool for accession differentiation and taxonomy. *Biochemical Systematics and Ecology*, 58, 187-194.
- Sawyer, J.E.; Knox, L.A.; Donart, G.B. & Petersen, M.K. 2001. The nutritive quality of cholla cactus as affected by burning. *J. Range Manage.*, 54(3): 249–253.
- Scheinvar, L. 1999. Biosistemática de los xoconostles mexicanos y su potencial económico. En: Memoria del VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el conocimiento y aprovechamiento del nopal. San Luis Potosí. México. 255-274.
- 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.

- Segura, S.; Scheinvar, L.; Olalde, G.; Leblanc, O.; Filardo, S.; Muratalla, A.; Gallegos, C. & Flores, C.E. 2007. Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravoanae* Scheinvar and *Robustae* Britton et Rose. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54(5), 1033-1041.
- Sepúlveda, E.; Abraján, M. & Sáenz, C. 2003. Estudios preliminares de elaboración de láminas deshidratadas de ecotipos coloreados de tuna. En Memorias IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal, 2–6, Zacatecas, Mexico, pp. 278–281.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2023. Producción Agrícola. Consulted: March 12, 2024. Source: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Snyman, H.A. 2005. A case study on in situ rooting profiles and water-use efficiency of cactus pears, *Opuntia ficus-indica* and *O. robusta*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 7: 1–21.
- Stintzing, F.C. & Carle, R. 2005. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 175–194.
- Stuppy, W. 2002. Seed characters and the classification of the Opuntioideae. *Succ Plant Res*; 6:25-58.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2002. Plant Physiology. Sinauer Associates, Inc., Publishers, Sunderland, Massachusetts. 761 p.
- Tenorio-Escandón, P.; Ramírez-Hernández, A.; Flores, J.; Juan-Vicedo, J.; Martínez-Falcón, A.P. 2022. A Systematic Review on *Opuntia* (Cactaceae; Opuntioideae) Flower-Visiting Insects in the World with Emphasis on Mexico: Implications for Biodiversity Conservation. *Plants* 11, 131.
- Tesorieri, L.; Butera, D.; Allegra, M.; Fazzari, M. & Livrea, M.A. 2005. Distribution of betalain pigments in red blood cells after consumption of cactus pear fruits and increased resistance of the cells to ex vivo induced oxidative hemolysis in humans. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1266–1270.
- Tohá, J. 1999. La tuna como fuente de energía. *Rev. Bioplanet*. Santiago, Chile.
- Torres-Sales, A. 2010. Composición química del nopal y sus implicaciones en la nutrición de rumiantes (experiencias Brasil). *Revista salud pública y nutrición*, 5, 143-151.
- Torres-Ponce, R. L.; Morales-Corral, D.; De Lourdes Ballinas-Casarrubias, M. & Nevárez, G. V. 2015. El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6, (5) 1129–1142.
- Trejo-Trejo, E.; Trejo-Trejo, N.; Zúñiga-Morales, J.; Ocampo-Hernández, A. y Ramírez-González, M.C. 2019. Propiedades físicas y químicas del fruto de xoconostle (*Opuntia joconostle*) c.v. blanco y rosa. *Revista de Ingeniería y Tecnologías para el Desarrollo Sustentable*: 5 18 - 26
- Valadez-Moctezuma, E.; Samah, S. & Luna-Paez, A. 2015. Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant Syst. Evol.*, 301: 737–747.
- Valadez-Moctezuma, E.; Samah, S.; Mascorro-Gallardo, J.O.; Marbán-Mendoza, N.; Aranda-Osorio, G.; Flores-Girón, E.... & Rodríguez de la O, J.L. 2023. The first

- transcriptomic analyses of fruits and cladodes for comparison between three species of *Opuntia*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 70(3), 951-970.
- Varela-Delgadillo, Ó.E.; Livera-Muñoz, M.; Muratalla-Lúa, A. & Carrillo-Salazar, J.A. 2018. Inducción de partenocarpia en *Opuntia* spp. *Revista fitotecnica mexicana*, 41(1), 3-11.
- Vilà, M.; Burriel, J.A.; Pino, J.; Chamizo, J.; Llach, E.; Porterias, M. & Vives, M. 2003. Association between *Opuntia* species invasion and changes in land-cover in the Mediterranean region. *Global Change Biology*, 9(8), 1234-1239.
- Winter, K. & Smith, J.A.C. 1996 An introduction to Crassulacean acid metabolism. In Winter K, Smith JAC, eds, *Crassulacean Acid Metabolism*. Springer-Verlag, pp 1–10

Artículo enviado a la revista: Biological Agriculture & Horticulture

- IV. Artículo 2: Genetic changes detected during the development of *Opuntia albicarpa* fruits through transcriptomic analysis in the metabolism of carbohydrates and the biosynthesis of flavonoids.**

Genetic changes detected during the development of *Opuntia albicarpa* fruits through transcriptomic analysis in the metabolism of carbohydrates and the biosynthesis of flavonoids.

J.J. Corral-Martínez¹, S. Samah², E. Valadez-Moctezuma^{3*}, J.O. Mascorro-Gallardo³, J.L. Rodríguez de la O³ and J.J. López-Reynoso³

¹Programa del Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México, México.

²Biogenetix-Lab S. de R.L. de C.V. Ixtapaluca, Estado de México, México.

³Instituto de Horticultura, Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México, México.

*Correspondence author: E. Valadez-Moctezuma

E-mail: evaladezm@chapingo.mx

ABSTRACT

Opuntia albicarpa is an endemic species of Mexico with cultural and economic importance. The opuntia fruits, named prickly pear or tunas, are rich in glucose, fructose, and sucrose. The objective of this research was to contrast morphological changes in the development and ripening of the fruits, and detect genes involved through transcriptomics to identify important metabolic pathways. Total RNA from fruits of three developmental stages was sequenced in paired-end mode with Illumina technology. High-quality reads were assembled de novo and annotated against the Swissprot protein database, and differentially expressed genes between the three stages were determined. The de novo ensembled transcriptome was represented by 198,958 transcripts (41.95% GC content). A total of 22,460 and 39,683 sequences were annotated with Blastx and Blastp, respectively. In addition, 10,106 genes were identified from Blastx and 11,781 genes with Blastp. In the differential expression analysis for the comparison 60 days after flowering vs. the start of ripening, 1572 transcripts were upregulated and 412 downregulated, in 60 days after flowering vs. ripened fruit, there was an upregulation of 1265 transcripts and 454 downregulated, and at the start of ripening vs ripened fruit, 96 transcripts were upregulated and 745 downregulated. The pathways of carbohydrate metabolism and flavonoid biosynthesis during the development and ripening of fruits were analyzed to quantify the genes involved. The results can be used for genetic and molecular studies on the genus *Opuntia* and better understand its biology.

Key words: *O. albicarpa*; Transcriptomic; Development; Prickly pear; Carbohydrates; Flavonoids

INTRODUCTION

The genus *Opuntia* (nopal or prickly pear) is distributed in desert and semi-desert areas of the southern United States of America, Mexico, South America and different parts of the world (Granados-Sánchez and Castañeda-Pérez, 2003). The genus comprises between 150 and 180 recognized species (Majure et al., 2012). In Mexico, the fruits and stems of wild species, in the process of domestication and cultivated are consumed (López-Gutiérrez et al., 2015). Plants of the genus *Opuntia* serve as sources of fruits and vegetables for food, medicine, cosmetic purposes, fodder, and as a source of natural colorants. In addition, due to its great importance in the development of desert agriculture, in recent years, the beneficial potential for health of some of its bioactive compounds such as phenols, flavonoids and betalains has been reported (Mendez-Farroñan, 2017).

The taxonomy of *Opuntia* has been based on morphological characters; it was subsequently enriched with biochemical, physiological and cytogenetic descriptors (Valdez-Cepeda et al., 2003; Reyes-Agüero et al., 2009). Their characterization with molecular markers has made it possible to know more efficiently the existing phenetic and genetic diversity, support its best taxonomic location and contribute to improvement programs (Illoldi-Rangel et al., 2012). The molecular markers represent reliable tools for the characterization and differentiation of *Opuntia* varieties, since they are not influenced by the environment (Valadez-Moctezuma et al., 2015). But little has been studied about its transcriptome.

The white fruit (tuna), also called "tuna Blanca de Alfajayucan", "tuna Blanca San Martín" or "tuna Reyna" (*O. albicarpa* Scheinvar) presents a ovate fruit 6 to 9 cm long and 6 to 6.5 cm wide, externally greenish-whitish-yellowish and with a 5-7 mm wide shell (Scheinvar, 1999). Fruit growth lasts up to 132 days after flowering and the ripening

process begins at 99 days (Martín del Campo et al., 2019). Analysis of gene expression during fruit development can provide valuable clues about the biological functions of the corresponding genes (Chen et al., 2019). It is important to know the genetic dynamics involved in prickly pear fruit ripening to identify differentially expressed genes (DEG), KEGG pathways, and GO terms. In addition, with the differential expression of genes during the ripening process of fruits resolved with transcriptomics, metabolic pathways related to specific metabolic processes can be analyzed.

Transcriptomics is the study of transcriptome of an organism; that is, the total number of transcripts expressed at the time of sampling. The information content of an organism is recorded in the genes of its genome and expressed through transcription (Lowe et al., 2017). Transcriptomics is an essential area to interpret the functioning of the transcriptional process of genes, which depends on intra or extracellular stimuli that trigger signaling cascades in which genes are expressed or repressed (Sims et al., 2014). RNA-seq is a tool that allows to evaluate the transcriptional state of an organism, organ or tissue. It is typically used to compare different treatments, conditions, or stages of development in search of a specific response to the stress or stimulus received (Van Verk et al., 2013).

The objective of the present research was to identify the morphological and genetic changes that occur during the development of *O. albicarpa* fruits through transcriptomic analysis to know the changes in the genes differentially expressed in the metabolism of carbohydrates and the biosynthesis of flavonoids, as well as provide a comprehensive and accurate basis for molecular studies of opuntia fruit development.

MATERIAL AND METHODS

Sampling and measurement of fruit development

The sampling of *O. albicarpa* fruits was carried out from April to July 2021 in 5-year-old commercial orchards in the municipality of San Martín de las Pirámides, State of Mexico (19° 41' 59.9" N 98 ° 48' 31.6" W). Three plants with a good phenotype and free from damage caused by biotic or abiotic factors were selected. For RNA extraction, healthy fruits were recollected from three independent plants during five main stages of development (T1: flowering, T2: 30 days after flowering, T3: 60 days after flowering, T4: beginning of ripening and T5: ripe fruit, Figure 1). From each stage, three samples were considered; each sample consisted of three fruits from each plant. Subsequently, the fruits were washed with Merck brand Extran detergent and water to eliminate the detergent completely. With a scalpel, longitudinal cuts of the fruits were made, which were wrapped in aluminum foil and preserved in liquid nitrogen until processing.

Figure 1. Phenology of the development and maturation of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Scheinvar), DAA=Days after anthesis.

For the morphological evaluation, 25 fruits of each stage of development were selected, to which the total fresh weight of the shell and loculus; equatorial diameter, polar diameter and volume were measured. The fresh weights (g) were measured with a digital scale (Sartorius model PT1200, precision 0.01 g); the equatorial (cm) and polar (cm) diameters were measured by a vernier and the volume with a test tube. Analysis of variance (ANOVA) was performed with a completely randomized design where time was the source of variation, and Tukey's means comparison tests (0.05); these were done with the Excel plugin XLSTAT.

Obtaining and sequencing of RNA

Fruits from three stages of fruit development (T3, T4 and T5) were used to analyze the transcriptome. Three g of total fruit tissue was macerated in a sterile mortar using liquid nitrogen. Total RNA was extracted with the PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, USA) following the manufacturer's instructions. The RNA concentration of each sample was determined on a Nanodrop UVS-99 UVISDrop spectrophotometer. Libraries were synthesized with the TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit. They were sequenced on the NovaSeq6000 System (Illumina) in paired-end mode to obtain 101 bp reads.

Data filtering and de novo assembly

Quality control analysis of raw reads was performed with FastQC v0.72 (Andrews, n.d.) and MultiQC v1.9 (Ewels et al., 2016). Low quality (phred quality score < 30) and short (length < 60 bp) reads were removed using the Trimmomatic v0.38.0 program (Bolger, et al., 2014). As there is no reference genome for the genus's *Opuntia*, the assembly of the transcription sequences (de novo transcriptome) of the readings of the T3, T4 and T5 libraries was performed with Trinity v2.9.1., applying the default parameters and a contig length of 200 bp (Grabherr et al., 2011). A set of representative non-redundant sequences was obtained with CD-HIT-EST v1.3. (Fu et al., 2012) using a 98% similarity threshold to eliminate potential duplicate transcripts. The Busco v5.3.2 program (Simão et al., 2015) was used for the evaluation of the quality of the genome assembly, in this analysis the lineage Viridiplantae (green plants and terrestrial algae) was selected. This was analyzed on the Galaxy web platform (usegalaxy.org.au/; Afgan et al., 2018).

Functional Annotation

The TransDecoder v5.5.0 tool (Haas et al., 2013) was used to identify coding regions (with at least 100 amino acids) within the sequences of the transcripts; the input file was the representative assembly. The de novo assembly, and the peptide sequences (Transdecoder result) were aligned against the SwissProt database (56,7483 sequences) (The UniProt Consortium 2021) using Diamond Blastp and Diamond Blastx for an e-value $< 10^{-3}$. In addition, EggNOG v5.0 (Huerta-Cepas et al., 2019) (<http://eggno-mapper.embl.de/>), a tool that uses pre-calculated orthologous groups (OGs) and phylogenies from the EggNOG database, serves to transfer functional information from detailed data on orthologs; it was used to annotate the ensemble, in which GO term, Enzyme Commission (EC), KEGG-Ko (molecular functions represented in terms of functional orthologs), KEGG-pathway (collection of route maps that represent the knowledge of interaction, reaction and molecular relationship networks). The output of peptides from TransDecoder was used as input file and the parameters defaulted by the program.

Differential expression, gene orthology (GO) and KEEG analysis

Align Reads and Estimate Abundance v2.9.1 software was used to estimate the abundance of isoforms and genes. The abundance estimates from the samples were combined in a single file with the Build Expression tool Matrix v2.9.1 (Grabherr et al., 2011). To determine the differentially expressed genes between the three times of fruit maturation, the Limma V3.48.0 Program was used (Law et al., 2014). Three pairwise comparisons were evaluated: T3 vs T4, T3 vs T5 and T4 vs. T5. Differentially expressed transcripts (DET) with $|\log FC| > 2$ and with adjusted P-value < 0.01 were analyzed in

KOBAS-I (Bu et al., 2021) (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) to identify significantly enriched KEGG pathways and GO terms [$e\text{-value} \leq 0.0001$], using the *Arabidopsis thaliana* genome as a comparison database. DET were extracted and explored in the “Amino sugar and nucleotide sugar metabolism”, “Ascorbate and aldarate metabolism”, “Fructose and mannose metabolism”, “Starch and sucrose metabolism”, “Galactose metabolism” and “Flavonoid biosynthesis” pathways; as well as in the GO terms “Sucrose metabolic process”, “Glucose metabolic process”, “Carbohydrate metabolic process” and “Flavonoid biosynthetic process”. Heatmap plots were made with the Heatmap2 Version 3.1.1 tool in Galaxy web platform (usegalaxy.org; Afgan et al., 2018), to map the DET over the three fruit stages in the libraries using the Z transformation of the normalized TMM values.

RESULTS

Morphological changes during the development of the fruit

In the flowering stage (T1), the fruit presented a green color and its flowers, yellow petals and pink sepals, as well as an abundant number of spines. The loculus represented 28.19% of the total weight of the fruit, and the shell does not separate from the loculus. In the stage 30 days after flowering (T2), the fruit presented a green color, and the flower has completely detached. The weight of the loculus represented 22.83% of the total weight, and the shell has not yet separated from the loculus. In the stage 60 days after flowering (T3), the fruit was green; the weight of the loculus was 22.62% with respect to the full weight and from this stage the peel separates from the loculus. In the early stage of ripening (T4), the fruit had a green/yellow color; the loculus weight corresponded to 57.11% of the total weight. In the ripe fruit stage (T5), it presented a lemon color, and the

loculus weight represented 62.13% of the total weight. The ANOVA indicated that there were significant statistical differences in the morphological variables evaluated depending on the stage of development. The fruit registered a continuous increase in size, which in T5 reached a polar diameter of 7.30 cm, an equatorial diameter of 5.004 cm and a volume of 92.00 cm³. From stage T3, loculus weight increased rapidly, while shell weight decreased in T4 and increased again in T5 (Figure 2).

Figure 2. Changes in fresh weight of locule and peel during the development of *Opuntia albicarpa* Scheinvar fruits. Means with different letters are significantly different (Tukey, 0.05).

Data filtering and de novo assembly

A total of 704,150,890.00 raw paired-end reads with a length of 101 bp were obtained from fruits 60 days after flowering (T3), onset of ripening (T4) and ripe fruits (T5) of *O. albicarpa*. The number of reads ranged from 68,799,748 (library T3R1) to 87,957,182 (library T3R2). Raw sequence files were uploaded to the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) under BioProject accession numbers PRJNA803369 (SAMN25649427-35). After quality control (Phred score > 30), a total of 631,639,944 (89.67%) high-quality reads were survived, ranging from 61,328,136 (library T3R1) to 79,921,230 reads (library T5R5). The percentage of duplicate reads ranged from 66.10% (library T4R1) to 90.90% (library T3R3) with a mean of 82.27% (Table S1). The de novo transcriptome assembly of *O. albicarpa* produced 240,169 transcripts. Using CD-HIT-EST to remove duplicates and cluster representative sequences resulted in 198,958 transcripts. For representative sequences, the total GC content was 41.95%; the average transcript length was 1,003 bp; the N50 was 1,734 bp, and the transcript lengths ranged from 181 to 10,434 bp. The general alignment rate ranged between 87.26 (T5R3) and 98.32 (T3R3) with an average of 95.97%, which

indicates a good quality of the assembly. The Busco program revealed the presence of 97.6 % of the 425 orthologous genes (from 57 species) searched for in the viridiplantae dataset, of which 415 orthologous genes were complete (94 were single copies, and 321 were duplicates); 10 were fragmented and any missing orthologous genes were reported; this indicates a good quality of the assembly.

Functional Annotation

Prediction of coding regions using the Transdecoder program resulted in 116,693 PEPs and 398,706 ORFs. The Diamond-Blastx analysis generated 22,460 sequences, of which 21,842 that correspond to plants were identified; while with Blastp, 39,686 sequences were obtained, of which 38,587 correspond to plants. 20,846 transcripts were identified that were present in both Blastx and Blastp (Figure 3A). The most represented plant species in Blastp were: *Arabidopsis thaliana* (78.03%), *Oriza sativa* subsp. *Japonica* (4.70%), *Nicotiana tabacum* (1.44%), *Solanum lycopersicum* (1.23%), *Spinaca oleracea* (1.22%), *Oriza sativa* subsp *indica* (0.94%), *Glycine max* (0.79%), *Solanum tuberosum* (0.76%), *Pisum sativum* (0.66%), *Vitis vinifera* (0.59%), *Zea mays*, (0.49%), *Petunia hybrida* (0.46%), *Beta vulgaris* (0.29%) and *Ricinus communis* (0.27%). By eliminating isoforms, 10,106 and 11,781 genes were identified from Blastx and Blastp data (Figure 3B). In total, 12,565 genes were detected.

Figure 3. A) Venn diagram with the number of transcripts annotated with Diamond BlastX and BlastP against the UniProtKB/Swiss-Prot database. B) Venn diagram with the number of genes annotated with Diamond BlastX and BlastP.

Analysis performed in EggNOG-mapper indicated that 37,352 transcripts were associated with at least one GO term and 22,816 transcripts with at least one KEGG pathway. Overall, a total of 11,055 GO terms were identified (25.51% of the total 43,335

in the GO database). In addition, a total of 395 routes from the KEGG map (70.53% of the total 560 pathways in the KEGG database) and 3,978 KOs (15.60% of the total 25,503 in the KEGG Orthology database) were identified.

Differential Expression, Gene Orthology (GO) and KEGG Analysis of DET

Analysis of differentially expressed transcripts (DETs) with log absolute > 2 and adjusted P-value < 0.01 was performed using aligned reads from the de novo assembled transcriptome. A total of 2,059 DETs were identified between T3 and T4, with 1,636 upregulated and 423 downregulated transcripts. For the comparison of T3 vs. T5, 1,797 DETs were identified, with 1,317 transcripts significantly upregulated and 480 transcripts downregulated. Between T4 and T5, 841 DET were detected with 83 upregulated and 758 downregulated transcripts. The Figure 4 shows the number of DETs of each comparison, and those that share with each other, eight transcripts were identified that share the three comparisons made; these correspond to OP063301 (BOR4), OP109553 (ABR1), OP131956 (LOC101215231), OP134022 (TDT), OP151319 (TIFY9), OP151321 (TIFY9) and OP184469 (PMA4).

Figure 4. Differentially expressed transcripts in the comparisons of maturation times (T3vsT4, T3vsT5 and T4vsT5) of *Opuntia albicarpa* fruits.

Functional annotation was determined from DET using KOBAS enrichment of KEGG pathways and GO terms.

For the comparison between T3 and T4, 27 significantly enriched KEGG pathways were recovered (corrected P value < 0.01), seven of them classified as "Carbohydrate metabolism", the most enriched KEGG pathways are indicated in Table 1. In addition, 221 GO terms were significantly enriched (corrected P value < 0.01). These GO terms are placed in the category of "Biological Process" (BP, 118 GO terms), followed by

"Molecular Function" (MF, 67 GO terms) and "Cellular Component" (CC, 31 GO terms). The most enriched GO terms were for BP "response to wounding", "response to cold" and "lignin biosynthetic process"; for the MF category, the most was "protein binding"; and for the terms CC were the "plasma membrane", "cell wall", "cytosol", "secretory vesicle", "cytoplasm" and "plant-type cell wall".

Table 1. Top 10 KEGG enriched pathways for *Opuntia albicarpa* Scheinvar.

For the comparison of T3 vs. T5, 23 significantly enriched KEGG pathways were recovered (corrected P value < 0.01), six of them classified as "Carbohydrate metabolism", the most enriched KEGG pathways are indicated in Table 1. In addition, 193 GO terms were significantly enriched (corrected P value < 0.01). These GO terms are in "Biological Process" (BP, 100), followed by "Cellular Component" (CC, 37) and "Molecular Function" (MF, 55). The most enriched GO terms were for BP "response to cold" and "response to salt stress"; for the MF category, the most was "protein binding"; and for the terms CC were the "cell wall", "plasma membrane", "cytosol", "secretory vesicle", "plant-type cell wall", "chloroplast" and "extracellular region".

For the comparison between T4 and T5, 10 significantly enriched KEGG pathways (corrected P value < 0.01) were retrieved, most of them classified as "Metabolism-global and general maps", the most enriched KEGG pathways are shown in the Table 1. In addition, 100 GO terms were significantly enriched (corrected P value < 0.01). These GO terms are in the category of "Biological Process" (BP, 47 GO terms), followed by "Cellular Component" (CC, 18 GO terms) and "Molecular Function" (MF, 34 GO terms). The most enriched GO terms CC were "cell wall" and "plasma membrane"; and for the category BP the most enriched were "response to wounding", "response to cold", "jasmonic acid biosynthetic process", "protein phosphorylation" and "response to fungus".

KEGG pathways (Table S2) and GO terms (Table S3) were selected, which were significantly enriched and, which are important during prickly pear fruit development, such as pathways of carbohydrate metabolism, flavonoid biosynthesis, among others that are described below:

“Carbohydrate metabolism” pathways of the *O. albicarpa* transcriptome

Of the 15 carbohydrate metabolism pathways reported in the KEGG database, the comparison T3 vs. T4 represented 7 significantly enriched pathways (P value < 0.01): “Amino sugar and nucleotide sugar metabolism”, “Glycolysis / Gluconeogenesis”, “Glyoxylate and dicarboxylate metabolism”, “Galactose metabolism”, “Pyruvate metabolism”, “Pentose phosphate pathway” and “Ascorbate and aldarate metabolism”; the comparison T3 vs T5 represented six significantly enriched pathways: “Glycolysis/Gluconeogenesis”, “Glyoxylate and dicarboxylate metabolism”, “Pyruvate metabolism”, “Galactose metabolism”, “Amino sugar and nucleotide sugar metabolism” and “Starch and sucrose metabolism” ; while the comparison T4 vs T5 represented only the “Amino sugar and nucleotide sugar metabolism” pathway.

Figure 4 shows the heatmap representing the low expression, and over expression of genes involved in the " Starch and sucrose metabolism " pathway. On the left side of the Figure 5, there are groups representing genes with a similar expression pattern, and in the lower part of the heat map the development stages, and their repetitions are grouped. Genes that were under-expressed in T3 and T4 and over-expressed in T5 were located: BGLU12 (OP006394; EC 3.2.1.21), TPPA (OP039270; EC 3.1.3.12), TPS7 (OP128468; EC 2.4.1.15), At5g51830 (OP038818, EC 2.7.1.4), TPS5 (OP128465, EC 2.4.1.15), TPPG (OP039271, EC 3.1.3.12) y BAM3 (OP064455; EC 3.2.1.2). Another group of genes had a high expression in T3, and in T4 and T5, their expression tended to decrease: At1g50460

(OP035155; EC 2.7.1.1), ADG2 (OP060556; EC 2.7.7.27), PGMP (OP001310, OP001312; EC 5.4.2.2), WAXY (OP150334, OP150335, OP150339; EC 2.4.1.242), At1g64390 (OP179564, OP179569; EC 3.2.1.4), At1g11820 (OP050809; EC 3.2.1.39), TPS9 (OP037249; EC 2.4.1.15), SPS (OP193530; EC 2.4.1.14), BGLU44 (OP170752; EC 3.2.1.21), SS1 (OP085395; EC 2.4.1.21), SS (OP048062; EC 2.4.1.13), DPEP (OP169611; EC 2.4.1.25), TPS5 (OP178383; EC 2.4.1.15), At3g59480 (OP163884; EC 2.7.1.4) and INV*DC4 (OP028592; EC 3.2.1.26). In addition, genes that had a low expression in T3 and high expression in T4 and T5 were located. INV*DC4 (OP028593; EC 3.2.1.26) and BAM2 (OP120782; EC 3.2.1.2).

Figure 5. Heatmap of the most differentially expressed transcripts of the KEGG pathway "Starch and sucrose metabolism" of *Opuntia albicarpa* fruit development. The heatmap graph was constructed based on the Z-score of the reads from the nine libraries.

In the “Galactose metabolism” pathway (Figure S1) the genes detected were under-expressed in T3 and over-expressed in T4 and T5: PFK6 (OP085151; EC 2.7.1.11) AGAL3 (OP173410; EC 3.2.1.22), GALM (OP086472; EC 5.1.3.3) and INV*DC4 (OP028593; EC 3.2.1.26). Other genes presented high expression in T3 and low expression in T4 and T5: PGMP (OP001310, OP001312; EC 5.4.2.2), PFK3 (OP085149; EC 2.7.1.11), GOLS2 (OP101592, OP101593; EC 2.4.1.123), INV*DC4 (OP028592; EC 3.2.1.26), At1g50460 (OP035155; EC 2.7.1.1), AGAL1 (OP017428; EC 3.2.1.22) and RFS (OP087924; EC 2.4.1.82).

The “Fructose and mannose metabolism” pathway (Figure S2) presented genes that were in low expression in T3 and in high expression in T4 and T5: PFK6 (OP085151; EC 2.7.1.11), FBA3 (OP075106; EC 4.1.2.13), and XYLA (OP152586, OP027977; EC 5.3.1.5). Another group of genes were over-expressed in T3 and under-expressed in T4

and T5: FBA2 (OP064628, OP064630; EC 4.1.2.13), CFBP1 (OP089913; EC 3.1.3.11), PFK3 (OP085149; EC 2.7.1.11), TPI (OP132697; EC 5.3.1.1), and At3g59480 (OP163884; EC 2.7.1.4); and two genes presented high expression in T3, low expression in T4 and high expression in T5: At5g51830 (OP038818; EC 2.7.1.4) and At1g50460 (OP035155; EC 2.7.1.1).

"Flavonoid biosynthesis" pathway of the *O. albicarpa* transcriptome

In this pathway, genes whose expression was low in T3 and high in T4 and T5 were detected: CHI (OP000217; EC 5.5.1.6) and CYP75B2 (OP040720; EC 1.14.14.82). Genes over-expressed in T3 and under-expressed in T4 and T5 were also found: CYP98A2 (OP160423; EC 1.14.-.-), CCOAOMT (OP023778, OP015161; EC 2.1.1.104) and CYP73A16 (OP073728; EC 1.14.14.91) and FHT (OP028058; EC 1.14.11.9). In addition, the FHT gene (OP095543; EC 1.14.11.9) had a high expression in T3, low in T4 and high in T5 (Figure S3).

GO terms of carbohydrates of the *O. albicarpa* transcriptome

In the GO term "Carbohydrate metabolic process" genes were identified that were under-expressed in T3 and over-expressed in T4 and T5: LOC100243180 (OP076516; EC 3.2.1.15), OsI_025867 (OP164596; EC 3.1.1.31), CARSR12 (OP165749; EC 3.2.1.23), OLE9 (OP060704; EC 3.2.1.39) and VIT_00031543001 (OP013616; EC 3.2.1.39). There were genes that had a high expression in T3, low in T4 and high in T5: GPDHC1 (OP094718; EC 1.1.1.8), BG1 (OP025911; EC 3.2.1.39), A6 (OP161044; EC 3.2.1.39), GPDHC1 (OP094718; EC 1.1.1.8), At3g47520 (OP091027; EC 1.1.1.37) and SETH3 (OP118935; EC 5.3.1.13). Another group of genes had a high expression in T3 and low in T4 and T5: At1g11820 (OP050809; EC 3.2.1.39), LOC100243180 (OP117834; EC

3.2.1.15), At2g27500 (OP093322; EC 3.2.1.39), BGLU44 (OP170752; EC 3.2.1.21), PGMP (OP001310; EC 5.4.2.2) and CIT (OP002961; EC 2.3.3.16) (Figure 6).

Figure 6. Heatmap of the most differentially expressed transcripts of the GO term "Carbohydrate metabolic process" of *Opuntia albicarpa* fruit development. The heatmap graph was constructed based on the Z-score of the reads from the nine libraries.

In the GO term "Sucrose metabolic process" genes were identified and that were over-expressed in T3 and decreased in T4 and T5: CFBP1 (OP089913, EC 3.1.3.11), INV*DC4 (OP028592; EC 3.2.1.26) and SS (OP048062; EC 2.4.1.13). Likewise, the SUC3 gene (OP161877; EC N/A) increased its expression at T5 (Figure S4).

The GO term "Glucose metabolic process" presented genes with low expression in T3 and a high expression in T4 and T5: GALM (OP086472; EC 5.1.3.3) and VTC2 (OP175145; EC 2.7.7.69). Other genes presented over expression at T3 and under expression at T4 and T5: G6PDH (OP046817; EC 1.1.1.49), G6PD (OP146929; EC 1.1.1.49), GAPA (OP113842, OP113839; EC 1.2.1.13), GAPB (OP113840; EC 1.2.1.13) and DPEP (OP169611; EC 2.4.1.25) (Figure S5).

GO term "flavonoid biosynthetic process" of the *O. albicarpa* transcriptome.

Here genes over-expressed in T3 and under-expressed in T4 and T5 were detected: DTX35 (OP033464; EC N/A), CYP98A2 (OP160423; EC 1.14.-) and FHT (OP095543; EC 1.14.11.9). Other genes had a low expression at T3 and high expression at T4 and T5: HO1 (OP129445; EC 1.14.14.18), CHI (OP000217; EC 5.5.1.6) and CYP75B2 (OP040720; EC 1.14.14.82) (Figure S6).

DISCUSSION

Although the Alfajayucan prickly pear (*O. albicarpa* Scheinvar) cultivation has economic and cultural importance in Mexico, there is little research on the

genomic/genetic resources of this species, and no transcriptomic information was available during fruit development until the present research. The results on the genetic changes that occurred during the maturation of *Opuntia* fruits provide a valuable resource to better understand the biology of the genus.

Morphological changes during fruit development

The increase in weight of the loculus and decrease in weight of the shell from T3 indicates that during the ripening process of prickly pear, the greatest accumulation of the edible portion (locule) occurs, which is related to the greatest differential expression of transcripts occurred between T3 and T4.

Data filtering and de novo assembly

The type of RNA sequencing used in this study was paired-end, which, according to Fullwood et al. (2009) is the most efficient and accurate approach to demarcate gene transcription unit boundaries and complements other methods for transcriptome studies. Of the five times sampled during fruit ripening (T1-T5), only the times T3, T4 and T5 were used for transcriptomic analysis.

The total of raw reads and clean reads obtained in the present study are consistent with that reported by Zhou et al. (2020) for pitahaya for being a crassulacean acid metabolism (CAM) plant, where the total raw and clean readings for each sample ranged from 46,688,418 to 62,038,332 and from 45,033,096 to 60,311,044 respectively, although this is a function of the experimental conditions.

Regarding the de novo transcriptome assembly during the development of *O. albicarpa* fruits, the alignment rate was high (87.26 to 98.32%) and allows us to identify how many sequences have been aligned to the transcriptome.

Comparing the assembly obtained with other studies on CAM plants, Cervantes-Pérez et al. (2018) in *Agave salmiana* obtained an assembly with 170,844 transcripts from root, leaf and callus data; Gross et al. (2013) obtained 20,4530 contigs in *Agave tequilana* and 128,869 contigs in *Agave deserti*; Mallona et al. (2011) identified a total of 43,066 contigs with average lengths of 612 bp in *Opuntia ficus-indica*. By other hand, Wu et al. (2020) identified 65,317 and 91,638 genes in red-fleshed pitaya and white-fleshed pitaya respectively, in four stages of development; Wu et al. (2022) obtained an assembly of 95,412 unigenes with a mean length of 913 bp and an N50 length value of 1878 bp from nine pitahaya flower development stages; Zhang et al. (2022) obtained an assembly of 261,468 transcripts and 150,568 unigenes in six stages of pitahaya fruit development. Wang et al. (2020) detected 16,157 genes expressed in pineapple fruits. Valadez-Moctezuma et al. (2022) with the MACE (Massive Analysis of cDNA Ends) technology obtained 8,383 (GC: 40.1%), 7,890 (GC: 40.11%) and 5,300 (GC: 39.9%) transcripts for the de novo assembly of *O. ficus-indica*, *O. robusta* and *O. joconostle*, respectively.

Functional Annotation

From the annotation results, only 11.29% and 34.01% of the transcripts had matches in the UniProtKB/Swiss-Prot database for Blastx and Blastp, respectively. In this regard, Cervantes-Pérez et al (2018) obtained in *Agave salmiana* 40,644 (24%) sequences that presented an open reading frame (ORF) and identified 12,209 putative genes; Zhou et al. (2020) identified 44,263 annotated unigenes in pitahaya; Gross et al. (2013) obtained in *Agave tequilana* and *Agave deserti* sequences that encode around 35,000 proteins; Mallona et al. (2011) identified for *O. ficus-indica* 29,835 contigs that produced BLAST hit scores against sequences from one CAM species (69.3%).

Likewise, Zheng et al. (2021) predicted 28,992 protein-coding genes using protein homology and RNA-seq data in dragon fruit; Wu et al. (2022) found that 18,564 and 18,483 unigenes were annotated in Pfam and SwissProt for developing pitahaya flowers; Zhang et al. (2022) identified 40,461 annotated unigenes in the NCBI non-redundant protein database (26.9% of total unigenes) in dragon fruit; Valadez-Moctezuma et al. (2022) identified that around 22.2-23.7% (1,174-1,986) of the transcripts had matches in the UniProtKB/Swiss-Prot database.

The large number of KEGG pathways, GO and KO terms enriched in our EggNOG-mapper analysis revealed that the *O. albicarpa* fruit transcriptome included functionally diverse genes. In this regard, Valadez-Moctezuma et al. (2022) obtained 282 KEGG pathways and 2,793 GO terms for *O. ficus-indica*, *O. robusta*, and *O. joconostle*; Zheng et al. (2021) found 21,655 (74.7%) proteins in dragon fruit that were annotated by eggNOG, of which 10,093 were assigned to GO terms and 9,920 to KEGG pathways.

Differential expression, gene orthology (GO) and KEEG analysis of DET

The comparison T3 vs T4 showed the highest number of DETs with 43.84%, which suggests that the development period between T3 and T4 presents the most dynamic transcriptional changes; This coincides with the report of Yan-Jun et al. (2018) who identified in *Lycium ruthenicum* that the development period with the most dynamic transcriptional changes was between S1 (green maturity stage) and S2 (skin color change), with more than half of the DEGs (63.8%). Likewise, Wu et al. (2020) found 44,109 differentially expressed genes (DEG) between red-fleshed and white-fleshed pitaya during four stages of development, among which, most DEGs were obtained in R2_vs_W2 (25 days after pollination), with 11,317 DEG upregulated and 4,788 downregulated. On the other hand, Wu et al. (2022) found 1,492 overlapping DEG between the last four stages

of pitahaya flower development. Shared genes in developmental stage comparisons encode the following proteins: Boron transporter 4 (BOR4), Ethylene-responsive transcription factor ABR1 (ABR1), L-ascorbate oxidase-like (LOC101215231), Tonoplast dicarboxylate transporter (TDT), Protein TIFY 9 (TIFY9) and Plasma membrane ATPase 4 (PMA4).

Relative to functional annotation from DET using KOBAS, the number of significantly enriched KEGG pathways and GO terms was higher in comparisons that included T3, consistent with the high number of differentially expressed transcripts. In addition, according to the GO terms categorization, the largest number of GO terms corresponds to the category of biological processes (54.63% in T3 vs T4, 53.89% in T3 vs T5 and 52.34% in T4 vs T5). In this regard, Valadez-Moctezuma et al. (2022) for the comparison of fruits of *O. ficus-indica* vs. *O. robusta* recovered 14 KEGG pathways and 73 significantly enriched GO terms (corrected P value < 0.01); for the comparison of *O. ficus-indica* vs *O. joconostle* fruits, they detected 11 KEGG pathways and 64 significantly enriched GO terms and for the comparison of *O. joconostle* vs *O. robusta* fruits, they recovered 21 KEGG pathways and 106 significantly enriched GO terms, where most GO terms were classified as BP. In addition, of the main KEGG pathways enriched for *O. albicarpa* (Table 1), several of them coincide with those reported by Valadez-Moctezuma et al. (2022) in *O. ficus-indica*, *O. robusta*, *O. joconostle*: “Metabolic pathways”, “Biosynthesis of secondary metabolites”, “Carbon metabolism”, “Carbon fixation in photosynthetic organisms” and “Glycolysis/Gluconeogenesis”.

"Carbohydrate metabolism" and "Flavonoid biosynthesis" pathways of the *O. albicarpa* transcriptome

The carbohydrate metabolism pathways were selected since, according to Martín del Campo et al. (2019) during the ripening process of the *O. albicarpa* fruit the content of total soluble solids and reducing sugars increase progressively until 125 days after flowering; Zenteno-Ramirez et al. (2015) in *O. albicarpa* prickly pear juice quantified 14.55 mg.mL⁻¹ of total sugars, of which glucose (8.14 mg.mL⁻¹), fructose (6.39 mg.mL⁻¹) and sucrose (0.01 mg.mL⁻¹) were the most abundant. Likewise, Reyes-Ocampo et al. (2019) performed a simple extraction of *O. ficus-indica* mucilage and obtained the composition of arabinose (12.54%), fucose (1.6%), galactose (8.89%), galacturonic acid (13.27%), glucose (12.24%), mannose (8.31%), rhamnose (20.26%) and xylose (6.85%). Of the eight pathways of carbohydrate metabolism significantly enriched during the development and ripening of *O. albicarpa* fruits, Valadez Moctezuma et al. (2022) reported the pathways "Amino sugar and nucleotide sugar metabolism" and "Galactose metabolism" in *O. ficus-indica*, *O. robusta*, *O. joconostle*, but their analysis was carried out only in cladodes and practically mature fruits, not during growth of the maturation process.

Wu et al. (2022) reported the enrichment of the KEGG pathways of sugar metabolism during pitaya flower development; also reported some genes in carbohydrate transport that were also detected in our study (TPS7, AGAL1, SS1). Zhang et al. (2022) found that glucose was the predominant sugar in ripe pitaya fruit and that VAI, NI and SS are crucial enzymes for sugar accumulation. They also obtained seventeen genes involved in the "Starch and sucrose metabolism" pathway. Cortes-Sierra et al. (2015) identified differential gene expression patterns in cassava varieties for some starch genes, of which,

in the present study, Sucrose synthase (SS), Beta-amylase (BAM2 and BAM3) and Granule-bound starch synthase (WAXY=GBSS) were identified.

Zhang et al. (2022) identified 41 DEGs for the "Starch and sucrose metabolism" pathway and 22 DEGs for the "Galactose metabolism" pathway in pecan nut fruits; of which most were quantified in the present study: Phosphoglucomutase (PGMP), Beta-glucosidase (BGLU12, BGLU44), Beta-fructofuranosidase (INV*DC4), Hexokinase-3 (At1g50460), Trehalose-phosphate synthase (TPS5, TPS7 y TPS9), Probable fructokinase-7 (At5g51830), Trehalose-phosphate phosphatase (TPPA, TPPG), Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 1 (At1g11820), Glucose-1-phosphate adenylyltransferase (ADG2), Granule-bound starch synthase 1 (WAXY), Probable fructokinase-4 (At3g59480), Endoglucanase (At1g64390) and Sucrose-phosphate synthase (SPS).

In the "Fructose and mannose metabolism" pathway, Hai-Shun et al. (2020) reported five differentially expressed genes in *Lolium perenne*, of which Fructose-bisphosphate aldolase (FBA2 and FBA3) and 6-phosphofructokinase (PFK3 and PFK6) were identified in our study.

The enriched flavonoid biosynthesis pathway for *O. albicarpa* was also reported by Valadez-Moctezuma et al. (2022) for the comparison of fruits/cladodes of three opuntia species, where the chalcone-flavonone isomerase (CHI) gene was differentially expressed, which is part of the biosynthetic pathway for all classes of flavonoids. Fernandez-Lopez et al. (2010) identified the flavonoids myricetin and luteolin, quercetin, isorhamnetin and kaempferol in opuntia fruits; of the genes found in the present study, Flavonoid 3'-monooxygenase (CYP75B2) participates in the synthesis of quercetin.

CONCLUSIONS

The results on the *O. albicarpa* transcriptome provide a complete and precise basis that can be used for genetic and molecular studies on the genus *Opuntia* and thereby better understand its biology and physiology. The increase in weight of the loculus that corresponds to the edible portion of the fruit is related to the higher differential expression of transcripts that occurred between T3 and T4. Genes involved in carbohydrate metabolism and flavonoid biosynthesis, which are important in the development and ripening of *O. albicarpa* fruits, were identified and quantified.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the farmers of the municipality of San Martín de las Pirámides, State of Mexico, for allowing sampling on their farms. They also direct a special thanks to the public web platforms used in bioinformatics analysis, as well as to the National Council of Humanities, Science and Technology (CONAHCYT) of Mexico for their support.

CONFLICTS OF INTEREST

No potential conflict of interest was reported by the authors.

REFERENCES

- Afgan E, Baker D, Batut B, Van den Beek M, Bouvier D, Čech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Grüning BA, et al. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018update. *Nucleic Acids Res.* 46: 537–544. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Andrews S. n.d. FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Available in [<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>]

- Bolger AM, Lohse M, & Usadel B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bu D, Luo H, Huo P, Wang Z, Zhang S, He Z, Wu Y, Zhao L, Liu J, Guo J, et al. (2021). KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis, *Nucleic Acids Res.* 49(1): 317–325, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab447>
- Cervantes-Pérez SA, Espinal-Centeno A, Oropeza-Aburto A, Caballero-Pérez J, Falcon F, Aragón-Raygoza A, Sánchez-Segura L, Herrera-Estrella L, Cruz-Hernández A, Cruz-Ramírez A. (2018). Transcriptional profiling of the CAM plant *Agave salmiana* reveals conservation of a genetic program for regeneration, *Dev. Biol.* 442(1): 28-39 <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.018>.
- Chen, H., Hu B, Zhao L, Shi D, She Z, Huang X, Priyadarshani S, Niu S & Qin Y. (2019). Differential Expression Analysis of Reference Genes in Pineapple (*Ananas comosus* L.) during Reproductive Development and Response to Abiotic Stress, Hormonal Stimuli. *Trop. Plant. Biol.* 12: 67–77. <https://doi.org/10.1007/s12042-019-09218-2>.
- Cortés-Sierra S, Chavarriaga P, Ceballos H & López-Carrascal C. (2015). Evaluación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de almidón en diferentes variedades de yuca. *Acta Biolo Colomb* 20(2): 37-46. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.42875>
- Ewels P, Magnusson M, Lundin S, & Kaller M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19): 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>

- Fernández-López JA, Almela L, Obón JM, Castellar R. (2010). Determination of antioxidant constituents in cactus pear fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65(3): 253-259. doi: 10.1007/s11130-010-0189-x.
- Fu L, Niu B, Zhu Z, Wu S, & Li W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics.* 28(23): 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Fullwood MJ, Wei CL, Liu ET, Ruan Y. (2009). Next-generation DNA sequencing of paired-end tags (PET) for transcriptome and genome analyses. *Genome Res.* 19(4): 521-532. doi: 10.1101/gr.074906.107.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R, Zeng Q, et al. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29(7): 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Granados-Sánchez, D. y Castañeda-Pérez. A. D. (2003). El nopal. Historia, fisiología, genética e importancia frutícola. Trillas. México.
- Gross SM, Martin JA, Simpson J, Abraham-Juarez MJ, Wang Z, Visel A. (2013). De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics* 14(1): 563. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-563>
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, et al. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc.* 8(8): 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>

- Hai-Shun X, Su-Ming G, Lin Z, and Jin-Cheng X. (2020). Growth, physiological and transcriptomic analysis of the perennial ryegrass *Lolium perenne* in response to saline stress. R. Soc. open sci. 7(7): 200637 <http://doi.org/10.1098/rsos.200637>
- Heberle H, Meirelles GV, Da Silva FR, Telles GP, Minghim R. (2015) InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. BMC Bioinformatics 16: 169. DOI: 10.1186/s12859-015-0611-3
- Huerta-Cepas J, Szklarczyk D, Heller D, Hernández-Plaza A, Forslund SK, Cook H, Mende DR, Letunic I, Rattei T, Jensen LJ, Von Mering C, Bork P. (2019) eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. Nucleic Acids Res. 8(47): D309–D314. doi: 10.1093/nar/gky1085
- Illoldi-Rangel P, Ciarleglio M, Sheinvar L, Linaje M, Sánchez-Cordero V, Sarkar S. (2012). Opuntia in México: Identifying Priority Areas for Conserving Biodiversity in a Multi-Use Landscape. PLOS ONE 7(5): e36650. Nucleic Acids Res. 8(47): D309–D314. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036650>
- Law CW, Chen Y, Shi W, & Smyth GK. (2014). Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. Genom Biol. 15(2): R29 <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- López-Gutiérrez DM, Reyes-Agüero JA, Muñoz A, Robles J, Cuevas E. (2015). Comparación morfológica entre poblaciones silvestres y manejadas de *Opuntia atropes* (Cactaceae) en Michoacán, México. Rev. Mex. Biodivers. 86(4): 1072-1077. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2015.08.006>.

- Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. (2017). Transcriptomics technologies. PLoS Comput. Biol. 13(5): e1005457. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2015.08.006>
- Majure LC, Puente R, Griffith MP, Judd WS, Soltis PS, Soltis DE. (2012). Phylogeny of *Opuntia* s.s. (Cactaceae): Clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. Am. J. Bot. 99: 847-864. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100375>
- Mallona I, Egea-Cortines M y Weiss J. (2011). Conserved and Divergent Rhythms of Crassulacean Acid Metabolism-Related and Core Clock Gene Expression in the Cactus *Opuntia ficus-indica*. Plant Physiol. 156: 1978–1989. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179275>
- Martín Del Campo ST, Ramírez-Anaya JP, Pimienta-Barrios E, Castañeda-Saucedo MC, Samaniego-Sánchez C & Gómez-Hernández HE. (2019). Identifying non-destructive growth and maturity indexes of Prickly pear (*Opuntia albicarpa* S. Var. Burróna) and evaluation of freeze-drying conditions. CyTA J. Food 17(1): 917-925, DOI: 10.1080/19476337.2019.1676315
- Mendez-Farroñan SJ, Alaya-Bernabé LS, Masías RP, Cedeño EV. (2017). *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. como fuente de compuestos bioactivos para la salud y enfermedad. UCV-SCIENTIA, 9(1):49-49. Available in [<http://revistas.ucv.edu.pe/index.php/ucv-scientia/issue/view/181/7>]
- Reyes-Agüero JA, Aguirre-Rivera JR, Carlín FC, González-D DA. (2009). Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de *Opuntia* en la Altiplanicie Meridional de México. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí: SAGARPA. CONACYT.

- Reyes-Ocampo I., Córdova-Aguilar MS, Guzmán G, Blancas-Cabrera A, & Ascanio G. (2019). Solvent-free mechanical extraction of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *J. Food Process Eng.* 42(1): e12954. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12954>
- Scheinvar L. (1999). *Opuntia albicarpa* Scheinvar, una nueva especie para la ciencia del Estado de México. *Rev Jard. Bot. Nac.* 20: 167-169.
- Simão FA, Waterhouse RM, Ioannidis P, Kriventseva EV, & Zdobnov EM. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31(19): 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Sims D, Sudbery I, Illott NE, Heger A. & Ponting CP. (2014). Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses. *Nat. Rev. Genet.* 15: 121–132. <https://doi.org/10.1038/nrg3642>
- Valadez-Moctezuma E, Samah S, Luna-Paez A. (2015). Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant Syst. Evol.* 301:737–747. <https://doi.org/10.1007/s00606-014-1112-y>
- Valadez-Moctezuma E, Samah S, Mascorro-Gallardo JO, Marbán-Mendoza N, Aranda-Ororio G, Flores-Girón E, Brito-Nájera G & Rodríguez de la O JL. (2023). The first transcriptomic analyses of fruits and cladodes for comparison between three species of *Opuntia*. *Genet. Resour. Crop Evol.* 70: 951–970. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01480-w>
- Valdez-Cepeda RD, Blanco-Macías F, Gallegos-Vázquez C. (2003). Ordenación y clasificación numérica en nopal tunero mediante atributos de fruto. *Rev Chapingo Ser Hortic.* 9(2): 81-95.

- Van Verk MC, Hickman R, Pieterse CMJ, Van Wees SCM. 2013. RNA-seq: revelation of the messengers. *Trends Plant Sci.* 18(4): 175-179
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.02.001>.
- Wang L, Li Y, Jin X, Liu L, Dai X, Liu Y, Zhao L, Zheng P, Wang X, Liu Y, et al. (2020). Floral transcriptomes reveal gene networks in pineapple floral growth and fruit development. *Commun. Biol.* 3: 500. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01235-2>
- Wu Y, Xu J, Han X, Qiao G, Yang K, Wen Z, Wen X. (2020). Comparative Transcriptome Analysis Combining SMRT- and Illumina-Based RNA-Seq Identifies Potential Candidate Genes Involved in Betalain Biosynthesis in Pitaya Fruit. *Int. J. Mol. Sci.* 21(9): 3288. <https://doi.org/10.3390/ijms21093288>
- Wu Z, Huang L, Huang F, Lu G, Wei S, Liu C, Deng H & Liang G. (2022). Temporal transcriptome analysis provides molecular insights into flower development in red-flesh pitaya. *Electron. J. Biotechnol.*, 58: 55-69.
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.05.005>
- Zenteno-Ramírez G, Juárez-Flores BI, Aguirre-Rivera JR, Ortiz-Pérez MD, Zamora-Pedraza C & Rendón-Huerta JA. (2015). Evaluación de azúcares y fibra soluble en el jugo de variantes de tunas (*Opuntia* spp.). *Agrociencia* 49(2): 141-152.
- Zhang Z, Xing Y, Ramakrishnan M, Chen C, Xie F, Hua Q, Chen J, Zhang R, Zhao J, Hu G & Qin Y. (2022). Transcriptomics-based identification and characterization of genes related to sugar metabolism in ‘Hongshuijing’ pitaya. *Hortic Plant J.* 8(4): 450-460. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.06.004>.
- Zhang J, Wang T, Zhang F, Liu Y, Wang G. (2022). Comparative Analysis of the Transcriptomes of Persisting and Abscised Fruitlets: Insights into Plant Hormone

and Carbohydrate Metabolism Regulated Self-Thinning of Pecan Fruitlets during the Early Stage. *Curr. Issues Mol. Biol.* 44(1): 176-193. <https://doi.org/10.3390/cimb44010013>

Zhou Z, Gao H, Ming J, Ding Z, Lin XE & Zhan R. (2020). Combined Transcriptome and Metabolome analysis of Pitaya fruit unveiled the mechanisms underlying Peel and pulp color formation. *BMC Genomics* 21: 734 <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07133-5>

ANNEXES

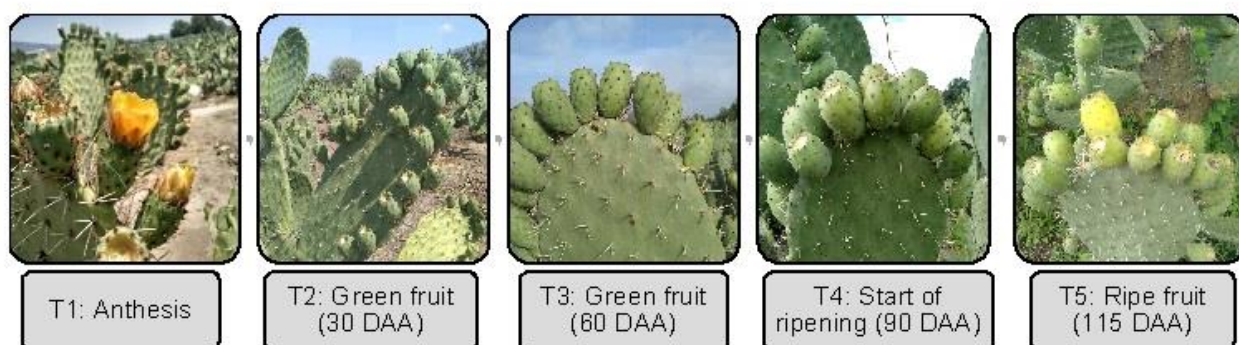


Figure 1 Phenology of the development and maturation of prickly pear fruits (*Opuntia albicarpa* Scheinvar)

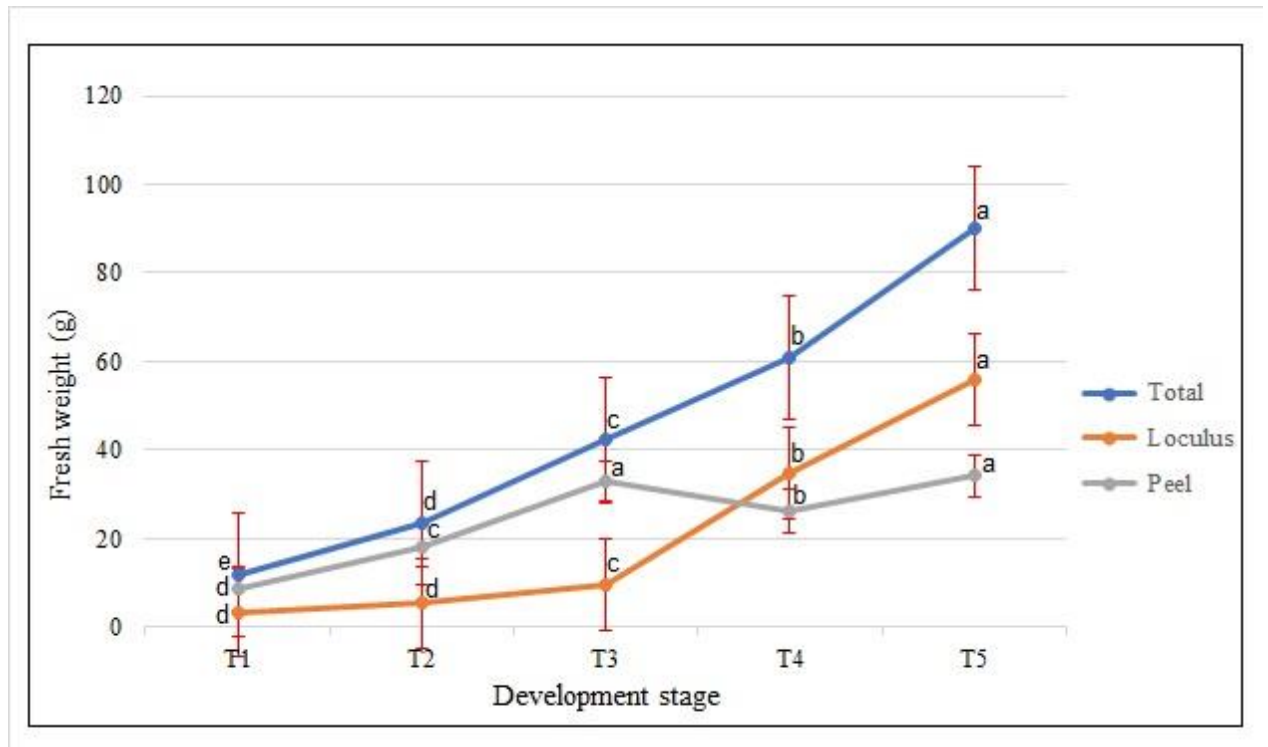


Figure 2 Changes in fresh weight of locule and peel during the development of *Opuntia albicarpa* Scheinvar fruits. Means with different letters are significantly

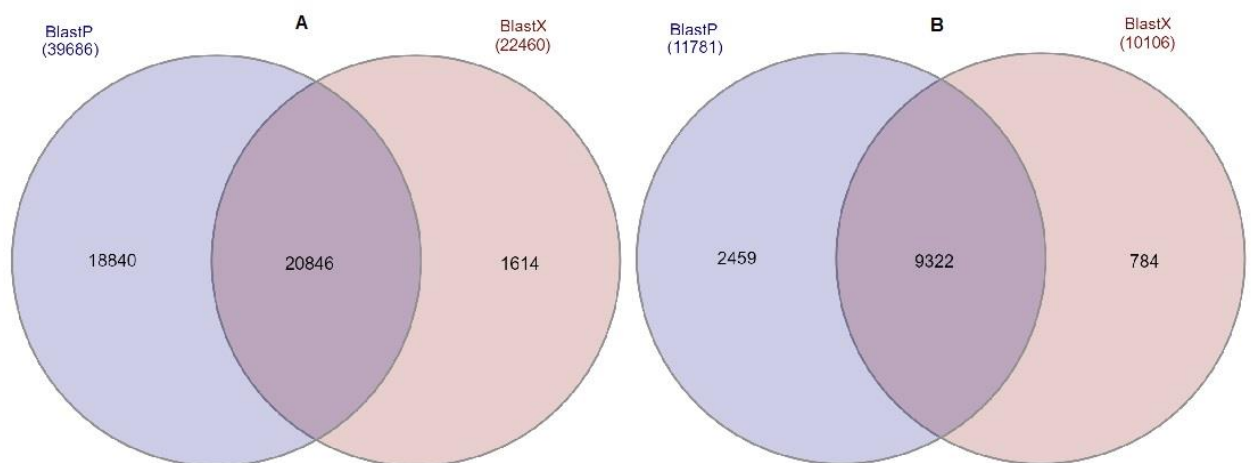


Figure 3 A) Venn diagram with the transcripts annotated with Diamond BlastX and BlastP against the UniProtKB Swiss-Prot database. B) Venn diagram with genes.

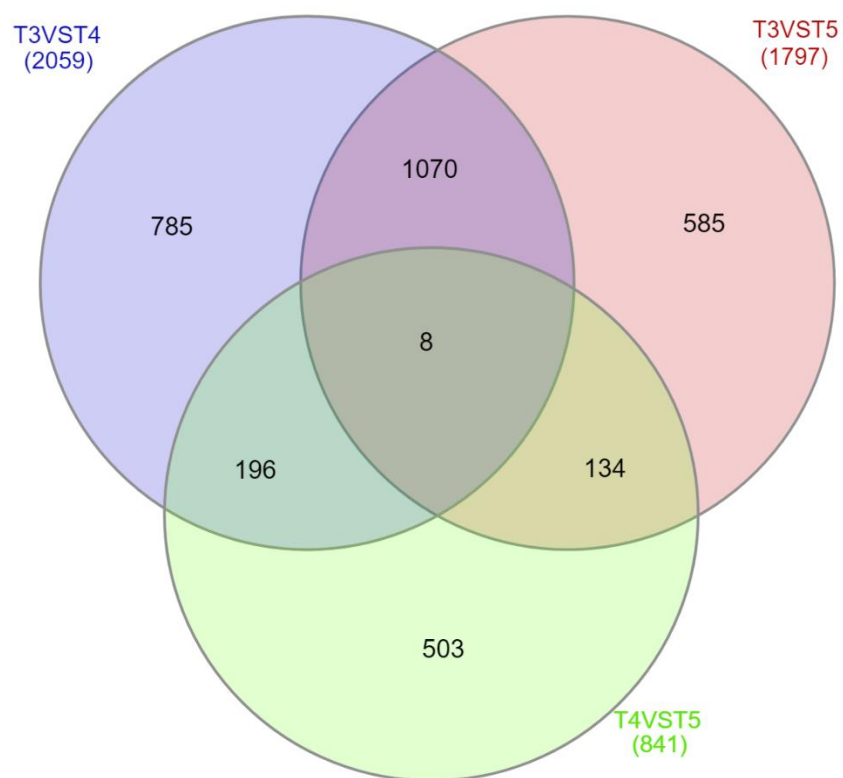


Figure 4 Differentially expressed transcripts in the comparisons of maturation times (T3vsT4, T3vsT5 and T4vsT5) of *Opuntia albicarpa* fruits.

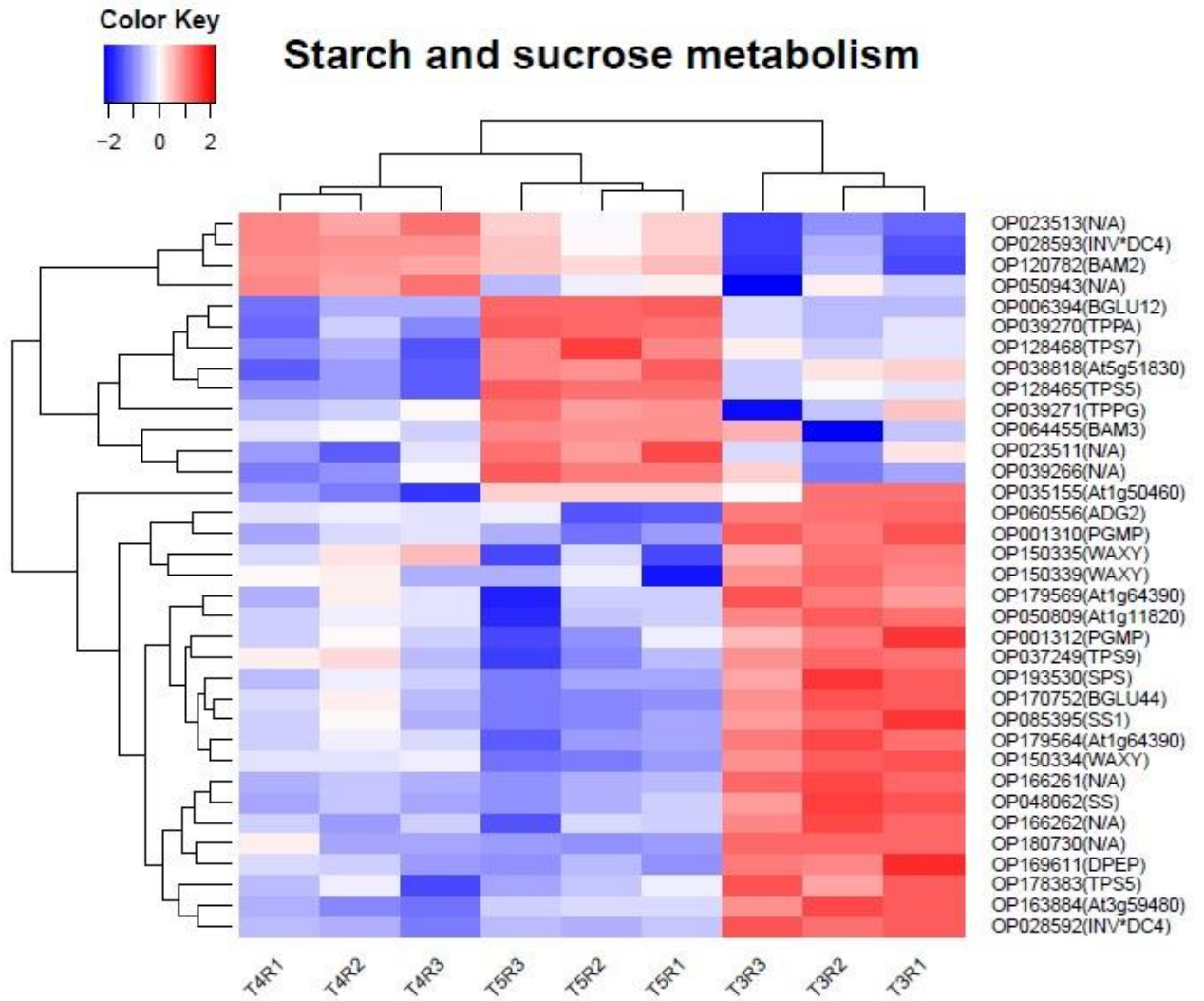


Figure 5 Heatmap of the most differentially expressed transcripts of the KEGG pathway Starch and sucrose metabolism of *Opuntia albicarpa* fruit development.

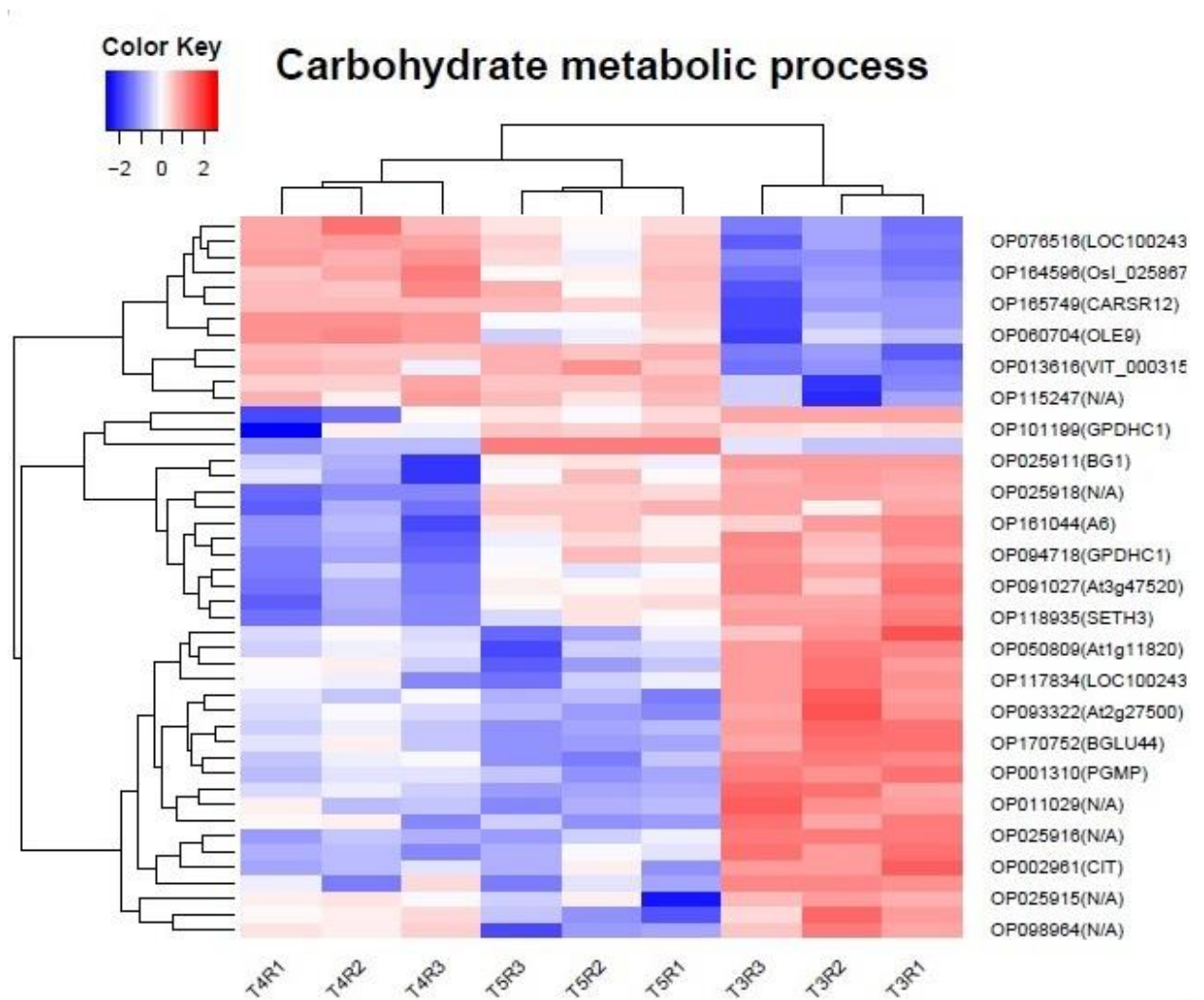


Figure 6 Heatmap of the most differentially expressed transcripts of the GO term Carbohydrate metabolic process of *Opuntia albicarpa* fruit development.

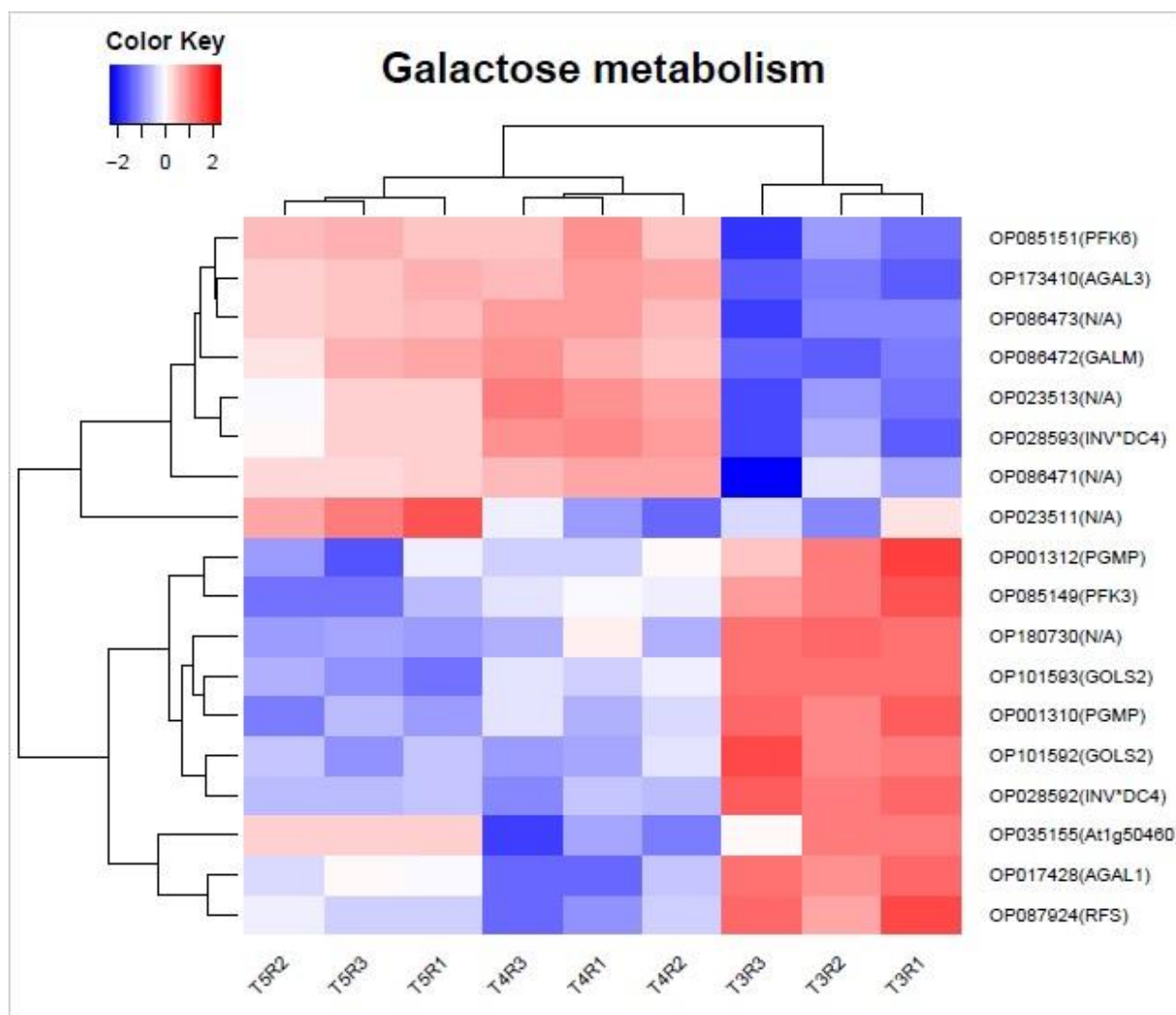


Figure S1 Galactose metabolism

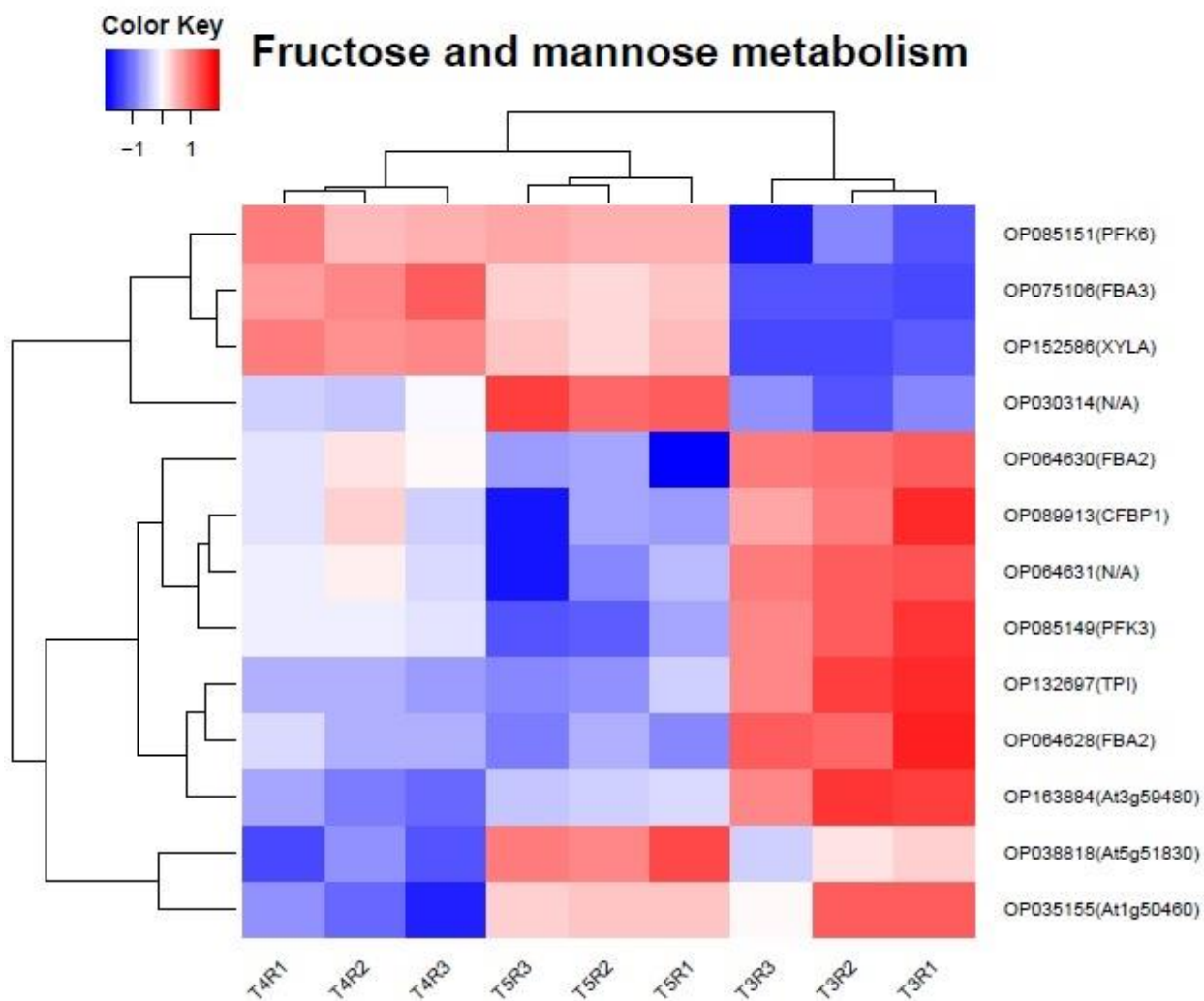


Figure S2. Fructose and mannose metabolism

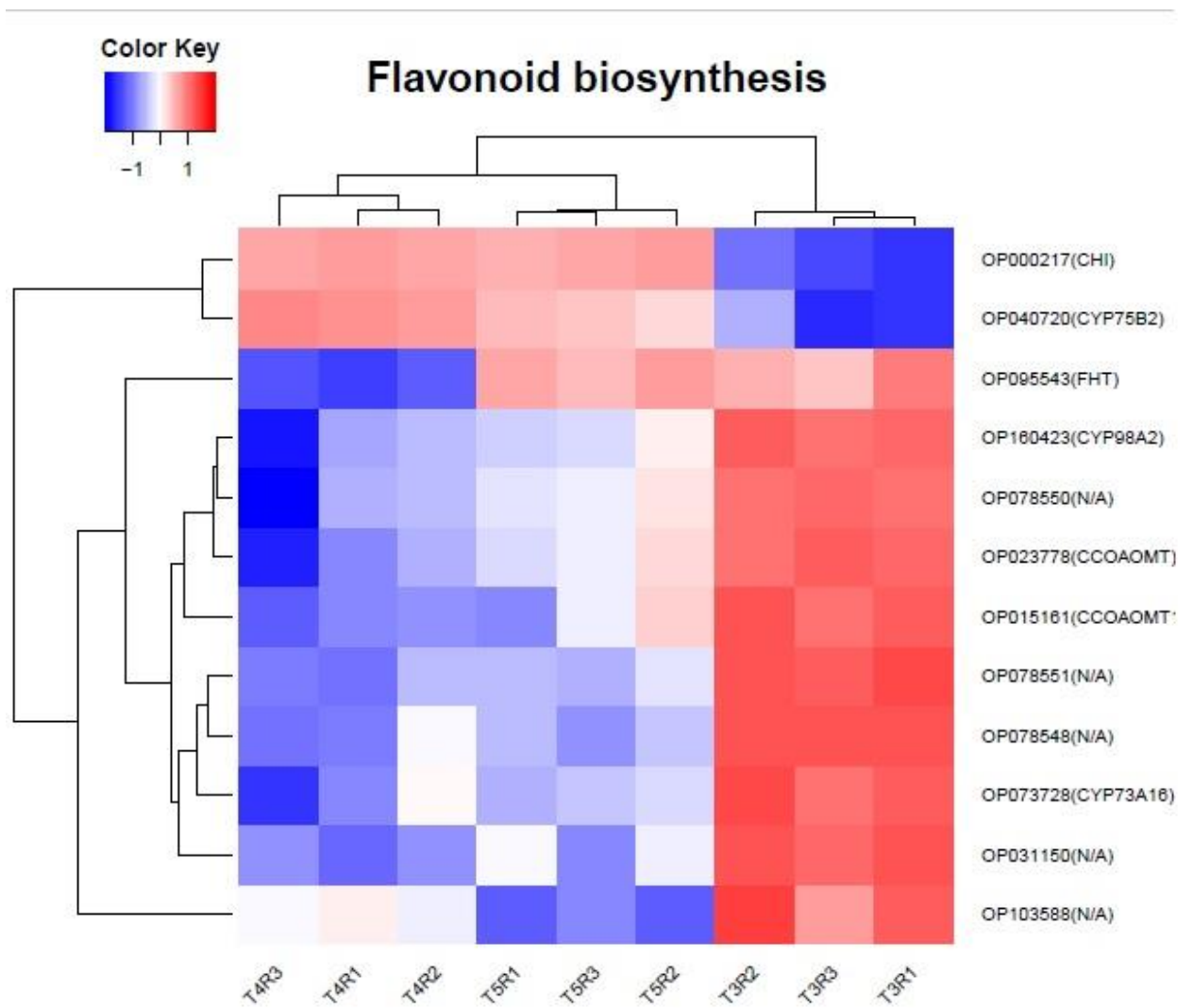


Figure S3. Flavonoid biosynthesis

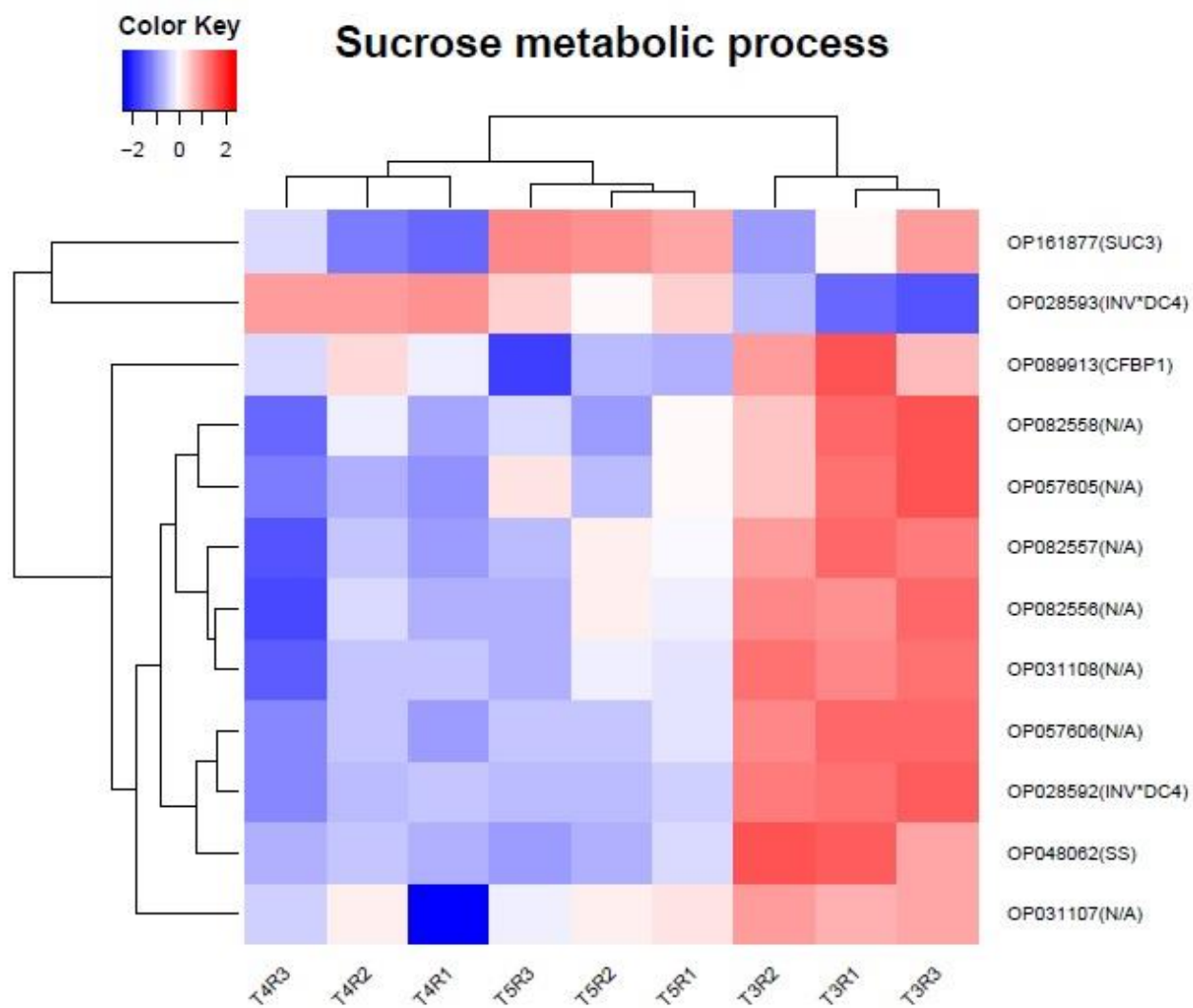


Figure S4. Sucrose metabolic process

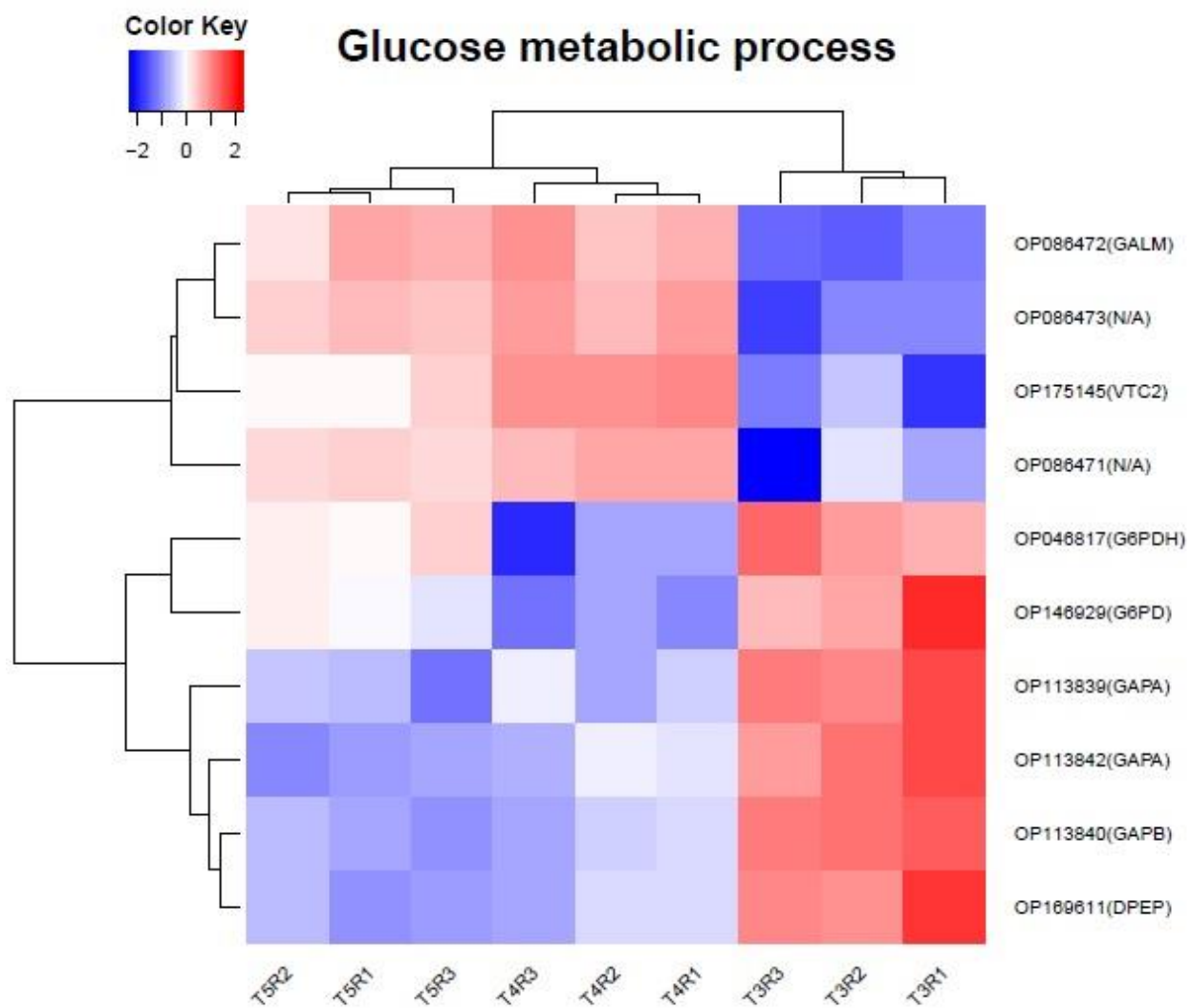


Figure S5. Glucose metabolic process

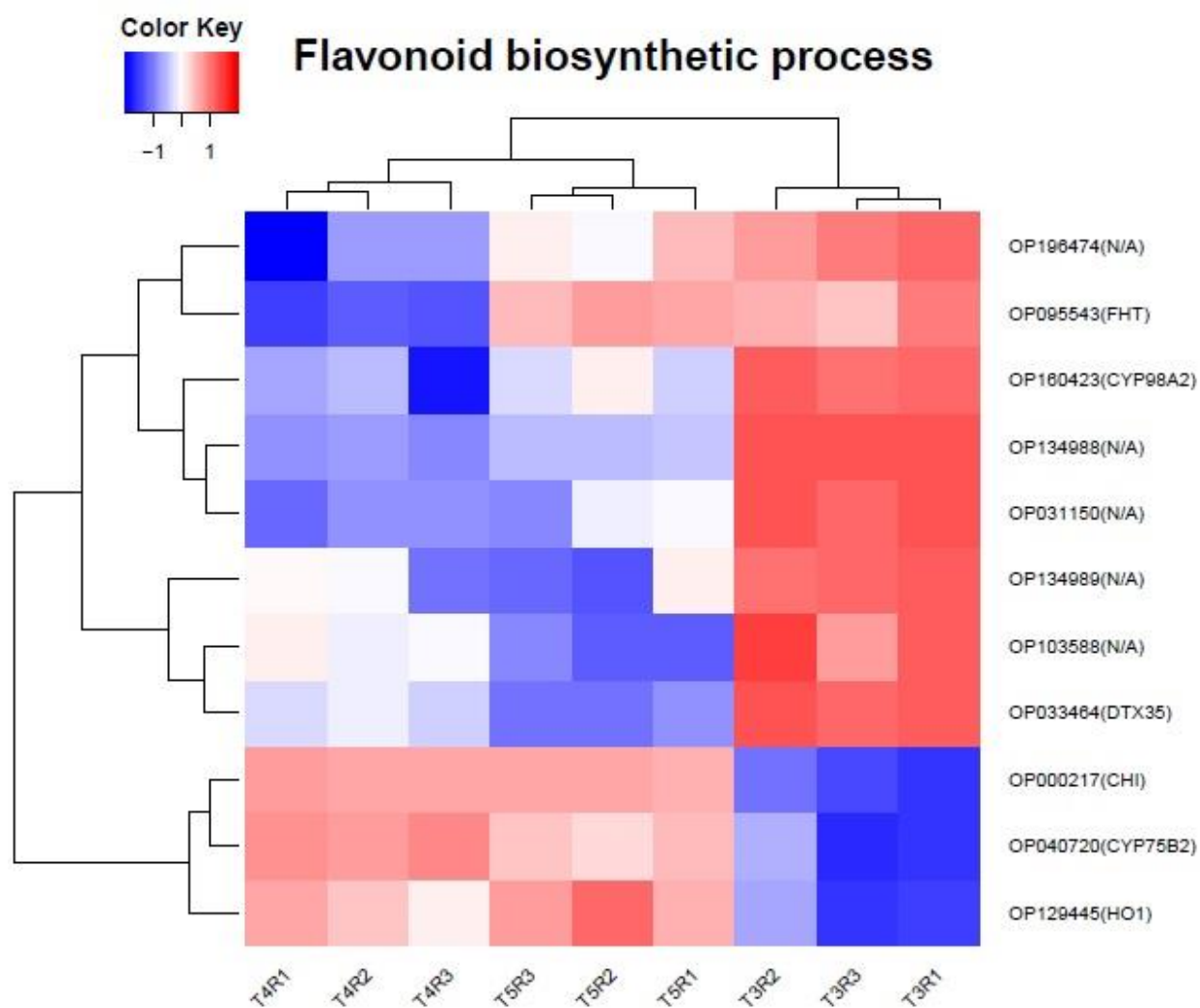


Figure S6. Flavonoid biosynthetic process

Table 1. Top 10 KEGG enriched pathways for *Opuntia albicarpa*.

T3 vs T4	Corr. P-value	T3 vs T5	Corr. P-value	T4 vs T5	Corr. P-value
Metabolic pathways	1.59(e ⁻⁵⁷)	Metabolic pathways	7.41(e ⁻³⁹)	Metabolic pathways	3.53(e ⁻¹⁵)
Biosynthesis of secondary metabolites	4.98(e ⁻⁴³)	Biosynthesis of secondary metabolites	5.87(e ⁻²⁶)	alpha-Linolenic acid metabolism	6.09(e ⁻¹¹)
Biosynthesis of amino acids	1.69(e ⁻¹⁷)	Carbon metabolism	5.62(e ⁻¹³)	Biosynthesis of secondary metabolites	4.14(e ⁻¹⁰)
Cysteine and methionine metabolism	7.61(e ⁻¹²)	Glycolysis / Gluconeogenesis	2.78(e ⁻⁰⁹)	Cysteine and methionine metabolism	7.45(e ⁻⁰⁷)
Carbon metabolism	2.16(e ⁻¹¹)	Carbon fixation in photosynthetic organisms	8.41(e ⁻⁰⁸)	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	9.17(e ⁻⁰⁶)
Phenylpropanoid biosynthesis	3.31(e ⁻⁰⁹)	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	9.94(e ⁻⁰⁸)	MAPK signaling pathway - plant	0.000158
Plant hormone signal transduction	3.86(e ⁻⁰⁸)	Plant hormone signal transduction	1.17(e ⁻⁰⁷)	Plant hormone signal transduction	0.001039
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	1.18(e ⁻⁰⁷)	Phenylpropanoid biosynthesis	4.71(e ⁻⁰⁷)	Arginine and proline metabolism	0.002218
Glycolysis / Gluconeogenesis	1.58(e ⁻⁰⁷)	Photosynthesis	1.24(e ⁻⁰⁶)	Other types of O-glycan biosynthesis	0.003007
alpha-Linolenic acid metabolism	2.50(e ⁻⁰⁷)	Flavonoid biosynthesis	1.85(e ⁻⁰⁵)	Biosynthesis of amino acids	0.007635

Supplementary Table S1. Statistics of raw and clean RNA-seq readings of *Opuntia albicarpa*

Sample	Abbreviation	Raw data					Clean data				
		Total No. bases (bp)	Total No. readings	GC (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	Total No. readings	% reads that survived	GC (%)	Q30 (%)	Duplication (%)
60 days after flowering	T3R1	6,948,774,548	68,799,748	50.32	97.76	94.36	61,328,136	89.14	50.00	100	86.45
60 days after flowering	T3R2	8,883,675,382	87,957,182	50.32	97.67	94.25	78,324,656	89.05	50.00	100	87.50
60 days after flowering	T3R3	7,339,734,438	72,670,638	51.41	97.66	94.29	64,750,858	89.10	51.00	100	90.90
Start of ripening	T4R1	7,200,739,652	71,294,452	45.73	97.93	94.39	63,746,076	89.41	45.50	100	66.10
Start of ripening	T4R2	7,619,488,884	75,440,484	49.04	97.85	94.17	67,308,134	89.22	49.00	100	84.05
Start of ripening	T4R3	8,145,457,696	80,648,096	50.04	98.03	94.75	72,891,028	90.38	50.00	100	86.10
Ripened fruit	T5R1	8,014,699,662	79,353,462	48.22	97.88	94.45	71,136,410	89.64	48.00	100	80.95
Ripened fruit	T5R2	8,111,140,320	80,308,320	47.66	98.03	94.55	72,233,416	89.95	47.50	100	74.40
Ripened fruit	T5R3	8,855,529,308	87,678,508	48.87	98.27	95.20	79,921,230	91.15	48.50	100	84.00
Total		71,119,239,890	704,150,890	49.07	97.90	94.49	631,639,944	89.67	48.83	100.00	82.27

Table S2. KEGG pathways important during prickly pear fruit development.

Kegg pathway	ID transcript	Protein/Specie ID	Unirpt gene Id	EC	Gene	Protein
Flavonoid biosynthesis	OP000217(CHI)	sp Q45QI7 CFI_CAMSI	Q45QI7	5.5.1.6	CHI	Chalcone--flavanone isomerase
Flavonoid biosynthesis	OP015161(CCOAOMT1)	sp O49499 CAMT4_ARATH	O49499	2.1.1.104	CCOAOMT1	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 1
Flavonoid biosynthesis	OP023778(CCOAOMT)	sp Q8H9B6 CAMT_SOLTU	Q8H9B6	2.1.1.104	CCOAOMT	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase
Flavonoid biosynthesis	OP031150(N/A)				N/A	
Flavonoid biosynthesis	OP040720(CYP75B2)	sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY	Q9SBQ9	1.14.14.82	CYP75B2, F3'H	Flavonoid 3'-monooxygenase
Flavonoid biosynthesis	OP073728(CYP73A16)	sp Q43054 TCMO_POPKI	Q43054	1.14.14.91	CYP73A16	Trans-cinnamate 4-monooxygenase
Flavonoid biosynthesis	OP078548(N/A)	sp O65162 CAMT_MESCR	O65162	2.1.1.104	N/A	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase
Flavonoid biosynthesis	OP078550(N/A)	sp O65162 CAMT_MESCR	O65162	2.1.1.104	N/A	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase
Flavonoid biosynthesis	OP078551(N/A)	sp O65162 CAMT_MESCR	O65162	2.1.1.104	N/A	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase

Flavonoid biosynthesis	OP095543(FHT)	sp Q7XZQ7 FL3H_PETCR	Q7XZQ7	1.14.11.9	FHT	Flavanone 3-dioxygenase
Flavonoid biosynthesis	OP103588(N/A)	sp H2DH18 C7A12_PANGI	H2DH18	1.14.-.-	N/A	Cytochrome P450 CYP736A12
Flavonoid biosynthesis	OP160423(CYP98A2)	sp O48922 C98A2_SOYBN	O48922	1.14.-.-	CYP98A2	Cytochrome P450 98A2
Fructose and mannose metabolism	OP030314(N/A)	sp Q42649 F16P2_BETVU	Q42649	3.1.3.11	N/A	Fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic
Fructose and mannose metabolism	OP035155(At1g50460)	sp Q9LPS1 HXX3_ARATH	Q9LPS1	2.7.1.1	At1g50460	Hexokinase-3
Fructose and mannose metabolism	OP038818(At5g51830)	sp Q9FLH8 SCRK7_ARATH	Q9FLH8	2.7.1.4	At5g51830	Probable fructokinase-7
Fructose and mannose metabolism	OP064628(FBA2)	sp Q944G9 ALFP2_ARATH	Q944G9	4.1.2.13	FBA2	Fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic
Fructose and mannose metabolism	OP064630(FBA2)	sp Q944G9 ALFP2_ARATH	Q944G9	4.1.2.13	FBA2	Fructose-bisphosphate aldolase 2, chloroplastic
Fructose and mannose metabolism	OP064631(N/A)	sp P16096 ALFC_SPIOL	P16096	4.1.2.13	N/A	Fructose-bisphosphate aldolase, chloroplastic
Fructose and mannose metabolism	OP075106(FBA3)	sp Q9ZU52 ALFP3_ARATH	Q9ZU52	4.1.2.13	FBA3	Fructose-bisphosphate aldolase 3, chloroplastic
Fructose and mannose metabolism	OP085149(PFK3)	sp Q94AA4 PFKA3_ARATH	Q94AA4	2.7.1.11	PFK3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 3
Fructose and mannose metabolism	OP085151(PFK6)	sp Q9M076 PFKA6_ARATH	Q9M076	2.7.1.11	PFK6	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 6
Fructose and mannose metabolism	OP089913(CFBP1)	sp P25851 F16P1_ARATH	P25851	3.1.3.11	CFBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1, chloroplastic
Fructose and mannose metabolism	OP132697(TPI)	sp P48494 TPIS_ORYSJ	P48494	5.3.1.1	TPI	Triosephosphate isomerase, cytosolic
Fructose and mannose metabolism	OP152586(XYLA)	sp Q9FKK7 XYLA_ARATH	Q9FKK7	5.3.1.5	XYLA	Xylose isomerase
Fructose and mannose metabolism	OP163884(At3g59480)	sp Q9M1B9 SCRK4_ARATH	Q9M1B9	2.7.1.4	At3g59480	Probable fructokinase-4
Galactose metabolism	OP001310(PGMP)	sp Q9SM59 PGMP_PEA	Q9SM59	5.4.2.2	PGMP	Phosphoglucomutase, chloroplastic
Galactose metabolism	OP001312(PGMP)	sp Q9M4G5 PGMP_SOLTU	Q9M4G5	5.4.2.2	PGMP	Phosphoglucomutase, chloroplastic
Galactose metabolism	OP017428(AGAL1)	sp Q9FT97 AGAL1_ARATH	Q9FT97	3.2.1.22	AGAL1	Alpha-galactosidase 1
Galactose metabolism	OP023511(N/A)	sp P19595 UGPA_SOLTU	P19595	2.7.7.9	N/A	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
Galactose metabolism	OP023513(N/A)	sp P19595 UGPA_SOLTU	P19595	2.7.7.9	N/A	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
Galactose metabolism	OP028592(INV*DC4)	sp P80065 INVB_DAUCA	P80065	3.2.1.26	INV*DC4	Beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I
Galactose metabolism	OP028593(INV*DC4)	sp P80065 INVB_DAUCA	P80065	3.2.1.26	INV*DC4	Beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I
Galactose metabolism	OP035155(At1g50460)	sp Q9LPS1 HXX3_ARATH	Q9LPS1	2.7.1.1	At1g50460	Hexokinase-3

Galactose metabolism	OP085149(PFK3)	sp Q94AA4 PFKA3_ARATH	Q94AA4	2.7.1.11	PFK3	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 3
Galactose metabolism	OP085151(PFK6)	sp Q9M076 PFKA6_ARATH	Q9M076	2.7.1.11	PFK6	ATP-dependent 6-phosphofructokinase 6
Galactose metabolism	OP086471(N/A)				N/A	
Galactose metabolism	OP086472(GALM)	sp Q5EA79 GALM_BOVIN	Q5EA79	5.1.3.3	GALM	Galactose mutarotase
Galactose metabolism	OP086473(N/A)				N/A	
Galactose metabolism	OP087924(RFS)	sp Q8VWN6 RFS_PEA	Q8VWN6	2.4.1.82	RFS	Galactinol--sucrose galactosyltransferase
Galactose metabolism	OP101592(GOLS2)	sp C7G304 GOLS2_SOLLC	C7G304	2.4.1.123	GOLS2	Galactinol synthase 2
Galactose metabolism	OP101593(GOLS2)	sp Q9FXB2 GOLS2_ARATH	Q9FXB2	2.4.1.123	GOLS2	Galactinol synthase 2
Galactose metabolism	OP173410(AGAL3)	sp Q8VXZ7 AGAL3_ARATH	Q8VXZ7	3.2.1.22	AGAL3	Alpha-galactosidase 3
Galactose metabolism	OP180730(N/A)	sp O04893 AGLU_SPIOL	O04893	3.2.1.20	N/A	Alpha-glucosidase
Starch and sucrose metabolism	OP001310(PGMP)	sp Q9SM59 PGMP_PEA	Q9SM59	5.4.2.2	PGMP	Phosphoglucomutase, chloroplastic
Starch and sucrose metabolism	OP001312(PGMP)	sp Q9M4G5 PGMP_SOLTU	Q9M4G5	5.4.2.2	PGMP	Phosphoglucomutase, chloroplastic
Starch and sucrose metabolism	OP006394(BGLU12)	sp B8AVF0 BGL12_ORYSI	B8AVF0	3.2.1.21	BGLU12	Beta-glucosidase 12
Starch and sucrose metabolism	OP023511(N/A)	sp P19595 UGPA_SOLTU	P19595	2.7.7.9	N/A	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
Starch and sucrose metabolism	OP023513(N/A)	sp P19595 UGPA_SOLTU	P19595	2.7.7.9	N/A	UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
Starch and sucrose metabolism	OP028592(INV*DC4)	sp P80065 INVB_DAUCA	P80065	3.2.1.26	INV*DC4	Beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I
Starch and sucrose metabolism	OP028593(INV*DC4)	sp P80065 INVB_DAUCA	P80065	3.2.1.26	INV*DC4	Beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I
Starch and sucrose metabolism	OP035155(At1g50460)	sp Q9LPS1 HXXK3_ARATH	Q9LPS1	2.7.1.1	At1g50460	Hexokinase-3
Starch and sucrose metabolism	OP037249(TPS9)	sp Q9LRA7 TPS9_ARATH	Q9LRA7	2.4.1.15	TPS9	Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 9
Starch and sucrose metabolism	OP038818(At5g51830)	sp Q9FLH8 SCRK7_ARATH	Q9FLH8	2.7.1.4	At5g51830	Probable fructokinase-7
Starch and sucrose metabolism	OP039266(N/A)				N/A	
Starch and sucrose metabolism	OP039270(TPPA)	sp O64896 TPPA_ARATH	O64896	3.1.3.12	TPPA	Trehalose-phosphate phosphatase A
Starch and sucrose metabolism	OP039271(TPPG)	sp Q9SUW0 TPPG_ARATH	Q9SUW0	3.1.3.12	TPPG	Probable trehalose-phosphate phosphatase G
Starch and sucrose metabolism	OP048062(SS)	sp P13708 SUS_SOYBN	P13708	2.4.1.13	SS	Sucrose synthase

Starch and sucrose metabolism	OP050809(At1g11820)	sp O65399 E131_ARATH	O65399	3.2.1.39	At1g11820	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 1
Starch and sucrose metabolism	OP050943(N/A)				N/A	
Starch and sucrose metabolism	OP060556(ADG2)	sp P55229 GLGL1_ARATH	P55229	2.7.7.27	ADG2	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase large subunit 1, chloroplastic
Starch and sucrose metabolism	OP064455(BAM3)	sp O23553 BAM3_ARATH	O23553	3.2.1.2	BAM3	Beta-amylase 3, chloroplastic
Starch and sucrose metabolism	OP085395(SS1)	sp Q9FNF2 SSY1_ARATH	Q9FNF2	2.4.1.21	SS1	Starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic
Starch and sucrose metabolism	OP120782(BAM2)	sp O65258 BAM2_ARATH	O65258	3.2.1.2	BAM2	Beta-amylase 2, chloroplastic
Starch and sucrose metabolism	OP128465(TPS5)	sp O23617 TPS5_ARATH	O23617	2.4.1.15	TPS5	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 5
Starch and sucrose metabolism	OP128468(TPS7)	sp Q9LMI0 TPS7_ARATH	Q9LMI0	2.4.1.15	TPS7	Probable alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 7
Starch and sucrose metabolism	OP150334(WAXY)	sp Q43784 SSG1_MANES	Q43784	2.4.1.242	WAXY, GBSS	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic
Starch and sucrose metabolism	OP150335(WAXY)	sp Q43784 SSG1_MANES	Q43784	2.4.1.242	WAXY, GBSS	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic
Starch and sucrose metabolism	OP150339(WAXY)	sp Q43784 SSG1_MANES	Q43784	2.4.1.242	WAXY, GBSS	Granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic
Starch and sucrose metabolism	OP163884(At3g59480)	sp Q9M1B9 SCRK4_ARATH	Q9M1B9	2.7.1.4	At3g59480	Probable fructokinase-4
Starch and sucrose metabolism	OP166261(N/A)				N/A	
Starch and sucrose metabolism	OP166262(N/A)				N/A	
Starch and sucrose metabolism	OP169611(DPEP)	sp Q06801 DPEP_SOLTU	Q06801	2.4.1.25	DPEP	4-alpha-glucanotransferase, chloroplastic/amyloplastic
Starch and sucrose metabolism	OP170752(BGLU44)	sp Q9LV33 BGL44_ARATH	Q9LV33	3.2.1.21	BGLU44	Beta-glucosidase 44
Starch and sucrose metabolism	OP178383(TPS5)	sp O23617 TPS5_ARATH	O23617	2.4.1.15	TPS5	Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 5
Starch and sucrose metabolism	OP179564(At1g64390)	sp Q42059 GUN6_ARATH	Q42059	3.2.1.4	At1g64390	Endoglucanase 6
Starch and sucrose metabolism	OP179569(At1g64390)	sp Q42059 GUN6_ARATH	Q42059	3.2.1.4	At1g64390	Endoglucanase 6
Starch and sucrose metabolism	OP180730(N/A)	sp O04893 AGLU_SPIOL	O04893	3.2.1.20	N/A	Alpha-glucosidase
Starch and sucrose metabolism	OP193530(SPS)	sp P49031 SPSA_BETVU	P49031	2.4.1.14	SPS	Probable sucrose-phosphate synthase

Table S3. GO terms important during prickly pear fruit development.

#Term	ID transcript	Protein/Specie ID	Unirpt gene Id	EC	Gene	Protein
carbohydrate metabolic process	OP000318(N/A)				N/A	N/A
carbohydrate metabolic process	OP001310(PGMP)	sp Q9SM59 PGMP_PEA	Q9SM59	5.4.2.2	PGMP	Phosphoglucomutase, chloroplastic
carbohydrate metabolic process	OP001312(PGMP)	sp Q9M4G5 PGMP_SOLTU	Q9M4G5	5.4.2.2	PGMP	Phosphoglucomutase, chloroplastic
carbohydrate metabolic process	OP002961(CIT)	sp P49298 CISY_CITMA	P49298	2.3.3.16	CIT	Citrate synthase, mitochondrial
carbohydrate metabolic process	OP006394(BGLU12)	sp B8AVF0 BGL12_ORYSI	B8AVF0	3.2.1.21	BGLU12	Beta-glucosidase 12
carbohydrate metabolic process	OP011029(N/A)				N/A	N/A
carbohydrate metabolic process	OP013616(VIT_00031543001)	sp A7PQW3 E13B_VITVI	A7PQW3	3.2.1.39	VIT_00031543001	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase
carbohydrate metabolic process	OP017428(AGAL1)	sp Q9FT97 AGAL1_ARATH	Q9FT97	3.2.1.22	AGAL1	Alpha-galactosidase 1
carbohydrate metabolic process	OP021170(XK1)	sp Q8L794 XK1_ARATH	Q8L794	2.7.1.47	XK1	D-ribulose kinase
carbohydrate metabolic process	OP022243(Ar2g27500)	sp Q9ZQG9 E1314_ARATH	Q9ZQG9	3.2.1.39	Ar2g27500	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 14
carbohydrate metabolic process	OP025911(BG1)	sp Q9M2M0 BG1_ARATH	Q9M2M0	3.2.1.39	BG1	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase BG1
carbohydrate metabolic process	OP025913(N/A)				N/A	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase BG1
carbohydrate metabolic process	OP025915(N/A)				N/A	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase BG1
carbohydrate metabolic process	OP025916(N/A)				N/A	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase BG1
carbohydrate metabolic process	OP025918(N/A)				N/A	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase BG1
carbohydrate metabolic process	OP042491(LOG7)	sp Q8GW29 LOG7_ARATH	Q8GW29	3.2.2.n1	LOG7	Cytokinin riboside 5'-monophosphate phosphoribohydrolase LOG7
carbohydrate metabolic process	OP045906(PSL5)	sp Q9FN05 PSL5_ARATH	Q9FN05	3.2.1.84	PSL5	Probable glucan 1,3-alpha-glucosidase
carbohydrate metabolic process	OP050809(Ar1g11820)	sp O65399 E131_ARATH	O65399	3.2.1.39	Ar1g11820	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 1
carbohydrate metabolic process	OP052236(GLC1)	sp P52409 E13B_WHEAT	P52409	3.2.1.39	GLC1	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase
carbohydrate metabolic process	OP060704(OLE9)	sp Q94G86 ALL9_OLEEU	Q94G86	3.2.1.39	OLE9	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase
carbohydrate metabolic process	OP067566(HEXO3)	sp Q8L7S6 HEXO3_ARATH	Q8L7S6	3.2.1.52	HEXO3	Beta-hexosaminidase 3
carbohydrate metabolic process	OP067571(HEXO3)	sp Q8L7S6 HEXO3_ARATH	Q8L7S6	3.2.1.52	HEXO3	Beta-hexosaminidase 3
carbohydrate metabolic process	OP076511(LOC100243180)	sp A7PZL3 PGLR_VITVI	A7PZL3	3.2.1.15	LOC100243180	Probable polygalacturonase
carbohydrate metabolic process	OP076512(LOC100243180)	sp A7PZL3 PGLR_VITVI	A7PZL3	3.2.1.15	LOC100243180	Probable polygalacturonase
carbohydrate metabolic process	OP076516(LOC100243180)	sp A7PZL3 PGLR_VITVI	A7PZL3	3.2.1.15	LOC100243180	Probable polygalacturonase

carbohydrate metabolic process	OP091027(At3g47520)	sp Q9SN86 MDHP_ARATH	Q9SN86	1.1.1.37	At3g47520	Malate dehydrogenase, chloroplastic
carbohydrate metabolic process	OP093322(At2g27500)	sp Q9ZQG9 E1314_ARATH	Q9ZQG9	3.2.1.39	At2g27500	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 14
carbohydrate metabolic process	OP093323(At2g27500)	sp Q9ZQG9 E1314_ARATH	Q9ZQG9	3.2.1.39	At2g27500	Glucan endo-1,3-beta-glucosidase 14
carbohydrate metabolic process	OP094718(GPDHC1)	sp O22216 GPDHC_ARATH	O22216	1.1.1.8	GPDHC1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] GPDHC1, cytosolic
carbohydrate metabolic process	OP098961(N/A)	sp Q40784 AAPC_CENCI	Q40784	5.1.3.15	N/A	Putative glucose-6-phosphate 1-epimerase
carbohydrate metabolic process	OP098964(N/A)	sp Q40784 AAPC_CENCI	Q40784	5.1.3.15	N/A	Putative glucose-6-phosphate 1-epimerase
carbohydrate metabolic process	OP101199(GPDHC1)	sp O22216 GPDHC_ARATH	O22216	1.1.1.8	GPDHC1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)] GPDHC1, cytosolic
carbohydrate metabolic process	OP106880(UGD5)	sp Q2QS13 UGDH5_ORYSJ	Q2QS13	1.1.1.22	UGD5	UDP-glucose 6-dehydrogenase 5
carbohydrate metabolic process	OP113706(OLE9)	sp Q94G86 ALL9_OLEEU	Q94G86	3.2.1.39	OLE9	Glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase
carbohydrate metabolic process	OP115247(N/A)				N/A	N/A
carbohydrate metabolic process	OP117834(LOC100243180)	sp A7PZL3 PGLR_VITVI	A7PZL3	3.2.1.15	LOC100243180	Probable polygalacturonase
carbohydrate metabolic process	OP118935(SETH3)	sp Q9M1T1 SETH3_ARATH	Q9M1T1	5.3.1.13	SETH3	Probable arabinose 5-phosphate isomerase
carbohydrate metabolic process	OP129366(XTH32)	sp Q9S JL9 XTH32_ARATH	Q9S JL9	2.4.1.207	XTH32	Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 32
carbohydrate metabolic process	OP140249(N/A)	sp P49676 BGAL_BRAOL	P49676	3.2.1.23	N/A	Beta-galactosidase
carbohydrate metabolic process	OP161044(A6)	sp Q06915 EA6_ARATH	Q06915	3.2.1.39	A6	Probable glucan endo-1,3-beta-glucosidase A6
carbohydrate metabolic process	OP161076(BGAL3)	sp Q9SCV9 BGAL3_ARATH	Q9SCV9	3.2.1.23	BGAL3	Beta-galactosidase 3
carbohydrate metabolic process	OP164596(OsI_025867)	sp A2YNH4 6PGL2_ORYSI	A2YNH4	3.1.1.31	OsI_025867	Probable 6-phosphogluconolactonase 2
carbohydrate metabolic process	OP164598(PGL1)	sp Q9LMX8 6PGL1_ARATH	Q9LMX8	3.1.1.31	PGL1	Probable 6-phosphogluconolactonase 1
carbohydrate metabolic process	OP165749(CARSR12)	sp Q00662 BGAL_DIACA	Q00662	3.2.1.23	CARSR12	Putative beta-galactosidase
carbohydrate metabolic process	OP165751(CARSR12)	sp Q00662 BGAL_DIACA	Q00662	3.2.1.23	CARSR12	Putative beta-galactosidase
carbohydrate metabolic process	OP170752(BGLU44)	sp Q9LV33 BGL44_ARATH	Q9LV33	3.2.1.21	BGLU44	Beta-glucosidase 44
flavonoid biosynthetic process	OP000217(CHI)	sp Q45QI7 CFI_CAMSI	Q45QI7	5.5.1.6	CHI	Chalcone--flavanone isomerase
flavonoid biosynthetic process	OP031150(N/A)				N/A	N/A
flavonoid biosynthetic process	OP033464(DTX35)	sp F4JTB3 DTX35_ARATH	F4JTB3	#N/D	DTX35	Protein DETOXIFICATION 35
flavonoid biosynthetic process	OP040720(CYP75B2)	sp Q9SBQ9 F3PH_PETHY	Q9SBQ9	1.14.14.82	CYP75B2	Flavonoid 3'-monooxygenase
flavonoid biosynthetic process	OP095543(FHT)	sp Q7XZQ7 FL3H_PETCR	Q7XZQ7	1.14.11.9	FHT	Flavanone 3-dioxygenase
flavonoid biosynthetic process	OP103588(N/A)	sp H2DH18 C7A12_PANGI	H2DH18	1.14.-.-	N/A	Cytochrome P450 CYP736A12

flavonoid biosynthetic process	OP129445(HO1)	sp Q69XJ4 HMOX1_ORYSJ	Q69XJ4	1.14.14.18	HO1	Heme oxygenase 1, chloroplastic
flavonoid biosynthetic process	OP134988(N/A)				N/A	N/A
flavonoid biosynthetic process	OP134989(N/A)				N/A	N/A
flavonoid biosynthetic process	OP160423(CYP98A2)	sp O48922 C98A2_SOYBN	O48922	1.14.-.-	CYP98A2	Cytochrome P450 98A2
flavonoid biosynthetic process	OP196474(N/A)				N/A	N/A
glucose metabolic process	OP046817(G6PDH)	sp P37830 G6PD_SOLTU	P37830	1.1.1.49	G6PDH	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, cytoplasmic isoform
glucose metabolic process	OP086471(N/A)				N/A	Galactose mutarotase
glucose metabolic process	OP086472(GALM)	sp Q5EA79 GALM_BOVIN	Q5EA79	5.1.3.3	GALM	Galactose mutarotase
glucose metabolic process	OP086473(N/A)				N/A	Galactose mutarotase
glucose metabolic process	OP113839(GAPA)	sp P19866 G3PA_SPIOL	P19866	1.2.1.13	GAPA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic
glucose metabolic process	OP113840(GAPB)	sp P12860 G3PB_SPIOL	P12860	1.2.1.13	GAPB	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B, chloroplastic
glucose metabolic process	OP113842(GAPA)	sp P19866 G3PA_SPIOL	P19866	1.2.1.13	GAPA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A, chloroplastic
glucose metabolic process	OP146929(G6PD)	sp Q43793 G6PDC_TOBAC	Q43793	1.1.1.49	G6PD	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase, chloroplastic
glucose metabolic process	OP169611(DPEP)	sp Q06801 DPEP_SOLTU	Q06801	2.4.1.25	DPEP	4-alpha-glucanotransferase, chloroplastic/amyloplastic
glucose metabolic process	OP175145(VTC2)	sp Q8RWE8 GGAP1_ARATH	Q8RWE8	2.7.7.69	VTC2	GDP-L-galactose phosphorylase 1
sucrose metabolic process	OP028592(INV*DC4)	sp P80065 INVB_DAUCA	P80065	3.2.1.26	INV*DC4	Beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I
sucrose metabolic process	OP028593(INV*DC4)	sp P80065 INVB_DAUCA	P80065	3.2.1.26	INV*DC4	Beta-fructofuranosidase, soluble isoenzyme I
sucrose metabolic process	OP031107(N/A)	sp P21616 AVP_VIGRR	P21616	7.1.3.1	N/A	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump
sucrose metabolic process	OP031108(N/A)	sp P21616 AVP_VIGRR	P21616	7.1.3.1	N/A	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump
sucrose metabolic process	OP048062(SS)	sp P13708 SUS_SOYBN	P13708	2.4.1.13	SS	Sucrose synthase
sucrose metabolic process	OP057605(N/A)	sp Q03411 SUT_SPIOL	Q03411	N/A	N/A	Sucrose transport protein
sucrose metabolic process	OP057606(N/A)	sp Q03411 SUT_SPIOL	Q03411	N/A	N/A	Sucrose transport protein
sucrose metabolic process	OP082556(N/A)	sp Q03411 SUT_SPIOL	Q03411	N/A	N/A	Sucrose transport protein
sucrose metabolic process	OP082557(N/A)	sp Q03411 SUT_SPIOL	Q03411	N/A	N/A	Sucrose transport protein
sucrose metabolic process	OP082558(N/A)	sp Q03411 SUT_SPIOL	Q03411	N/A	N/A	Sucrose transport protein
sucrose metabolic process	OP089913(CFBP1)	sp P25851 F16P1_ARATH	P25851	3.1.3.11	CFBP1	Fructose-1,6-bisphosphatase 1, chloroplastic

sucrose metabolic process	OP161877(SUC3)	sp O80605 SUC3_ARATH	O80605	N/A	SUC3	Sucrose transport protein SUC3
---------------------------	----------------	----------------------	--------	-----	------	--------------------------------

V. TRANSCRIPTÓMICA DURANTE EL DESARROLLO DE FRUTOS DE *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber

5.1. Resumen

El fruto de *Opuntia joconostle*, conocido como xoconostle, es un fruto ácido utilizado en la cocina mexicana y para elaborar diversos productos (jaleas, dulces y bebidas), el cual contiene compuestos benéficos para la salud (azúcares, fibra, polifenoles, carotenoides, entre otros). Se realizó un análisis transcriptómico durante el desarrollo de frutos de *Opuntia joconostle* para comprender los procesos involucrados en su metabolismo. Se obtuvieron alrededor de 573 millones de lecturas, un ensamble del transcriptoma de 159,783 transcritos, un ensamble representativo de 141,187 transcritos y se anotaron 32,924 secuencias de proteínas contra la base de datos de SwissProt. Se identificaron un total de 501 transcritos expresados diferencialmente (DET) entre las etapas 60 días después de antesis (T3) e inicio de maduración (T4) y 388 DET entre las etapas 60 días después de antesis (T3) y fruto maduro (T5). Se detectaron genes sobreexpresados en T3 y subexpresados en T4 y T5 en las vías: Metabolismo del almidón y la sacarosa (AGPS1, TPS5, AMY3, DPEP, DPE2, SS y SS4), Metabolismo del piruvato (PPD, PPCA, MD1, IPMSA, y accD), Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato (MD1, rbcL, FdGOGAT, ACO3, SHM7, GDCSP y AAE3) y Biosíntesis de metabolitos secundarios (TYDC2, PGH1, IPMSA, GDCSP, AGPS1, SHM7, NPC6, HMGR1, MD1, CHS, PFK7, VTC2, SS4, ACO3, DPE2, AGT2, PGM1, TKT2, DPEP, PFP-BETA1, SS, accD, GAPC2, rbcL, PER42 y PER72), de los cuales CHS participa en la biosíntesis de flavonoides. Los resultados pueden ser utilizados para estudios genéticos y moleculares sobre el género *Opuntia* y con ello comprender mejor su biología.

Palabras clave: xoconostle, transcriptómica, genes, metabolitos secundarios, flavonoides.

5.2. Abstract

The fruit of *Opuntia joconostle*, known as xoconostle, is an acidic fruit used in Mexican cuisine and to make various products (jellies, sweets and drinks), which contains compounds beneficial to health (sugars, fiber, polyphenols, carotenoids, among others). Transcriptomic analysis was performed during *Opuntia joconostle* fruit development to understand the processes involved in its metabolism. About 573 million reads were obtained, a transcriptome assembly of 159,783 transcripts, a representative assembly of 141,187 transcripts, and 32,924 protein sequences were annotated against the SwissProt database. A total of 501 differentially expressed transcripts (DET) were identified between the stages 60 days after anthesis (T3) and onset of ripening (T4) and 388 DETs between the stages 60 days after anthesis (T3) and ripe fruit (T5). In general, genes overexpressed in T3 and underexpressed in T4 and T5 were detected for the Starch and Sucrose Metabolism pathways (AGPS1, TPS5, AMY3, DPEP, DPE2, SS and SS4), Pyruvate metabolism (PPD, PPCA, MD1, IPMSA, and accD), Glyoxylate and dicarboxylate metabolism (MD1, rbcL, FdGOGAT, ACO3, SHM7, GDCSP and AAE3) and Biosynthesis of secondary metabolites (TYDC2, PGH1, IPMSA, GDCSP, AGPS1, SHM7, NPC6, HMGR1, MD1, CHS, PFK7, VTC2, SS4, ACO3, DPE2, AGT2, PGM1, TKT2, DPEP, PFP-BETA1, SS, accD, GAPC2, rbcL, PER42 and PER72), of which CHS participates in flavonoid biosynthesis. The results can be used for genetic and molecular studies on the *Opuntia* genus and thus better understand its biology.

Keywords: xoconostle, transcriptomics, genes, secondary metabolites, flavonoids.

5.3. Introducción

Opuntia es un género perteneciente a la familia de las cactáceas del cual se han reportado entre 150 (Stuppy, 2002), 180 especies (Hunt et al., 2006) y hasta 300 especies reconocidas (Mendez-Llorente et al., 2011), muchas de ellas distribuidas en México. Las especies de *Opuntia* producen frutos dulces (tunas) o ácidos (xoconostle), que crecen en climas áridos y semiáridos, siendo considerados alimentos valiosos en América Latina (Morales et al., 2012).

El fruto de *Opuntia joconostle*, conocido como xoconostle, se utiliza en la cocina mexicana, y en la elaboración de jaleas, dulces y bebidas; tiene un pericarpio de color rojo rosado claro, un mesocarpio succulento de color amarillo rosado, y un endocarpio de color rojo intenso que contiene pequeñas semillas de color marrón (Osorio-Esquivel et al., 2011). Contiene azúcares, fibra dietética, ácido ascórbico, polifenoles, carotenoides y pigmentos de betacianina, que se han relacionado con beneficios para la salud (Osorio-Esquivel et al., 2011, Paiz et al., 2010, Pimienta-Barrios et al., 2008).

El crecimiento, desarrollo, maduración y senescencia del fruto están influenciados por factores genéticos, epigenéticos, hormonales y ambientales (Chen et al., 2022; Seymour et al., 2013). La transcriptómica a través del análisis RNA-seq es un enfoque poderoso para estudiar los genes expresados durante el crecimiento, desarrollo, maduración y senescencia de frutos (Li et al., 2022; Trapnell et al., 2013). El análisis transcriptómico durante la maduración del fruto de xoconostle proporciona una ventana para comprender los mecanismos moleculares que regulan este proceso, lo que permite identificar los genes y vías metabólicas involucrados en la síntesis de compuestos como azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, antioxidantes y otros metabolitos secundarios importantes para el desarrollo del sabor y la calidad nutricional del fruto.

5.4. Materiales y métodos

Muestreo y evaluación morfológica

El muestreo de frutos de *Opuntia joconostle* fue realizado de abril a agosto del 2022 en huertos comerciales de 6 años de establecidos en el municipio de San Martín de las Pirámides, Estado de México (19° 41' 59.9" N 98° 48' 31.6" W). Se seleccionaron tres plantas de buen fenotipo y libres de daños causados por factores bióticos o abióticos. Para la extracción de ARN se seleccionaron frutos sanos de tres plantas independientes durante cinco etapas del desarrollo (T1: antesis, T2: 30 días después de antesis, T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de la maduración del fruto y T5: fruto maduro (Figura 2). De cada etapa se recolectaron 3 muestras, cada muestra consistió en tres frutos de una planta. Los frutos fueron desprendidos de los cladodios y se transportaron en una hielera. En el laboratorio los frutos se lavaron con agua y detergente Extran marca Merck (utilizado de acuerdo con las indicaciones del fabricante), el último enjuague se realizó con agua destilada para eliminar el detergente por completo. Se realizaron cortes longitudinales de los frutos con un bisturí, los cuales fueron envueltos en papel aluminio y conservados en nitrógeno líquido hasta su uso.

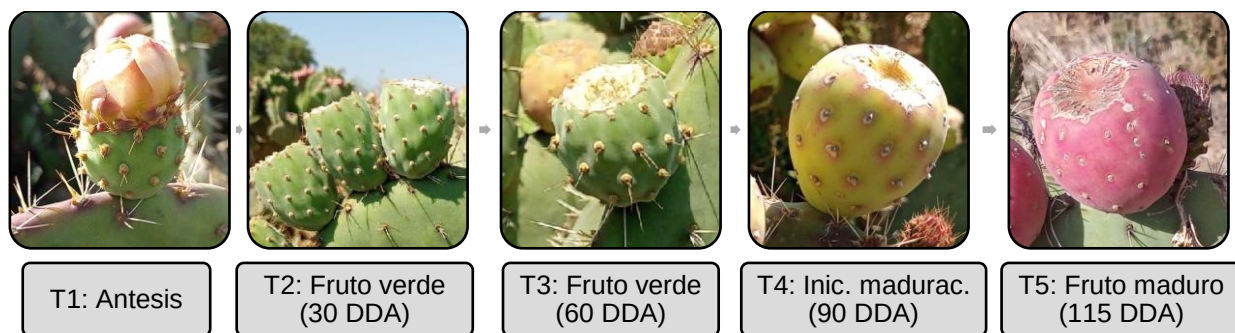


Figura 2: Fenología del desarrollo y maduración de frutos de xoconostle (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber).

Fuente: Elaboración propia.

Adicionalmente, se recolectaron 25 frutos de cada etapa de desarrollo para la evaluación morfológica, a los cuales se les midió el peso fresco total (g), peso fresco de cáscara (g), peso fresco de lóculo (g), diámetro ecuatorial (cm), diámetro polar (cm) y volumen (cm³); los pesos frescos se midieron con una balanza digital (Santorius, modelo PT1200, precisión de 0.01 g), el diámetro ecuatorial y polar se midieron con un vernier y el volumen con una probeta por desplazamiento de agua destilada. Se realizó análisis de varianza (ANOVA) utilizando un diseño completamente al azar donde el tiempo fue la fuente de variación. También se realizaron pruebas de comparación de medias de Tukey (0.05), éstos fueron hechos con el complemento de Excel XLSTAT (Addinsoft, 2019).

Obtención y secuenciación de ARN

Se utilizaron frutos de 5 etapas del desarrollo del fruto (T1, T2, T3, T4 y T5) para la extracción de ARN. Se maceraron 3 g de tejido total de cada muestra (compuesta de cortes de 3 frutos) en un mortero estéril utilizando nitrógeno líquido. El ARN total se extrajo con el reactivo Trizol™ (Invitrogen, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por cada muestra se obtuvieron 3 repeticiones. La concentración de ARN de cada muestra se determinó en un espectrofotómetro Nanodrop UVS-99 UVISDrop.

Las librerías fueron sintetizadas con el kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit, el tipo de secuenciador utilizado fue de la plataforma Illumina, el tipo de lectura fue secuenciación de extremos por pares y la longitud de lecturas de 101 pb.

Filtrado de datos y ensamble de novo

El análisis del control de calidad de lecturas sin procesar se realizó con las herramientas FastQC v0.72 (Andrews, 2012) y MultiQC v1.9 (Ewels et al., 2016).

La calidad de las lecturas se mejoró eliminando lecturas de baja calidad (puntuación de calidad phred < 30) y lecturas cortas (longitud < 60 pb) utilizando el programa Trimmomatic v0.38.0 (Bolger, et al., 2014).

Debido a que no se cuenta con un genoma de referencia para el género *Opuntia*, se realizó el ensamble de las secuencias de transcripción (transcriptoma *de novo*) de las lecturas de las librerías T3, T4 y T5 con la herramienta Trinity v2.9.1. aplicando los parámetros predeterminados y una longitud de contig de 200 pb (Grabherr et al., 2011). El ensamble representativo se obtuvo con CD-HIT-EST v1.3. (Fu et al., 2012) utilizando un umbral de similitud del 98 % para eliminar posibles transcritos duplicados. Para la evaluación de la calidad del ensamblaje del transcriptoma se utilizó el programa Busco v5.3.2 (Simão et al., 2015), el cual se comparó con 425 genes del linaje Viridiplantae (plantas verdes y algas terrestres). Lo anterior fue analizado en la plataforma web de Galaxy usegalaxy.org/ (Afgan et al., 2018).

Anotación funcional

Para identificar regiones de codificación (con al menos 100 aminoácidos) dentro de las secuencias de los transcritos, se utilizó la herramienta TransDecoder v5.5.0 (Haas et al., 2013) y el ensamble representativo. El ensamble *de novo*, y las secuencias peptídicas (resultado de Transdecoder) fueron alineadas contra la base de datos de SwissProt, (567483 secuencias) (The UniProt Consortium 2021) utilizando Diamond Blastp y Diamond Blastx con un valor e-value menor a 10^{-3} . Así mismo, EggNOG v5.0 (Huerta-Cepas et al., 2019) (<http://eggnoG-mapper.embl.de/>), fue utilizada para anotar el ensamble, esta herramienta utiliza grupos ortólogos (OGs) precalculados y filogenias de la base de datos EggNOG para transferir información funcional de datos detallados, en el cual se obtuvieron GO term, Enzyme Commission (EC), KEGG-Ko (funciones moleculares representadas en términos de ortólogos funcionales), KEGG-pathway (colección

de mapas de rutas que representan el conocimiento de las redes de interacción, reacción y relación molecular), se utilizó el resultado de péptidos de TransDecoder como archivo de entrada y los parámetros predeterminados por el programa.

Expresión diferencial, ortología de genes (GO) y análisis KEEG

Para estimar la abundancia de isoformas y genes se utilizó la herramienta Align Reads and Estimate Abundance v2.9.1, las estimaciones de abundancia de las muestras fueron combinadas en un solo archivo con la herramienta Build Expression Matrix v2.9.1 (Grabherr et al., 2011). Para determinar los genes diferencialmente expresados entre los tres tiempos de maduración del fruto se utilizó el programa Limma v3.48.0 (Law et al., 2014), se evaluaron comparaciones por pares: (T3) vs (T4), (T3) vs (T5) y (T4) vs (T5). Los transcritos expresados diferencialmente (DET) con $|\log FC| > 2$ y con P-value ajustado < 0.01 se analizaron en KOBAS-I (Bu et al. 2021) (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) para identificar vías KEGG y términos GO enriquecidos significativamente [e-value ≤ 0.0001], utilizando como base de datos de comparación el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Los términos GO fueron clasificados en la plataforma REVIGO (Supek et al., 2011).

Se extrajeron y exploraron los genes DET en las vías del metabolismo de carbohidratos: metabolismo del almidón y la sacarosa, metabolismo del piruvato, metabolismo del glioxilato y dicarboxilato y metabolismo de fructosa y manosa; las vías biosíntesis de metabolitos secundarios y biosíntesis de flavonoides; así como los términos GO proceso biosintético de etileno y respuesta al etileno. Los gráficos de mapa de calor se realizaron con la herramienta Heatmap2 Version 3.1.1 (Liaw et al., n.d.) en Galaxy para mapear los DET sobre los tres estadios del fruto en las bibliotecas utilizando la transformación Z de los valores normalizados de TMM.

5.5. Resultados

Muestreo y evaluación morfológica

En la etapa de antesis (T1) el fruto presentó un color verde y sus flores pétalos amarillos y sépalos rosas, así como abundante número de espinas, el lóculo representó el 38.25 % del peso total del fruto y la cáscara no se separa del lóculo. En la etapa 30 días después de antesis (T2) el fruto presentó color verde, la flor se ha desprendido por completo del fruto, el peso del lóculo representó el 33.35 % del peso total y la cáscara no se separa del lóculo. En la etapa 60 días después de antesis (T3), el fruto fue de color verde, el peso del lóculo fue 33.35 % con respecto al peso total y la cáscara no se separa del lóculo. En la etapa de inicio de maduración (T4) el fruto tuvo un color verde/amarillo, el peso del lóculo correspondió al 26.77 % del peso total. En la etapa de fruto maduro (T5) presentó un color amarillo, el peso del lóculo representó en 25.53 % del peso total.

El ANOVA realizado indicó que hubo diferencias estadísticas significativas en las variables morfológicas evaluadas en función de la etapa de desarrollo. El fruto registró un aumento continuo de tamaño, que en T5 alcanzó diámetro polar de 6.25 cm, un diámetro ecuatorial de 4.97 cm y un volumen de 82.07 cm³. A partir de la etapa T3 el peso de la cáscara aumentó de manera acelerada, mientras que el peso de lóculo tuvo la misma tendencia de crecimiento de T1 a T5. (Figura 3).

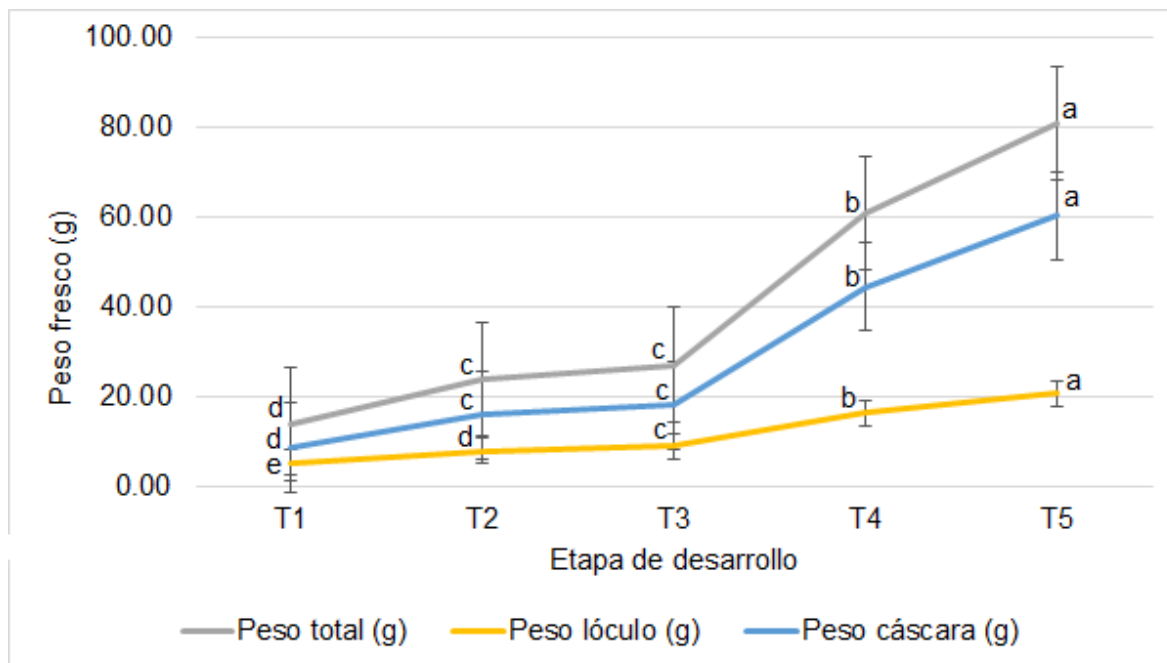


Figura 3: Cambios en peso fresco de lóculo, de cáscara y total durante el desarrollo de frutos de *Opuntia joconostle* F.A.C. Weber. (T1: antesis, T2: 30 DDA, T3: 60 DDA, T4: inicio de la maduración y T5: fruto maduro). Medias con distinta letra son significativamente diferentes (Tukey, $P=0.05$).

Fuente: Elaboración propia

Filtrado de datos y ensamble *de novo*

Tomando en cuenta las librerías de los frutos de 60 días después de antesis (T3), frutos en inicio de maduración (T4) y frutos maduros (T5) de *Opuntia joconostle*, se obtuvieron 573,720,670 lecturas de extremos emparejados sin procesar con una longitud de 101 pb. El número de lecturas sin procesar osciló entre 61,024,782 (librería T5R1) y 86,938,290 (librería T5R3) (Cuadro 1). Los archivos de secuencia crudas se cargaron en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) con los números de acceso de BioProject PRJNA932849 (SRX19315968-76).

Una vez realizado el control de calidad (puntuación Phred > 30), sobrevivieron 503,758,622 (87.80 %) lecturas de alta calidad, que van desde 53,623,464

(librería T5R1) hasta 75,743,400 lecturas (librería T5R3); el porcentaje promedio de lecturas duplicadas fue de 87.59 %, y osciló entre 79.3% (biblioteca T5R1) y 90.90% (biblioteca T3R3) (Cuadro 1).

Cuadro 1: Estadísticas de datos crudos y limpios de RNA-seq de lecturas de *Opuntia joconostle*.

Librería	Datos crudos			Datos limpios			
	Total lecturas	GC (%)	Q30 (%)	Total lecturas	GC (%)	Q30 (%)	Duplicación (%)
T3R2	63,480,520	54.80	93.00	54,271,954	54.00	100	97.45
T3R3	68,400,920	53.60	93.70	59,582,358	53.00	100	96.90
T4R1	64,593,552	45.20	93.80	56,617,592	45.00	100	80.75
T4R2	63,936,402	45.40	94.50	57,123,288	45.00	100	84.15
T4R3	83,871,622	45.60	94.20	74,162,318	45.00	100	88.45
T5R1	61,024,782	46.60	93.80	53,623,464	46.50	100	79.30
T5R2	81,474,582	48.00	94.40	72,634,248	47.50	100	87.70
T5R3	86,938,290	46.80	93.60	75,743,400	46.50	100	86.05
	573,720,670	48.25	93.88	503,758,622	47.81	100.00	87.59

Fuente: elaboración propia

El ensamble del transcriptoma *de novo* de *Opuntia joconostle* realizado con Trinity produjo 159,783 transcritos. El ensamble representativo utilizando CD-HIT-EST para eliminar duplicados y agrupar secuencias representativas dio como resultado 141,187 transcritos; donde el contenido de GC fue del 42.97 %, la longitud media de los transcritos fue de 824 pb, el N50 fue de 1270 pb y el rango de longitud de los transcritos osciló entre 185 a 11327 pb.

La tasa de alineación general con el software Align Reads and Estimate Abundance osciló entre 94.25 (T3R2) y 97.69 % (T5R1) con un promedio de 96.82 %, la cual nos indica una buena calidad del ensamble. El programa Busco

reveló la presencia 81.7 % de 425 genes ortólogos (correspondientes a 57 especies) de la base de datos viridiplantae; de los cuales 347 genes ortólogos estaban completos (129 de copia única y 218 duplicados), además de 66 fragmentados y no se informó de ningún gen ortólogo faltante; lo anterior nos indica una buena calidad del ensamble.

Anotación funcional

El uso del programa Transdecoder para predecir regiones de codificación dio como resultado 88,066 PEP y 257,947 marcos de lectura abierta (ORF). Al realizar el análisis Blastp se detectaron 32,924 secuencias (30,882 de plantas), mientras que con Blastx se identificaron 22,458 secuencias (20,243 de plantas). Así mismo, se detectaron 20,388 transcritos que estaban presentes tanto en Blastx como en Blastp (Figura 4A). Las especies de plantas más representadas en Blastp fueron: *Arabidopsis thaliana* (72.71 %), *Oryza sativa* subsp. japonica (4.47 %), *Nicotiana tabacum* (1.27 %), *Solanum lycopersicum* (1.25%), *Spinacia oleracea* (1.23 %), *Oryza sativa* subsp. indica (1.07 %), *Solanum tuberosum* (0.74 %) y *Glycine max* (0.70 %). Al eliminar isoformas se identificaron 12,092 y 13,310 genes a partir de datos de Blastx y Blastp, de los cuales 11,063 fueron compartidos entre ambas bases (Figura 4B).

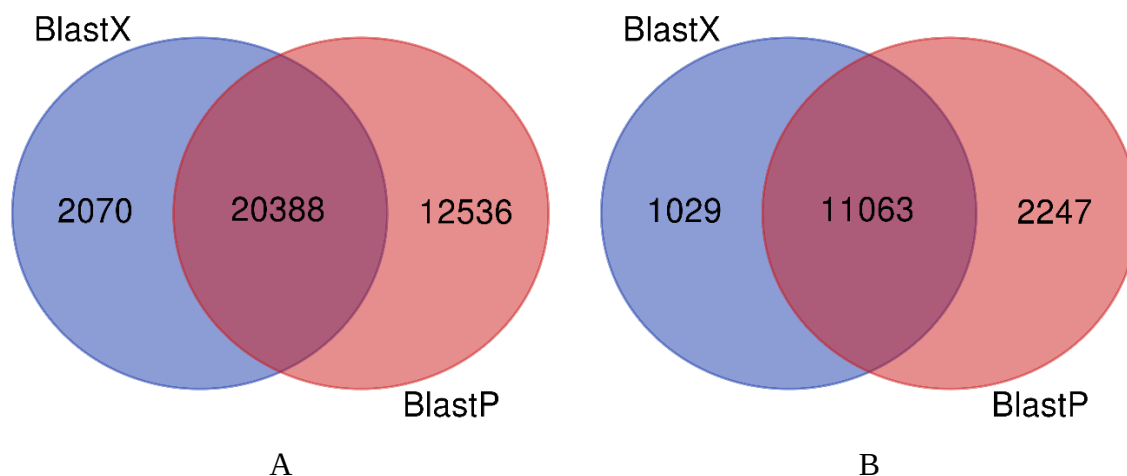


Figura 4: A) Diagrama de Venn con el número de transcritos anotados con Diamond BlastX y BlastP contra la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot. B) Diagrama de Venn con el número de genes anotados con Diamond BlastX y BlastP.

El análisis realizado en EggNOG-mapper indicó que 29,280 transcritos estaban asociados con al menos un término GO y 18,260 transcritos con al menos una vía KEGG. En general, se identificaron un total de 13,373 términos GO (26.24% del total de 43,335 en la base de datos GO). Además, se identificaron un total de 395 rutas del mapa KEGG (70.36% del total de 560 rutas en la base de datos KEGG) y 3,967 KO (15.55% del total de 25,503 en la base de datos KEGG Orthology).

Expresión diferencial, ortología de genes (GO) y análisis KEEG

Se realizó el análisis de los transcritos expresados diferencialmente (DET) con $\log$ absoluto > 2 y P-value ajustado = 0.01 utilizando las lecturas alineadas al transcriptoma ensamblado de novo. Se identificaron un total de 501 DET entre T3 y T4, de los cuales 451 transcritos estuvieron sobreexpresados y 50 bajoexpresados. Para la comparación del T3 frente al T5 se identificaron 388

DET, con 349 transcritos regulados significativamente al alza y 39 transcritos regulados a la baja. Entre T4 y T5, no se detectaron transcritos expresados diferencialmente.

Se determinó la anotación funcional a partir de DET utilizando el enriquecimiento KOBAS de las vías KEGG y los términos GO.

Para T3 vs T4, 10 vías KEGG (Cuadro 2) y 32 términos GO se enriquecieron significativamente (valor de P corregido < 0,01), donde tres vías KEGG corresponden al Metabolismo de carbohidratos y los términos GO se clasifican como proceso biológico (PB, 15), componente celular (CC, 10) y función molecular (FM, 7). Los términos GO más enriquecidos fueron: citosol (CC), enlace proteico (FM), plasmodesma (CC), respuesta a la privación de agua (PB), membrana de plasma (CC), respuesta al frío (PB), citoplasma (CC), proceso metabólico del piruvato (PB) y vacuola (CC).

En la comparación T3 vs T5, 7 vías KEGG (Cuadro 2) y 17 términos GO se enriquecieron significativamente, (valor de P corregido < 0,01), dos vías KEGG se clasifican como Metabolismo de carbohidratos y los términos GO corresponden a proceso biológico (PB, 6), componente celular (CC, 9) y función molecular (FM, 2). Los términos GO más enriquecidos fueron: plasmodesma (CC), respuesta a la privación de agua (PB), citosol (CC), respuesta al frío (PB), estrómulos (CC), membrana de plasma (CC), proceso metabólico del piruvato (PB) y aparato de Golgi (CC).

Cuadro 2: Vías KEGG enriquecidas para *Opuntia joconostle*

T3 VS T4	P-Value corregido	T3 VS T5	P-Value corregido
Vías metabólicas	4.65E-21	Fosforilación oxidativa	7.44E-24
Fosforilación oxidativa	1.74E-20	Vías metabólicas	8.11E-24
Fijación de carbono en organismos fotosintéticos	6.40E-08	Fijación de carbono en organismos fotosintéticos	2.90E-09

Metabolismo del carbono	5.51E-07	Fotosíntesis	6.83E-09
Fotosíntesis	1.03E-05	Metabolismo del carbono	1.32E-06
Metabolismo del piruvato	2.05E-05	Metabolismo del piruvato	1.90E-05
Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato	0.000486737	Metabolismo del almidón y la sacarosa	0.00684301
Ritmo circadiano - planta	0.000489206		
Metabolismo del almidón y la sacarosa	0.002282317		
Biosíntesis de metabolitos secundarios	0.005504862		

Se analizaron las vías KEGG que son importantes durante el desarrollo del fruto de tuna, tales como las vías del metabolismo de los carbohidratos (metabolismo del almidón y la sacarosa, metabolismo del piruvato, metabolismo de glioxilato y dicarboxilato y metabolismo de la fructosa y manosa) y biosíntesis de flavonoides, los cuales se describen a continuación:

Vías del metabolismo de carbohidratos

En la vía del metabolismo del almidón y la sacarosa para *O. joconostle* los genes detectados tuvieron una sobreexpresión en T3 y bajoexpresión en T4 y T5:

AGPS1 (OJ008774), TPS5 (OJ035305, OJ066008), AMY3 (OJ064155), DPEP (OJ102951), DPE2 (OJ024560), SS (OJ015086) y SS4 (OJ085867) (Figura 5).

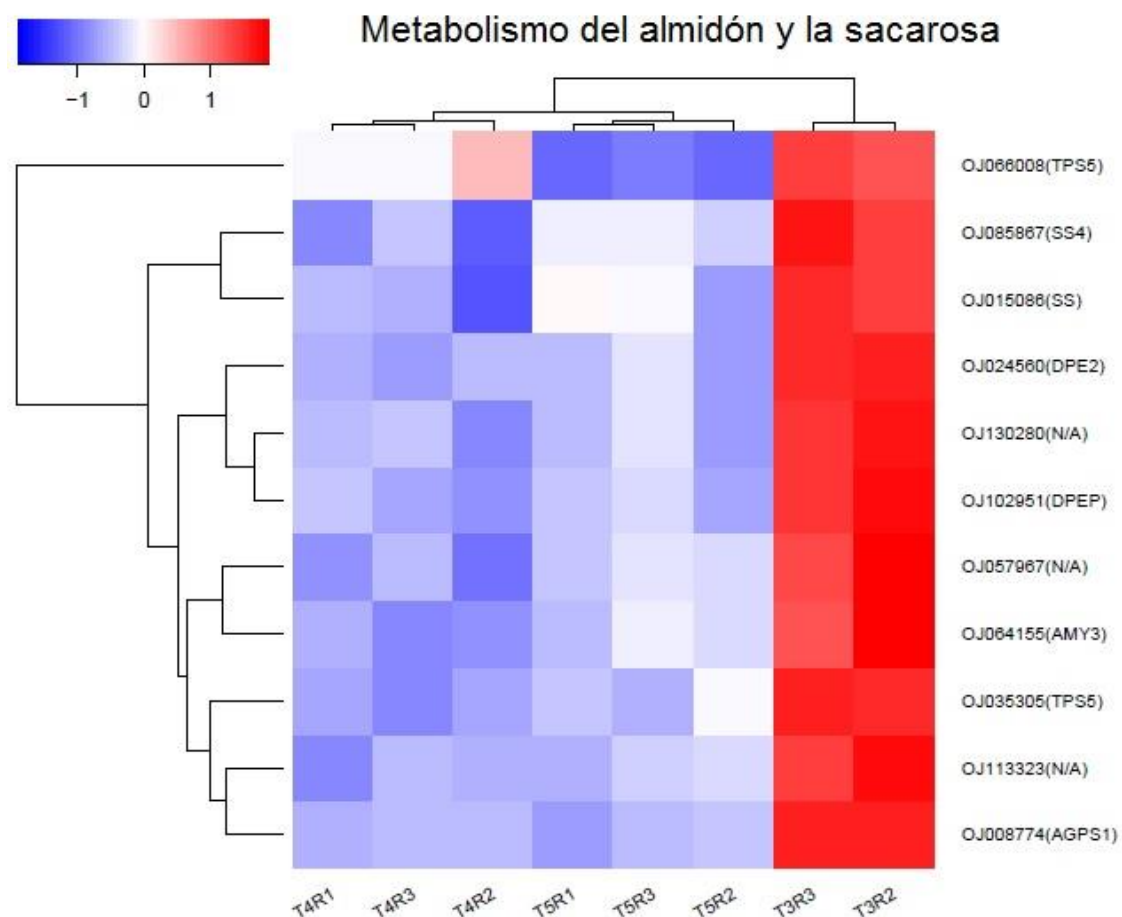


Figura 5: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del almidón y la sacarosa del desarrollo de fruto de *O. joconostle* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

En la vía del metabolismo del piruvato, los genes detectados para *O. joconostle* (Figura 6) tuvieron alta expresión en T3 y baja expresión en T4 y T5: PPD (OJ094593, OJ020915), PPCA (OJ064251, OJ030086), MD1 (OJ023352), IPMSA (OJ094858) y accD (OJ011872).

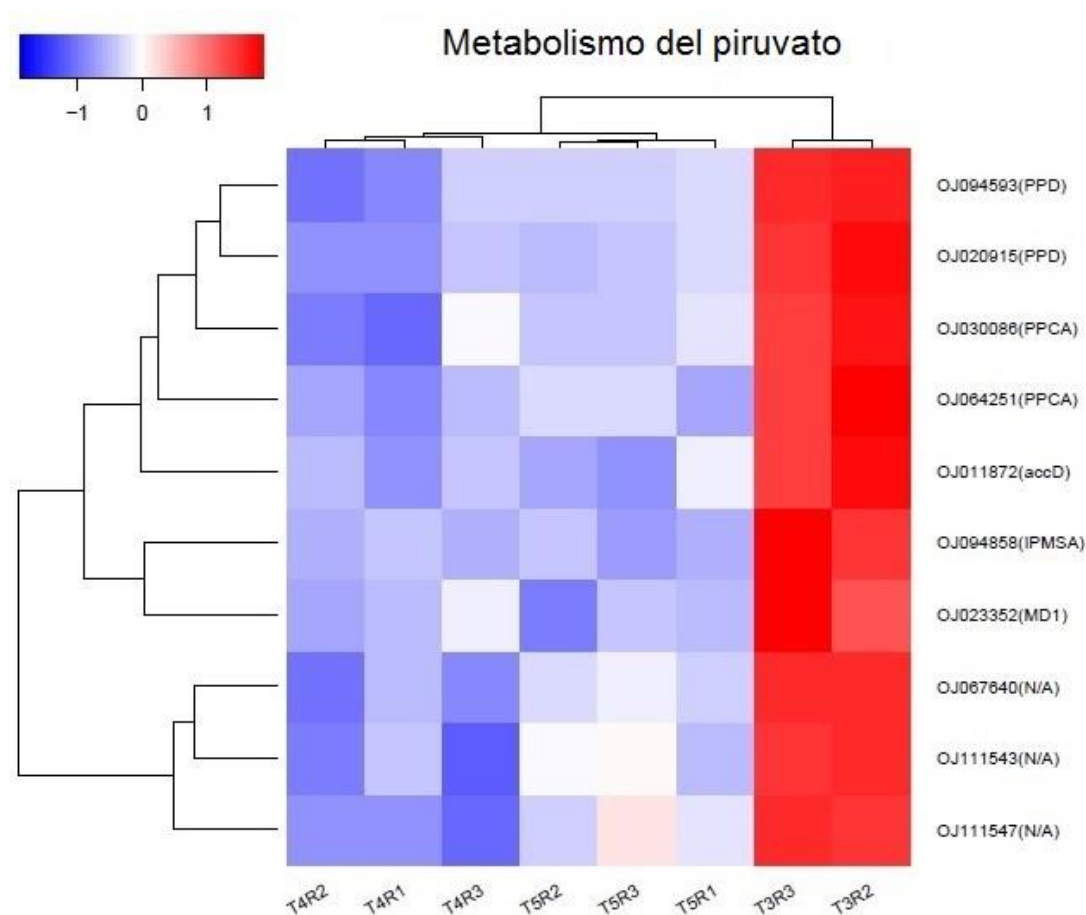


Figura 6: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del piruvato del desarrollo de fruto de *O. joconostle* (T3: 60 días después de anthesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos

Fuente: Elaboración propia.

En la vía del metabolismo de glioxilato y dicarboxilato, los genes cuantificados tuvieron alta expresión en T3 y baja expresión en T4 y T5: MD1 (OJ023352), rbcL (OJ051779, OJ051780), FdGOGAT (OJ056928), ACO3 (OJ131101), SHM7 (OJ097124), GDCSP (OJ060512) y AAE3 (OJ024149) (Figura 7). De manera similar, en la vía del metabolismo de fructosa y manosa, únicamente se encontraron dos genes cuya expresión fue alta en T3 y baja en T4 y T5 (PFP-BETA1 y PFK7).

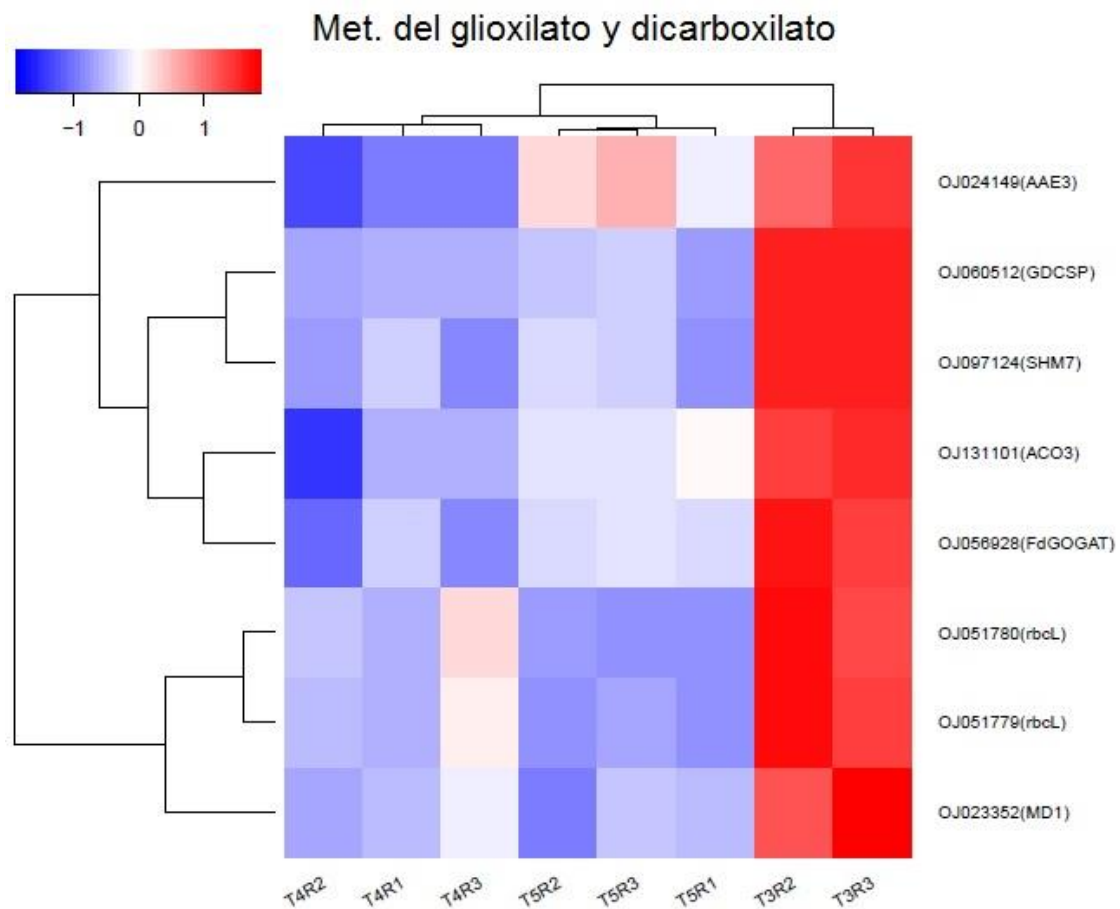


Figura 7: Mapa de calor de la vía KEGG Metabolismo del glioxilato y dicarboxilato del desarrollo de fruto de *O. joconostle* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

Vías biosíntesis de metabolitos secundarios y biosíntesis de flavonoides

En la vía de biosíntesis de metabolitos secundarios la mayor parte de los genes tuvieron sobreexpresión en T3 y bajoexpresión en T4 y T5: TYDC2 (OJ030707), PGH1 (OJ117577), IPMSA (OJ094858), GDCSP (OJ060512), AGPS1 (OJ008774), SHM7 (OJ097124), NPC6 (OJ117046), HMGR1 (OJ077591), MD1 (OJ023352), CHS (OJ127439), PFK7 (OJ120805), VTC2 (OJ066419), SS4 (OJ085867), ACO3 (OJ131101), DPE2 (OJ024560), AGT2 (OJ082765), PGM1

(OJ090803), TKT2 (OJ064647), DPEP (OJ102951), PFP-BETA1 (OJ103241), SS (OJ115407), accD (OJ011872), GAPC2 (OJ052865), rbcL (OJ051779, OJ051780), PER42 (OJ116320) y PER72 (OJ135349); y únicamente el gen PDC2 (OJ094505) tuvo baja expresión en T3 y alta expresión en T4 y T5 (Figura 8). En la vía de biosíntesis de flavonoides para *O. joconostle* solo el gen CHS (OJ127439) tuvo alta expresión en T3 y baja expresión en T4 y T5.

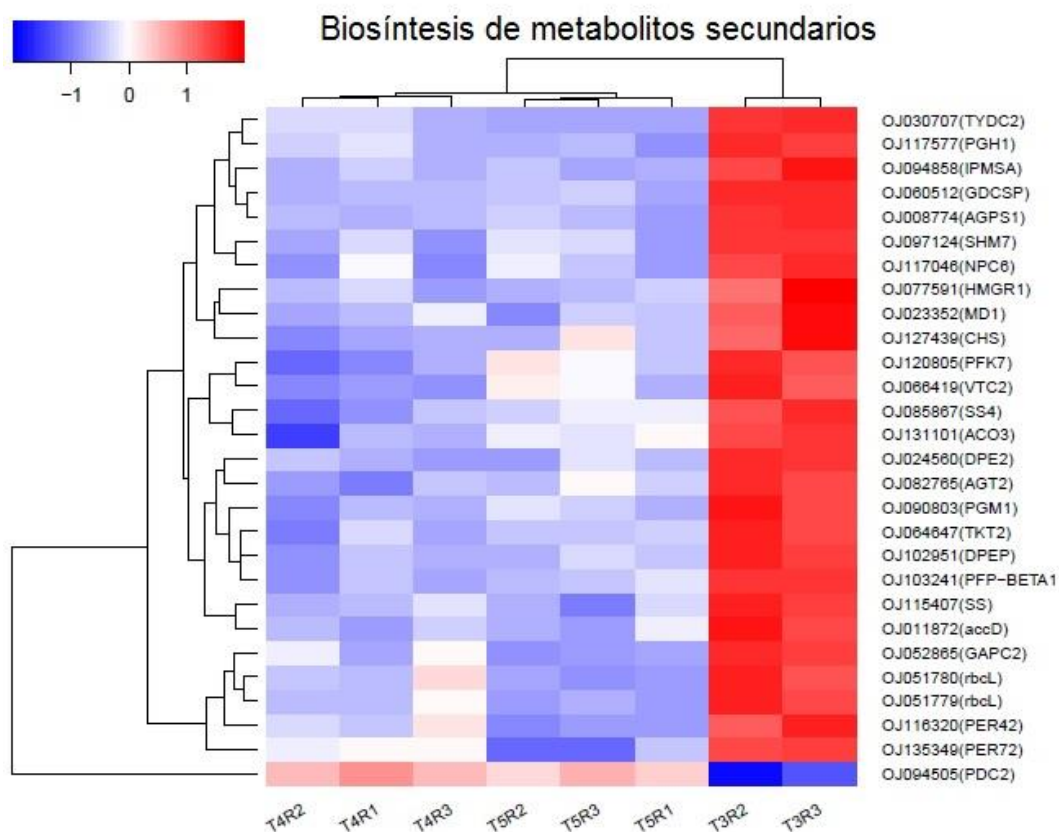


Figura 8: Mapa de calor de la vía KEGG Biosíntesis de metabolitos secundarios del desarrollo de fruto de *O. joconostle* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

En los términos GO proceso biosintético de etileno y respuesta al etileno, los genes involucrados (ACO3, FER, RR21 y ARF7) tuvieron una alta expresión en T3 y una baja expresión en T4 y T5.

5.6. Discusión

El análisis transcriptómico realizado durante el desarrollo y maduración del fruto de *O. joconostle* proporciona información valiosa para comprender mejor la biología del género.

Filtrado de datos y ensamble *de novo*

En relación con ensamble del transcriptoma y el ensamble representativo de *O. joconostle*, se han realizado análisis transcritómicos en otras plantas CAM: Mallona et al. (2011) en *Opuntia ficus-indica* obtuvieron un total de 43,066 contigs; Gross et al. (2013) encontraron 204,530 y 128,869 contigs en *Agave tequilana* y *Agave deserti*, respectivamente; Cervantes-Pérez et al. (2018) generaron un ensamble con 170,844 transcritos a partir de los datos de hojas, raíces y callos en *Agave salmiana*; Wu et al. (2022) obtuvieron un ensamble de 95,412 unigenes en el desarrollo de flor de pitaya; Zhang et al. (2022) obtuvieron un ensamble de 261,468 transcritos y 150,568 unigenes en el desarrollo del fruto de pitahaya; Valadez-Moctezuma et al. (2023) con la tecnología MACE (Massive Analysis of cDNA Ends) en *O. ficus-indica*, *O. robusta* y *O. joconostle* obtuvieron un ensamble de 8383 (GC:40.1%), 7890 (GC: 40.11%) y 5300 (GC:39.9%) transcritos, respectivamente. Las tasas de alineación obtenidas con Align reads and estimate abundance nos indica cuántas secuencias han sido alineadas al transcriptoma y con ello la calidad del ensamble, en este caso la tasa de alineación promedio fue alta (96.82 %) por lo que el ensamble es de buena calidad.

Anotación funcional

El porcentaje de transcritos que tuvieron coincidencia en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot fue de 15,91 % para Blastp y 37.38 % para Blastx. Al respecto, Mallona et al. (2011) detectaron en *Opuntia ficus-indica* 29,835 contigs con aciertos BLAST; Gross et al. (2013) obtuvieron en *Agave tequilana* y *Agave deserti* secuencias de alrededor de 35,000 proteínas; Cervantes-Pérez et al. (2018) identificaron 40,644 marcos de lectura abierta (ORF) y 12,209 genes en *Agave salmiana*; Zhou et al. (2020) identificaron 44,263 unigenes anotados en pitahaya;; Zheng et al., (2021) localizaron 28,992 genes codificadores de proteínas en pitahaya; Wu et al. (2022) reportaron que 18,564 y 18,483 unigenes coincidían en Pfam y SwissProt para flores de pitaya; Zhang et al (2022) en pitahaya detectaron 40,461 unigenes con coincidencia en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI. Cabe mencionar que la mayor parte de las proteínas anotados con Blastp y Blastx coindicen en ambas especies (Figura 1).

El gran número de vías KEGG y términos GO identificados en el análisis EggNOG-mapper, indican que los transcriptomas ensamblados contienen genes funcionalmente diversos. Al respecto, Valadez-Moctezuma et al. (2022) en *O. ficus-indica*, *O. robusta* y *O. joconostle* obtuvieron 282 vías KEGG y 2,793 términos GO, pero el número de transcritos fue menor; y Zheng et al., (2021) en pitahaya detectaron que 21,655 proteínas fueron anotadas por eggNOG, 9,920 de ellas se asignaron a vías KEGG y 10,093 a términos GO.

Análisis de expresión diferencial y análisis KEEG

El número de transcritos expresados diferencialmente (DET) en *O. joconostle* solo se detectaron en las comparaciones T3 vs T4 y T3 vs T5, para la comparación T4 vs T5 no hubo DET; lo anterior indica que los cambios metabólicos entre inicio de maduración y fruto maduro son mínimos.

La comparación de las etapas T3 vs T4 registró el mayor número de DET, lo que indica que el periodo entre T3 y T4 manifiesta los cambios transcripcionales más dinámicos y está relacionado con el crecimiento acelerado del fruto; al respecto, Wu et al. (2020) identificaron un mayor número de DEG en R2_vs_W2 (25 días después de polinización) con 11,317 DEG regulados al alza y 4,788 regulados a la baja en pitaya de pulpa roja y de pulpa blanca.

En cuanto a los términos GO enriquecidos, la mayor parte corresponde a la categoría de Procesos biológicos. Al respecto, Valadez-Moctezuma et al. (2022) al realizar comparación de frutos de *O. ficus-indica* vs *O. robusta*, *O. ficus-indica* vs *O. joconostle* y *O. joconostle* vs *O. robusta* detectaron que la mayor parte de términos GO se clasificaron como procesos biológicos. De las vías KEGG enriquecidas en el presente estudio, Valadez-Moctezuma et al. (2022) encontraron coincidencias en *O. ficus-indica*, *O. robusta*, *O. joconostle* con las vías: vías metabólicas, fotosíntesis, biosíntesis de metabolitos secundarios, metabolismo del carbono, fijación de carbono en organismos fotosintéticos y fosforilación oxidativa.

Vías del metabolismo de carbohidratos y biosíntesis de metabolitos secundarios

El contenido de carbohidratos en frutos de *Opuntia* ha sido reportado por diversas investigaciones; Terán et al. (2014), detectaron que los sólidos solubles totales y azúcares totales aumentan significativamente en el transcurso de la maduración del fruto de *Opuntia*. Zenteno-Ramírez et al. (2015) en frutos de *Opuntia albicarpa* determinaron 14.55 mg mL⁻¹ de azúcares totales (glucosa=8.14 mg mL⁻¹, fructosa=6.39 mg mL⁻¹ y sacarosa=0.01 mg mL⁻¹); así mismo, Reyes-Ocampo et al. (2019) en mucílago de *Opuntia ficus-indica* cuantificaron ramnosa (20.26 %), ácido galacturónico (13.27 %), arabinosa (12.54 %), glucosa (12.24 %), galactosa

(8.89 %), manosa (8.31 %), xilosa (6.85 %) y fucosa (1.6 %). Por lo anterior, se analizaron las vías del metabolismo de los carbohidratos en este estudio.

Con respecto a la vía del metabolismo del almidón y la sacarosa, Zhu et al. (2017) indicaron que muchas frutas pueden acumular abundante almidón durante el cuajado y convertir el almidón en azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa durante la maduración, además encontraron en uva que los genes (APS y SPS) regularon la síntesis de almidón en la piel, mientras que los genes (AMY y BMY) regularon la degradación del almidón en la pulpa; Cortés-Sierra et al. (2015) en yuca identificaron patrones de expresión génica diferencial para genes de almidón como sucrose synthase (SS), beta-amylase (BAM2 y BAM3) y granule-bound starch synthase (WAXY=GBSS); Zhang et al. (2022) detectaron 17 genes involucrados en esta vía para pitahaya, donde VAI, NI y SS son cruciales para la acumulación de azúcar; Wu et al. (2022) encontraron que trehalosa-fosfato (TPS) y almidón sintasa (SS1, SS) participan en el transporte de carbohidratos y tuvieron una expresión diferencial significativa durante el crecimiento de yemas florales y flores en pitaya.

La vía del metabolismo de piruvato fue estudiada en kiwi por Abid et al. (2022), donde identificaron genes como piruvato quinasa (PK), L-lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato descarboxilasa (PDC), aldehído deshidrogenasa (ALDH), acetil-coenzima A sintetasa (CoA) y piruvato deshidrogenasa (PDH). Para la vía metabolismo de fructosa y manosa, Hai-Shun et al. (2020) en *Lolium perenne* cuantificaron los genes fructose-bisphosphate aldolase (FBA2 y FBA3) y 6-phosphofructokinase (PFK3 y PFK6).

Los metabolitos secundarios son compuestos estructuralmente diversos sintetizados por las plantas que realizan diversas funciones (Bhatla et al., 2023), y que son esenciales en los mecanismos de defensa de las plantas al estrés ambiental y los ataques de patógenos (Satish et al., 2020). En la vía de

biosíntesis de metabolitos secundarios se detectaron 27 genes, la mayoría sobre expresados en T3, lo que nos indica que xoconostle produce diferentes metabolitos secundarios.

Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran los flavonoides, en el presente estudio se detectó chalcone synthase (CHS), que de acuerdo con Liu et al. (2021) es la enzima clave en la vía biosintética de las antocianinas (flavonoides responsables de la pigmentación de flores y frutos). Al respecto, Valadez-Moctezuma et al. (2022), cuantificaron la expresión diferencial del gen chalcone-flavonone isomerase (CHI) en tres especies de *Opuntia*, el cual está implicado en la ruta biosintética de todas las clases de flavonoides.

En relación con los genes que participan en el proceso biosintético de etileno y respuesta al etileno; el gen ACO3 (aconitato hidratasa 3) de acuerdo con Moeder et al. (2007) tiene la función de catalizar la isomerización de citrato a isocitrato mediante cis-aconitato y contribuye a la tolerancia al estrés oxidativo.

5.7. Conclusiones

Los resultados sobre el transcriptoma de *O. joconostle* proporcionan información valiosa para comprender mejor los procesos moleculares que regulan su metabolismo, y pueden ser utilizados para estudios genéticos sobre el género *Opuntia*.

El estudio transcriptómico en xoconostle reveló genes específicos sobreexpresados en T3 y bajoexpresados en T4 y T5: Metabolismo del almidón y la sacarosa (AGPS1, TPS5, AMY3, DPEP, DPE2, SS y SS4), Metabolismo del piruvato (PPD, PPCA, MD1, IPMSA, y accD), Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato (MD1, rbcL, FdGOGAT, ACO3, SHM7, GDCSP y AAE3) y Biosíntesis de metabolitos secundarios (TYDC2, PGH1, IPMSA, GDCSP, AGPS1, SHM7, NPC6, HMGR1, MD1, CHS, PFK7, VTC2, SS4, ACO3, DPE2,

AGT2, PGM1, TKT2, DPEP, PFP-BETA1, SS, accD, GAPC2, rbcL, PER42 y PER72); de los cuales CHS participa en la biosíntesis de flavonoides y ACO3 en el proceso biosintético de etileno. Estas vías metabólicas son importantes en el desarrollo y maduración frutos de xoconostle.

5.8. Literatura citada

Abid, M., Gu, S., Zhang, Y. J., Sun, S., Li, Z., Bai, D. F., Sun, L., Qi, X. J., Zhong Y. P., & Fang, J. B. (2022). Comparative transcriptome and metabolome analysis reveal key regulatory defense networks and genes involved in enhanced salt tolerance of *Actinidia* (kiwifruit). *Horticulture Research*, 9, Article uhac189. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac189>

Addinsoft, A. (2019). *XLSTAT statistical and data analysis solution*. Long Island

Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A. & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018update. *Nucleic Acids Research* 46, 537–544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>

Andrews, S. (2012). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Babraham Bioinformatics. Recuperado el 22 de febrero de 2023 de <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

Bhatla, S. C. & Lal, M. A. (2023). Secondary Metabolites. In: S. C. Bhatla & M. A. Lal. *Plant Physiology, Development and Metabolism*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-99-5736-1_33

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Bu, D., Luo, H., Huo, P., Wang, Z., Zhang, S., He, Z., Wu, Y., Zhao, L., Liu, J., Guo, J., Fang, S., Cao, W., Yi, L., Zhao, Y. & Kong, L. (2021). KOBAS-i:

- intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, 49(1):317–325, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab447>
- Cervantes-Pérez, S. A., Espinal-Centeno, A., Oropeza-Aburto, A., Caballero-Pérez, J., Falcon, F., Aragón-Raygoza, A., Sánchez-Segura, L., Herrera-Estrella, L., Cruz-Hernández, A. & Cruz-Ramírez, A. (2018). Transcriptional profiling of the CAM plant *Agave salmiana* reveals conservation of a genetic program for regeneration. *Developmental Biology*, 442(1), 28-39 <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.018>
- Chen, K., Huang, G., Li, Y., Zhang, X., Lei, Y., Li, Y., Xiong, J. & Sun, Y. (2022). Illumina MiSeq sequencing reveals correlations among fruit ingredients, environmental factors, and AMF communities in three *Lycium barbarum* producing regions of China. *Microbiology Spectrum*, 10(2), Article e02293-21. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02293-21>
- Cortés-Sierra, S., Chavarriaga, P., Ceballos, H. & López-Carrascal, C. (2015). Evaluación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de almidón en diferentes variedades de yuca. *Acta Biológica Colombiana*, 20(2), 37-46. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.42875>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Kaller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S. & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum,

- C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. & Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Gross, S. M., Martin, J. A., Simpson, J., Abraham-Juarez, M. J., Wang, Z. & Visel, A. (2013). De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics*, 14, 563. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-563>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N. & Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hai-Shun, X., Su-Ming, G., Lin, Z. & Jin-Cheng, X. (2020). Growth, physiological and transcriptomic analysis of the perennial ryegrass *Lolium perenne* in response to saline stress. *Royal Society Open Science*, 7(7), Article 200637. <http://doi.org/10.1098/rsos.200637>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C. & Bork, P. (2019). eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47, D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Hunt, D., Taylor, N. & Charles, G. (2006). *The New Cactus Lexicon*. International Cactaceae Systematics Group.

- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology*, 15(2), R29 <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Li, D., Zand, M. S., Dye, T. D., Goniewicz, M. L., Rahman, I. & Xie, Z. (2022). An evaluation of RNA-seq differential analysis methods. *PLoS ONE*, 17(9), Article e0264246. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0264246>
- Liaw, A., Gentleman, R., Maechler, M., Huber, W. & Warnes, G. (n.d.). heatmap.2: Enhanced Heat Map. Recuperado el 20 de noviembre de 2023 <https://rdocumentation.org/packages/gplots/versions/3.1.3/topics/heatmap.2>
- Liu, J., Hao, X.-L., & He, X.-Q. (2021). Characterization of three chalcone synthase-like genes in *Dianthus chinensis*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 146, 483–492. <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02081-8>
- Mallona, I., Egea-Cortines, M. & Weiss, J. (2011). Conserved and Divergent Rhythms of Crassulacean Acid Metabolism-Related and Core Clock Gene Expression in the Cactus *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiology*, 156 (4), 1978–1989. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179275>
- Mendez-Llorente, F., Ramírez-Lozano, R. G., Aguilera-Soto, J. I. & Arechiga-Flores, C. F. (2011). Performance and nutrient digestion of lambs fed incremental levels of wild cactus (*Opuntia leucotrichia*). *Journal of Applied Animal Research*, 39(3), 248–251. <https://doi.org/10.1080/09712119.2011.588406>
- Moeder, W., del Pozo, O., Navarre, D. A., Martin, G. B. & Klessig, D. F. (2007) Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Molecular Biology*, 63, 273–287. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9087-x>
- Morales, P., Ramírez-Moreno, E., de Cortes Sanchez-Mata, M., Carvalho, A. M., & Ferreira, I. C. (2012). Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xocónostle cultivars (*Opuntia joconostle* FAC Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food*

- Research International*, 46(1), 279-285.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.031>
- Osorio-Esquivel, O., Álvarez, V. B., Dorantes-Álvarez, L., & Giusti, M. M. (2011). Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. *Food Research International*, 44(7), 2160-2168.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.011>
- Paiz, R. C., Juárez-Flores, B. I., Aguirre, R. J. R., Cárdenas, O. C., Reyes, A. J. A., García, C. E., & Álvarez, F. G. (2010). Glucose-lowering effect of xoconostle (*Opuntia joconostle* A. Web., Cactaceae) in diabetic rats. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(22), 2326-2333.
- Pimienta-Barrios, E., Méndez-Morán, L., Ramírez-Hernández, B. C., García de Alba-García, J. E., & Domínguez-Arias, R. M. (2008). Efecto de la ingestión del fruto de xoconostle (*Opuntia joconostle* Web.) sobre la glucosa y lípidos séricos. *Agrociencia*, 42(6), 645-653.
- Reyes-Ocampo, I., Córdova-Aguilar, M. S., Guzmán, G., Blancas-Cabrera, A. & Ascanio, G. (2019). Solvent-free mechanical extraction of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1), Article e12954. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12954>
- Satish, L., Shamili, S., Yolcu, S., Lavanya, G., Alavilli, H. & Swamy, M.K. (2020). Biosynthesis of Secondary Metabolites in Plants as Influenced by Different Factors. In: M. Swamy (eds). *Plant-derived Bioactives*. Springer.
https://doi.org/10.1007/978-981-15-1761-7_3
- Seymour, G. B., Østergaard, L., Chapman, N. H., Knapp, S. & Martin, C. (2013). Fruit development and ripening. *Annual review of plant biology*, 64, 219–241. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120057>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V, & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>

- Stuppy, W. H. (2002). Seed characters and the classification of the Opuntioideae. *Succulent Plant Research*, 6, 25-58.
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS ONE*, 6(7), Article e21800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
- Terán, Y., García, T., Chaparro, L., Petit, D., Garrido, E., Barazarte, H., Aubeterre, R. D. & Mujica, Y. (2014). Cambios en las características químicas y físicas del fruto de *Opuntia ficus-indica* L. durante la maduración. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 756-765. <https://www.researchgate.net/publication/308925836>
- Trapnell, C., Hendrickson, D. G., Sauvageau, M., Goff, L., Rinn, J. L. & Pachter, L. (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, 31, 46–53. <https://doi.org/10.1038/nbt.2450>
- Valadez-Moctezuma, E., Samah, S., Mascorro-Gallardo, J. O., Marbán-Mendoza, N., Aranda-Osorio, G., Flores-Girón, E., Brito-Nájera, G. & Rodríguez de la O, J. L. (2023). The first transcriptomic analyses of fruits and cladodes for comparison between three species of *Opuntia*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 70, 951–970. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01480-w>
- Wu, Z., Huang, L., Huang, F., Lu, G., Wei, S., Liu, C., Deng, H. & Liang, G. (2022). Temporal transcriptome analysis provides molecular insights into flower development in red-flesh pitaya. *Electronic Journal of Biotechnology*, 58, 55-69. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.05.005>
- Zenteno-Ramírez, G., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., Ortiz-Pérez, M. D., Zamora-Pedraza, C. & Rendón-Huerta, J. A. (2015). Evaluación de azúcares y fibra soluble en el jugo de variantes de tunas (*Opuntia* spp.). *Agrociencia*, 49(2), 141-152.

- Zhang, Z., Xing, Y., Ramakrishnan, M., Chen, C., Xie, F., Hua, Q., Chen, J., Zhang, R., Zhao, J., Hu, G. & Qin, Y. (2022). Transcriptomics-based identification and characterization of genes related to sugar metabolism in 'Hongshuijing' pitaya. *Horticultural Plant Journal*, 8(4), 450-460. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.06.004>
- Zheng, J., Meinhardt, L. W., Goenaga, R., Zhang, D., & Yin, Y. (2021). The chromosome-level genome of dragon fruit reveals whole-genome duplication and chromosomal co-localization of betacyanin biosynthetic genes. *Horticulture Research*, 8, 63. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00501-6>
- Zhou, Z., Gao, H., Ming, J., Ding, Z., Lin, X. E. & Zhan, R. (2020). Combined Transcriptome and Metabolome analysis of Pitaya fruit unveiled the mechanisms underlying Peel and pulp color formation. *BMC Genomics*, 21, 734 <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07133-5>
- Zhu, X., Zhang, C., Wu, W., Li, X., Zhang, C., & Fang, J. (2017). Enzyme activities and gene expression of starch metabolism provide insights into grape berry development. *Horticulture research*, 4, Article 17018 <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.18>

VI. GENES INVOLUCRADOS EN LAS VÍAS DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS Y BIOSÍNTESIS DE FLAVONOIDES EN TUNA (*Opuntia albicarpa* SCHEINVAR) Y XOCONOSTLE (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber).

6.1. Resumen

Especies de *Opuntia* son un cultivo emblemático y con gran potencial para México y el mundo por los múltiples usos y propiedades que presenta. Existen especies productoras de tuna que es un fruto dulce y jugoso, mientras que otras producen xoconostle que se caracteriza por su sabor ácido y textura firme. Se realizó un análisis transcriptómico durante el desarrollo de *Opuntia albicarpa* y *Opuntia joconostle*, que producen tuna y xoconostle, respectivamente, para comprender mejor los procesos involucrados en su metabolismo. En *Opuntia albicarpa* se obtuvieron alrededor de 704 millones lecturas, un ensamble de 240,169 transcritos y con Blastp se anotaron 39,686 secuencias de proteínas; mientras que para *O. joconostle* se generaron cerca de 573 millones de lecturas, un ensamble de 159,783 transcritos y se anotaron 32,924 secuencias de proteínas. En tuna se detectaron genes involucrados en las vías del Metabolismo de carbohidratos sobre expresados diferencialmente en fruto maduro (BGLU12, TPPA, TPS7, TPPG, BAM2, PFK6, FBA3, XYLA, AGAL3 y GALM) y genes cuya expresión tendió a la baja (ADG2, PGMP, WAXY, TPS9, SPS, BGLU44, SS1, SS, DPEP, PFK3, GOLS2, AGAL1, RFS, FBA2, CFBP1 y TPI); mientras que para xoconostle la expresión de los genes del Metabolismo de carbohidratos fue a la baja en fruto maduro (SS, SS4, TPS5, DPE2, AMY3, AGPS1, AAE3, ACO3, MD1, rbcL, SHM7, GDCSP, PPD, PPCA, accD y IPMSA). En la Biosíntesis de flavonoides para tuna se detectaron genes que aumentaron su expresión en fruto maduro (CHI, CYP75B2 y FHT) y genes cuya expresión tendió a la baja (CYP98A2, CCOAOMT y CYP73A16; para xoconostle el gen CHS bajó su expresión en fruto maduro. Los resultados pueden ser utilizados para estudios genéticos y moleculares sobre el género *Opuntia* y con ello comprender mejor su biología.

Palabras clave: Transcriptómica, genes, maduración, tuna, xoconostle

6.2. Abstract

Opuntia species are an emblematic crop with great potential for Mexico and the world due to the multiple uses and properties it presents. There are species that produce prickly pear, which is a sweet and juicy fruit, while others produce xoconostle, which is characterized by its acidic flavor and firm texture. Transcriptomic analysis was performed during the development of *Opuntia albicarpa* and *Opuntia joconostle*, which produce prickly pear and xoconostle, respectively, to better understand the processes involved in their metabolism. In *Opuntia albicarpa*, around 704 million reads were obtained, an assembly of 240,169 transcripts, and with Blastp 39,686 protein sequences were annotated; while for *O. joconostle*, about 573 million reads were generated, an assembly of 159,783 transcripts and were annotated 32,924 protein sequences. In prickly pear, genes involved in carbohydrate metabolism pathways were detected that were differentially overexpressed in ripe fruit (BGLU12, TPPA, TPS7, TPPG, BAM2, PFK6, FBA3, XYLA, AGAL3 and GALM) and genes whose expression tended to decrease (ADG2, PGMP, WAXY, TPS9, SPS, BGLU44, SS1, SS, DPEP, PFK3, GOLS2, AGAL1, RFS, FBA2, CFBP1 and TPI); while for xoconostle the expression of carbohydrate metabolism genes was lower in mature fruit (SS, SS4, TPS5, DPE2, AMY3, AGPS1, AAE3, ACO3, MD1, rbcL, SHM7, GDCSP, PPD, PPCA, accD and IPMSA). In the biosynthesis of flavonoids for prickly pear, genes were detected that increased their expression in ripe fruit (CHI, CYP75B2 and FHT) and genes whose expression tended to decrease (CYP98A2, CCOAOMT and CYP73A16; for xoconostle, the CHS gene lowered its expression in ripe fruit. The results can be used for genetic and molecular studies on the *Opuntia* genus and thus better understand its biology.

Keywords: Transcriptomics, genes, maturation, prickly pear, xoconostle

6.3. Introducción

El nopal (*Opuntia* spp.), es una cactácea con gran diversidad de especies que se encuentra ampliamente distribuida en zonas áridas y semiáridas de México (Torres-Ponce et al, 2015). De acuerdo con Mendez-Llorente et al. (2011), existen alrededor de 300 especies del género, de las cuales cerca de 100 están presentes en México. El género *Opuntia* incluye especies usadas para el consumo de cladodios tiernos (nopalitos), o por sus frutos llamados tunas y xoconostles (Gallegos-Vázquez et al., 2012). La tuna es un fruto dulce con cientos de semillas, su cáscara es fina y su pulpa muy jugosa; mientras que el xoconostle es un fruto ácido con cáscara gruesa y muy poca pulpa, su maduración es lenta y el fruto permanece en la planta por mucho tiempo (CONABIO, 2023).

La maduración frutos está altamente coordinada, genéticamente programada y es un proceso de desarrollo irreversible que involucra atributos bioquímicos y fisiológicos específicos que conducen al desarrollo de frutos de calidad (Giovannoni, 2001). El dulzor de las frutas es la característica central que establece la calidad de la fruta, la cual está determinada por el contenido total de azúcar y su proporción de azúcares como sacarosa, glucosa, fructosa, etc. (Osorio & Fernie, 2013). Así mismo, los flavonoides son metabolitos secundarios de importancia para la calidad de la fruta (Osorio & Fernie, 2013).

El conjunto moléculas de ARN transcritas en un órgano o tejido en un momento particular bajo ciertas condiciones ambientales constituye el transcriptoma (Martínez-López et al., 2014). La transcriptómica es un enfoque poderoso que se puede utilizar para estudiar los genes expresados durante el crecimiento, desarrollo y maduración de frutos a través del análisis RNA-Seq (Ochoa-Alejo et al., 2024).

En este estudio, se realizó un análisis transcriptómico comparativo del desarrollo frutos de *O. albicarpa* y *O. joconostle*, con el objetivo de identificar genes involucrados en el metabolismo de carbohidratos y la biosíntesis de flavonoides. A través de este enfoque, se espera obtener una mejor comprensión de los

procesos moleculares que regulan la acumulación de carbohidratos y flavonoides en estas especies.

6.4. Materiales y métodos

Muestreo

Se colectaron tres frutos de tres plantas independientes en cada etapa de desarrollo de *Opuntia albicarpa* y *Opuntia joconostle* en huertos comerciales en San Martín de las Pirámides, Estado de México (19° 41' 59.9" N 98° 48' 31.6" W). Se seleccionaron frutos sanos en cinco etapas fenológicas (T1: antesis, T2: 30 días después de antesis, T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de la pigmentación y T5: fruto maduro). Los frutos se transportaron en una hielera al laboratorio, donde fueron lavados con agua y detergente Extran marca Merck (utilizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante), el enjuague final se realizó con agua destilada. Se hicieron cortes longitudinales de los frutos, se envolvieron con papel aluminio y se conservaron en nitrógeno líquido.

Obtención y secuenciación de ARN

En un mortero estéril, se maceraron 3 g de tejido total de cada muestra (compuesta de 3 frutos de 3 plantas independientes) con nitrógeno líquido. La extracción de ARN de *O. albicarpa* se realizó con el kit PureLink™ RNA Mini (Invitrogen, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Mientras que el ARN de *O. joconostle* se extrajo con el reactivo Trizol™ (Invitrogen, EE. UU.) utilizando la metodología del fabricante. La concentración de ARN se midió en un espectrofotómetro Nanodrop UVS-99 UVISDrop.

Las librerías de *O. albicarpa* y *O. joconostle* fueron sintetizadas con el kit TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit, el DNA complementario obtenido de las librerías se secuenció en la plataforma NovaSeq6000 (Illumina) en modo de extremos emparejado para obtener lecturas de 101 pb.

Filtrado de datos y ensamble *de novo*

El análisis bioinformático se realizó en la plataforma web de Galaxy (usegalaxy.org/; Afgan et al., 2018). La calidad de las lecturas sin procesar se

evaluó con FastQC v0.72 (Andrews, 2012) y MultiQC v1.9 (Ewels et al., 2016), la calidad se mejoró eliminando lecturas de baja calidad (puntuación de calidad phred < 30) y lecturas cortas (longitud < 60 pb) con la herramienta Trimmomatic v0.38.0 (Bolger et al., 2014).

Al no contar con un genoma de referencia para *Opuntia*, se realizó el ensamble del transcriptoma *de novo* de cada especie utilizando las etapas fenológicas T3, T4 y T5 debido a que las librerías de T1 y T2 presentaron baja calidad y menor número de lecturas. El ensamble se realizó con Trinity v2.9.1. utilizando parámetros predeterminados y una longitud de contig de 200 pb (Grabherr et al., 2011). Se eliminaron transcritos duplicados para obtener el ensamble representativo de ambas especies con CD-HIT-EST v1.3. (Fu et al., 2012) utilizando un umbral de similitud del 98 %. La evaluación de la calidad del ensamble de ambos genomas se realizó con Busco v5.3.2 (Simão et al., 2015), utilizando 425 genes ortólogos de 57 especies del conjunto de datos Viridiplantae. Se utilizó Align Reads and Estimate Abundance v2.9.1 para calcular la abundancia de genes e isoformas, estas se combinaron en un solo archivo con Build Expression Matrix v2.9.1 (Grabherr et al., 2011).

Anotación funcional

Los ensambles representativos fueron utilizados para identificar regiones de codificación (con al menos 100 aminoácidos) con la herramienta TransDecoder v5.5.0 (Haas et al., 2013). El ensamble y las secuencias peptídicas (obtenidas por TransDecoder) fueron alineadas contra la base de datos de SwissProt, (567,483 secuencias) (The UniProt Consortium 2021) utilizando Diamond Blastx y Diamond Blastp, respectivamente, (e-value < 10^{-3}). Para anotar el ensamble se utilizó EggNOG v5.0 (Huerta-Cepas et al., 2019) (<http://eggno-mapper.embl.de/>), en la cual se obtuvieron GO term, Enzyme Commission (EC), KEGG-Ko y KEGG-pathway, donde se usaron los parámetros predeterminados y el archivo de péptidos de TransDecoder.

Análisis de expresión diferencial y análisis KEGG del DET

Con el programa Limma v3.48.0 (Law et al., 2014) se obtuvieron los transcritos diferencialmente expresados en comparaciones por pares: T3 vs T4, T3 vs T5 y T4 vs T5. Los transcritos diferencialmente expresados (DET) con $|\log FC| > 2$ y con P-value ajustado < 0.01 se analizaron en KOBAS-I (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) (Bu et al. 2021), para obtener vías KEGG y términos GO enriquecidos significativamente [$e\text{-value} \leq 0.0001$] utilizando como referencia el genoma de *Arabidopsis thaliana*. La clasificación de términos GO se realizó con Revigo (<http://revigo.irb.hr/>) (Supek et al., 2011).

Para ambas especies, se extrajeron y analizaron los genes en las vías Kegg del metabolismo de carbohidratos: metabolismo de almidón y sacarosa, metabolismo de piruvato, metabolismo de glioxilato y dicarboxilato y metabolismo de fructosa y manosa; así como la vía de biosíntesis de flavonoides y el término GO proceso biosintético de etileno. Se realizaron gráficos de mapa de calor con la herramienta Heatmap2 Version 3.1.1 (Liaw et al., n.d.) en Galaxy para observar la expresión de los DET en las tres etapas de desarrollo del fruto utilizando la transformación Z de los valores de los conteos normalizados.

6.5. Resultados

Filtrado de datos y ensamble *de novo*

Para *O. albicarpa* se obtuvieron un total de 704,150,890 lecturas crudas de extremos emparejados con un contenido de guanina-citocina (GC) de 48.25% a partir de frutos de 60 días después de antesis (T3), inicio de pigmentación (T4) y frutos maduros (T5). Mientras que para *O. joconostle* el número de lecturas obtenido fue de 573,720,670 y un contenido de GC de 48.25%. Los archivos de secuencia crudas se cargaron en el National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>) con los números de acceso de BioProject PRJNA803369 (SAMN25649427-35) y PRJNA932849 (SRX19315968-76) para *O. albicarpa* y *O. joconostle*, respectivamente.

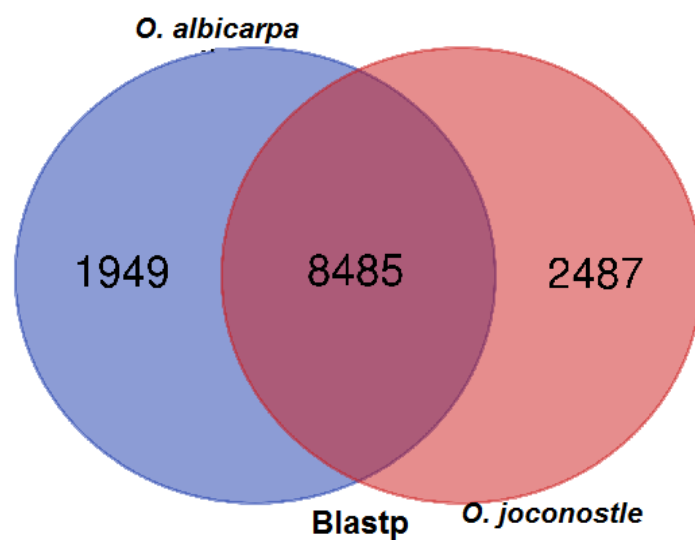
Después de realizar el control de calidad con Trimmomatic (puntuación Phred > 30), se obtuvieron 631,639,944 y 503,758,622 lecturas de alta calidad para *O. albicarpa* y *O. joconostle*, respectivamente.

Para *O. albicarpa*, el ensamble del transcriptoma realizado con Trinity generó 240,169 transcritos, mientras que el ensamble representativo con CD-HIT-EST resultó en 198,958 transcritos (GC=41.95 %, longitud media= 1003 pb, N50=1734 pb y rango de longitud= 181-10,434 pb). Así mismo, para *O. joconostle*, se obtuvieron 159,783 transcritos en el ensamble y 141,187 transcritos en el ensamble representativo (GC=42.57 %, longitud media= 824 pb, N50=1270 pb y rango de longitud= 185 a 11327 pb).

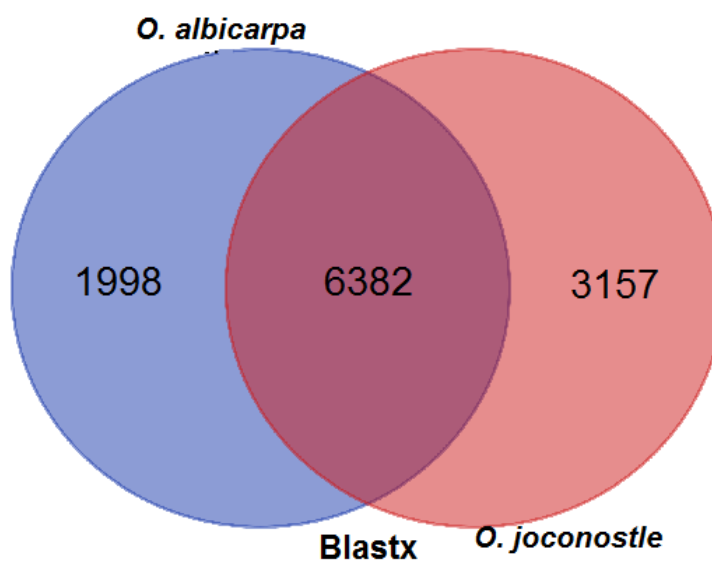
El programa Busco en *O. albicarpa* detectó 97.6 % de 425 genes ortólogos [415 completos (94 copia única y 321 duplicados), 10 fragmentados]; y en *O. joconostle* se reveló la presencia de 81.7 % de los genes ortólogos [347 completos (129 copia única y 218 duplicados), 66 fragmentados]. Con la herramienta Align Reads and Estimate Abundance, la tasa de alineación promedio fue de 95.97 % para *O. albicarpa*, y de 96.82 % para *O. joconostle*.

Anotación funcional

Para *O. albicarpa*, la búsqueda de regiones de codificación con Transdecoder dio como resultado 116,693 PEP y 398,706 marcos de lectura abierta (ORF); el análisis Blastp detectó 39,686 secuencias que codifican proteínas (38,587 de plantas) y 11,781 genes; y con Blastx, se identificaron 22,460 secuencias de proteínas (21,842 de plantas) y 10106 genes. Mientras que para *O. joconostle* la herramienta Transdecoder detectó 88,066 PEP y 257,947 ORF; Blastp identificó 32,924 secuencias de proteínas (30,882 de plantas) y 13,310 genes; y con Blastx, se detectaron 22,458 secuencias de proteínas (20,243 de plantas) y 12,092 genes. De Blastp y de Blastx se detectaron 8,485 (Figura 9A) y 6,382 proteínas que estaban presentes en ambas especies (Figura 9B).



A



B

Figura 9: A) Diagrama de Venn con el número de proteínas detectadas en *Opuntia albicarpa* y *O. joconostle* con Blastp. B) Diagrama de Venn con el número de proteínas detectadas en *O. albicarpa* y *O. joconostle* con Blastx.

El análisis efectuado de *O. albicarpa* en EggNOG-mapper mostró que 37,352 transcritos cuentan con al menos un término GO y 22,816 con al menos una vía KEGG; se identificaron 11,055 términos GO y 395 vías KEGG. Mientras que para *O. joconostle*, 29,280 transcritos cuentan con al menos un término GO y 18,260 con una vía KEGG; así mismo, se detectaron 11,373 términos GO y 394 vías KEGG.

Análisis de expresión diferencial y análisis KEEG

El análisis de expresión diferencial realizado en comparaciones por pares de etapas de desarrollo mostró un mayor número de transcritos expresados diferencialmente (DET) en *O. albicarpa* respecto a *O. joconostle* (Cuadro 3).

Cuadro 3: Transcritos expresados diferencialmente por comparación de etapas de desarrollo en *O. albicarpa* y *O. joconostle*.

DET	<i>O. albicarpa</i>			<i>O. joconostle</i>		
Comparación	Sobre expresados	Normal	Bajo expresados	Sobre expresados	Normal	Bajo expresados
T3 vs T4	1636	41704	423	451	39906	50
T3 vs T5	1317	41966	480	349	40019	39
T4 vs T5	83	42922	758	0	40407	0

Al analizar los DET de *O. albicarpa* con Kobas y Revigo se obtuvo lo siguiente: en la comparación T3 vs T4 27 vías KEGG y 221 términos GO se enriquecieron significativamente (valor P corregido < 0.01), siete de las vías KEGG corresponden al metabolismo de los carbohidratos, y los términos GO se clasifican como proceso biológico (PB, 118), función molecular (FM, 67) y componente celular (CC, 31); para la comparación T3 vs T5 23 vías KEGG y 193 términos GO se enriquecieron significativamente, seis vías KEGG se clasifican como metabolismo de los carbohidratos y los términos GO corresponden a proceso biológico (PB, 100), componente celular (CC, 37) y función molecular (FM, 55); y en la comparación T4 vs T5 se enriquecieron significativamente 10 vías KEGG y 100 términos GO, los cuales se ubican en la categorías de proceso biológico (PB, 47), componente celular (CC, 18) y función molecular (FM, 34). Otras vías KEGG importantes enriquecidas fueron biosíntesis de metabolitos secundarios, vías metabólicas, biosíntesis de flavonoides y biosíntesis de aminoácidos.

Referente al análisis con Kobas y Revigo de *O. joconostle* se encontró lo siguiente: Para T3 vs T4 se enriquecieron significativamente 10 vías KEGG y 32 términos GO, donde tres vías KEGG corresponden al metabolismo de los carbohidratos y los términos GO se clasifican como proceso biológico (PB, 15), función molecular (FM, 7) y componente celular (CC, 10); para la comparación T3 vs T5 7 vías KEGG y 17 términos GO se enriquecieron significativamente, dos vías KEGG se clasifican como metabolismo de los carbohidratos y los términos GO corresponden a proceso biológico (PB, 6), componente celular (CC, 9) y función molecular (FM, 2); en la comparación T4 vs T5 no hubo vías KEGG ni términos GO enriquecidos. Las vías KEGG biosíntesis de metabolitos secundarios y vías metabólicas también se enriquecieron significativamente.

Vías del Metabolismo de carbohidratos

De las 15 vías del metabolismo de carbohidratos de la base de datos KEGG, en *O. albicarpa* la comparación T3 vs T4 presentó 7 vías enriquecidas significativamente (valor $P < 0,01$), T3 vs T5 presentó 6 vías y T4 vs T5 solo presentó una vía; mientras que en *O. joconostle* la comparación T3 vs T4 presentó tres vías del metabolismo de los carbohidratos enriquecidas significativamente, y T3 vs T5 presentó dos vías (Cuadro 4). Las vías del metabolismo de carbohidratos enriquecidas para las dos especies fueron: metabolismo del piruvato, metabolismo de glioxilatos y dicarboxilatos y metabolismo del almidón y la sacarosa.

Cuadro 4: Vías KEGG del metabolismo de carbohidratos enriquecidas significativamente por comparación de etapas de desarrollo en *Opuntia albicarpa* y *O. joconostle*.

Comparación	<i>O. albicarpa</i>	<i>O. joconostle</i>
T3 vs T4	Metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos de azúcar Glucólisis/Gluconeogénesis Metabolismo de glioxilatos y dicarboxilatos Metabolismo de galactosa Metabolismo de piruvato Vía de las pentosas fosfato Metabolismo de ascorbato y aldarato	Metabolismo del piruvato Metabolismo de glioxilatos y dicarboxilatos Metabolismo del almidón y la sacarosa
T3 vs T5	Glucólisis/Gluconeogénesis Metabolismo de glioxilatos y dicarboxilatos Metabolismo de piruvato Metabolismo de galactosa Metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos de azúcar Metabolismo de almidón y sacarosa	Metabolismo del piruvato Metabolismo del almidón y la sacarosa
T4 vs T5	Metabolismo de aminoazúcares y nucleótidos de azúcar	

Metabolismo de almidón y sacarosa

En esta vía para *O. albicarpa* se detectaron genes bajoexpresados en T3 y T4 y sobreexpresados en T5: BGLU12 (OP006394), TPPA (OP039270), TPS7 (OP128468), At5g51830 (OP038818), TPS5 (OP128465, EC), TPPG (OP039271) y BAM3 (OP064455); genes con baja expresión en T3 y alta en T4 y T5: INV*DC4 (OP028593) y BAM2 (OP120782); y genes con alta expresión en T3 y baja en T4 y T5: At1g50460 (OP035155), ADG2 (OP060556), PGMP

(OP001310, OP001312), WAXY (OP150334, OP150335, OP150339), At1g64390 (OP179564, OP179569), At1g11820 (OP050809), TPS9 (OP037249), SPS (OP193530), BGLU44 (OP170752), SS1 (OP085395), SS (OP048062), DPEP (OP169611), TPS5 (OP178383), At3g59480 (OP163884) y INV*DC4 (OP028592) (Figura 10).

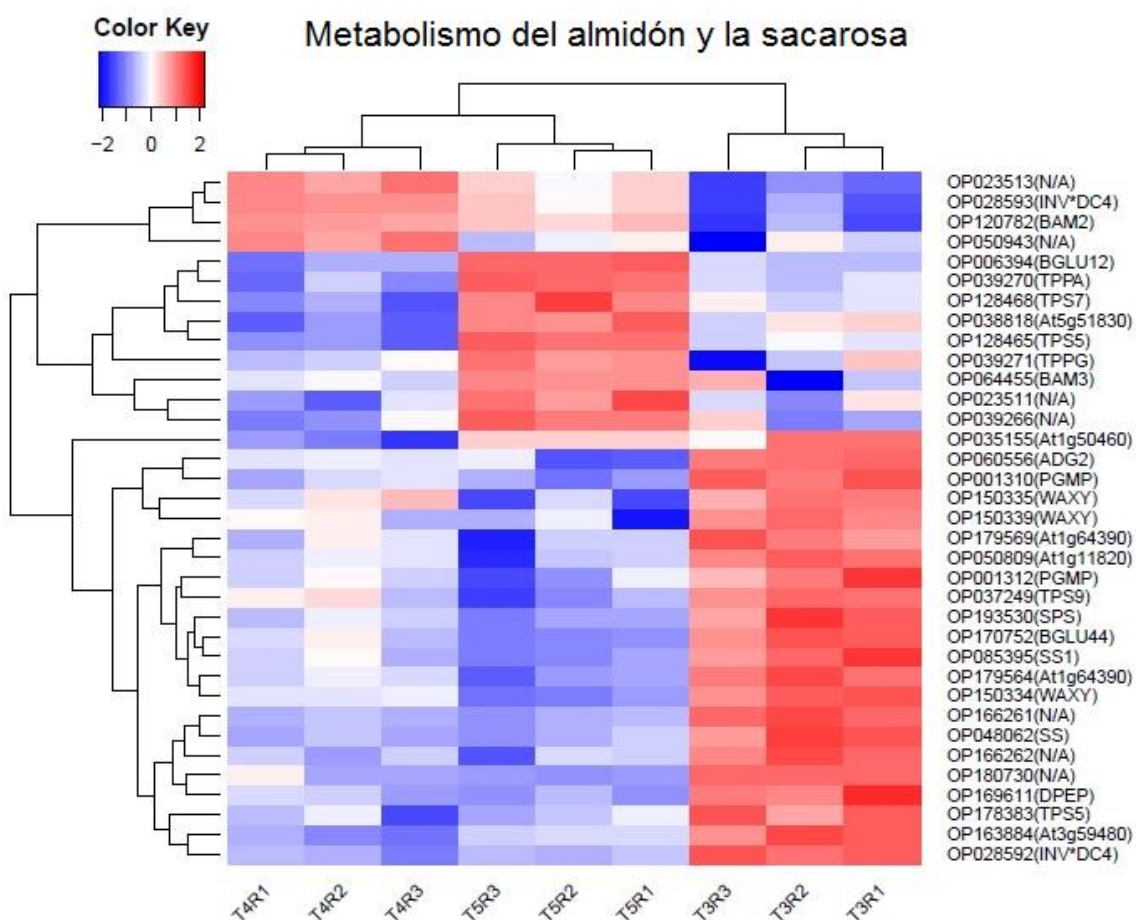


Figura 10: Mapa de calor de la vía KEGG metabolismo del almidón y la sacarosa del desarrollo de fruto de *Opuntia albicarpa* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

Para *O. joconostle* únicamente se detectaron genes sobreexpresados en T3 y bajoexpresados en T4 y T5: AGPS1 (OJ008774), TPS5 (OJ035305, OJ066008),

AMY3 (OJ064155), DPEP (OJ102951), DPE2 (OJ024560), SS (OJ015086) y SS4 (OJ085867) (Figura 11).

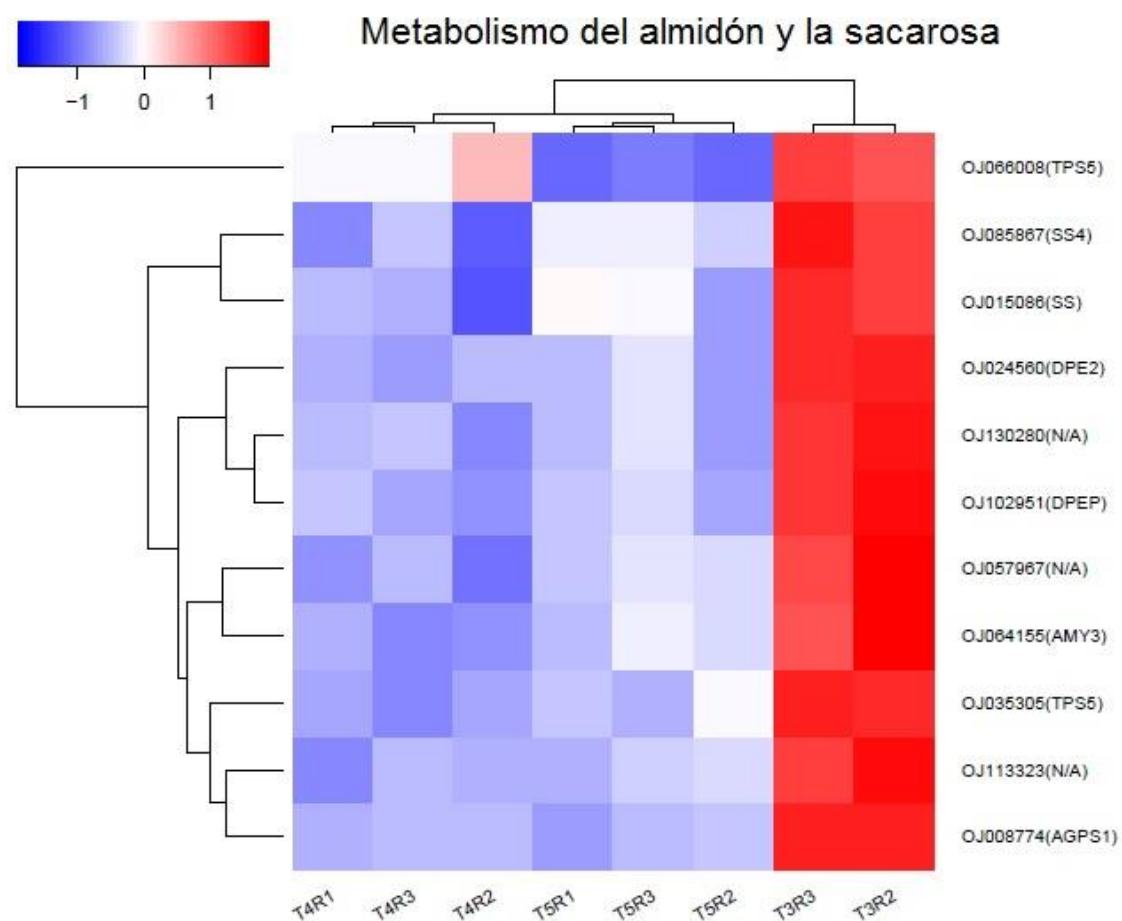


Figura 11: Mapa de calor de la vía KEGG metabolismo del almidón y la sacarosa del desarrollo de fruto de *Opuntia joconostle* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

Metabolismo del piruvato

La vía del metabolismo del piruvato en *O. albicarpa* (Figura 12) presentó genes sobreexpresados en T3 y bajoexpresados en T4 y T5: OsI_35105 (OP019398, OP019399, OP019401), NADP-ME (OP128052, OP128063, OP128062, OP128058), PPCA (OP085371), IPMSA (OP112619), BALDH (OP056404) y ALDH3F1 (OP016821); y genes cuya expresión fue baja en T3 y alta en T4 y T5:

MOD1 (OP081987), MODA (OP149092), ALDH7B4 (OP142818), PPCA (OP085390) y NADP-ME (OP128068).

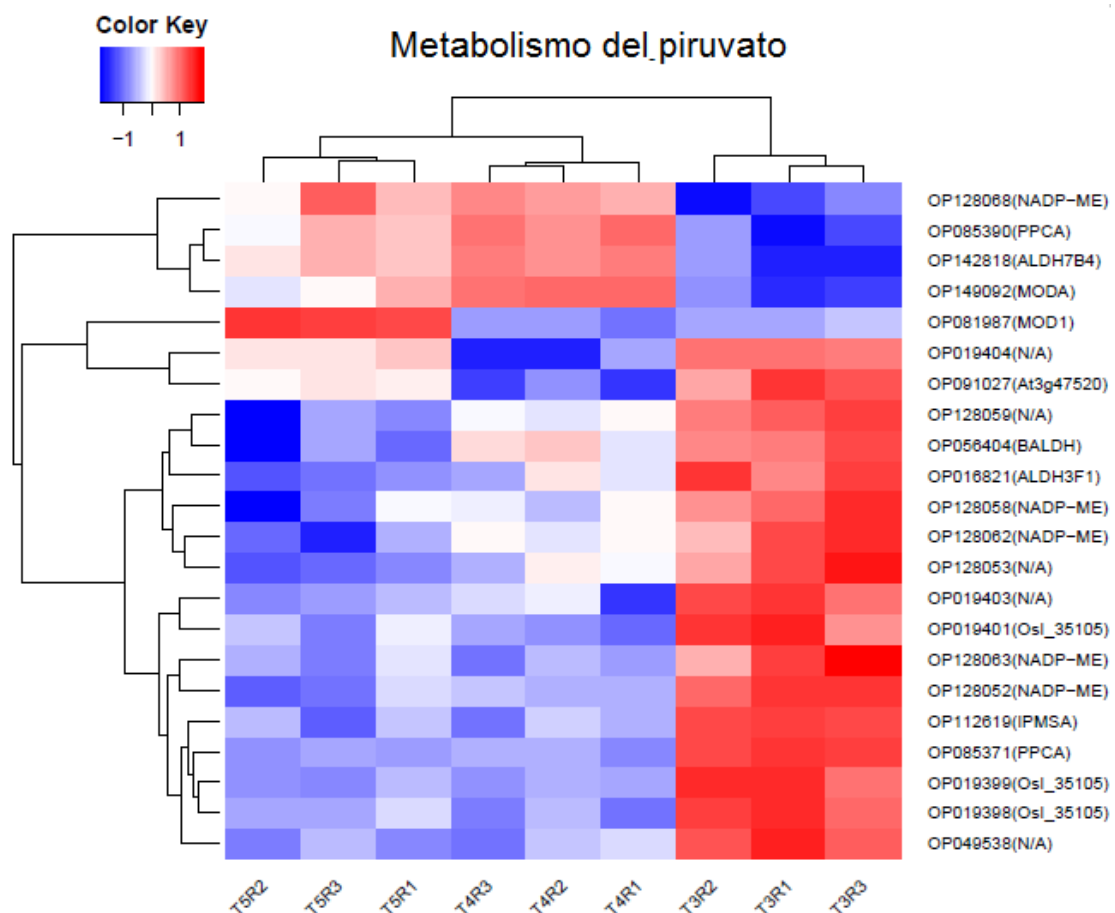


Figura 12: Mapa de calor de la vía KEGG metabolismo del piruvato del desarrollo de fruto de *Opuntia albicarpa* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

Mientras que en *O. joconostle* los genes detectados de la vía del metabolismo del piruvato (Figura 13) tuvieron alta expresión en T3 y baja en T4 y T5: PPD (OJ094593, OJ020915), PPCA (OJ064251, OJ030086), MD1 (OJ023352), IPMSA (OJ094858) y accD (OJ011872).

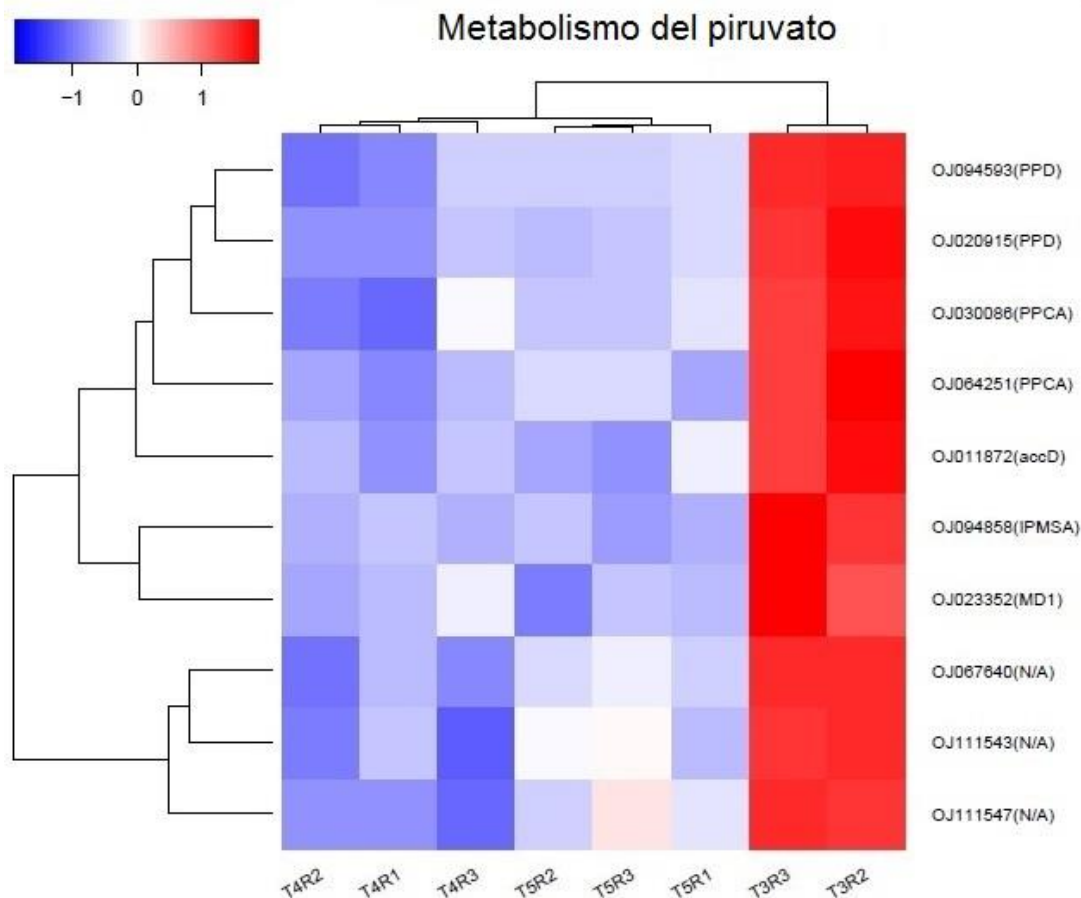


Figura 13: Mapa de calor de la vía KEGG metabolismo del piruvato del desarrollo de fruto de *Opuntia joconostle* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

Metabolismo de glioxilato y dicarboxilato

En esta vía *O. albicarpa* (Figura 14) presentó genes que en T3 tuvieron baja expresión y en T4 y T5 se sobreexpresaron: CCL9 (OP101781, OP101780, OP101778, OP054984), fmdA (OP023879), SPAC869.04 (OP023889) y AAE3 (OP054985); y genes cuya expresión fue alta en T3 y baja en T4 y T5: At3g47520 (OP091027), SHM4 (OP154342), CAT1 (OP027390), GLYK (OP015424), CIT (OP002961), GDCSH (OP156578), RBCS2 (OP012409), RBCS1 (OP012407), GDH2 (OP071814), OsI_09857 (OP027389), GDCSP (OP092638, OP092636), RBCS3 (OP012412), CAT2 (OP027387, OP114696), PGLP1A (OP072577) y rbcL (OP071950).

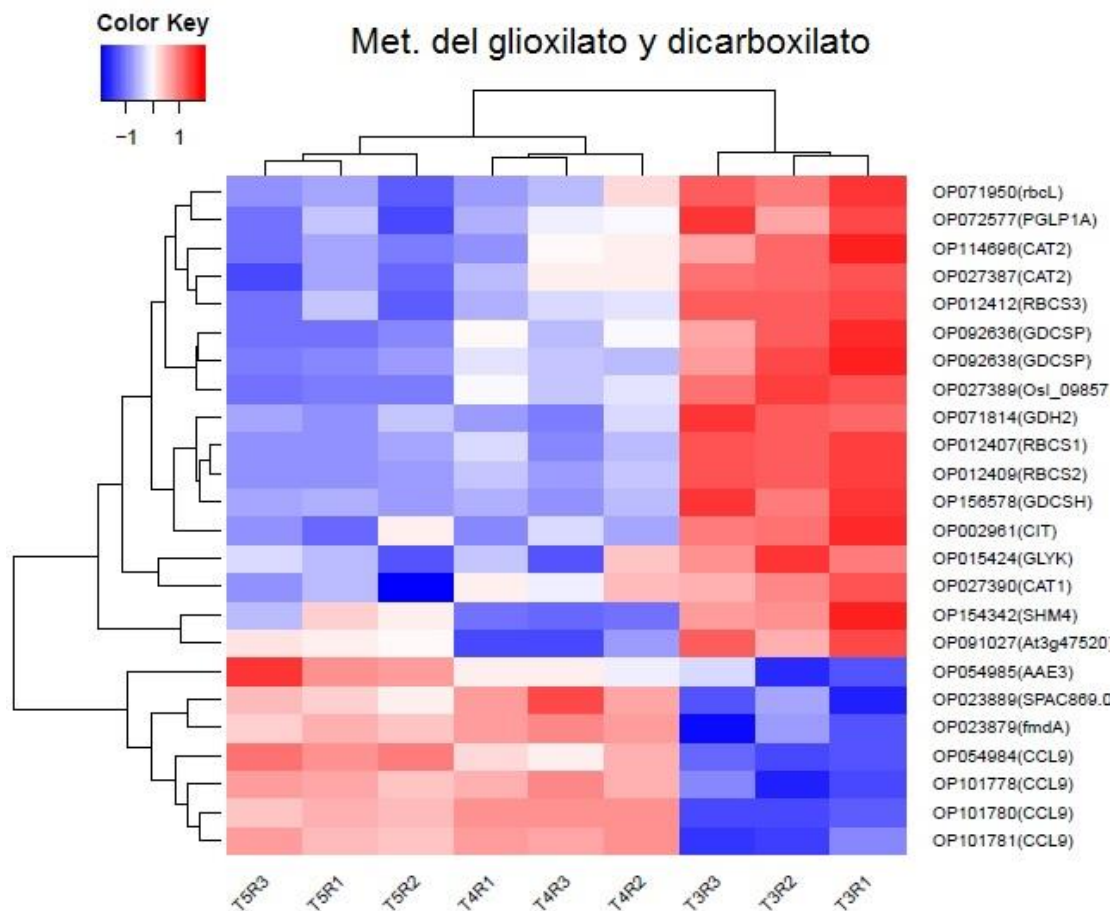


Figura 14: Mapa de calor de la vía KEGG metabolismo del glioxilato y dicarboxilato del desarrollo de fruto de *O. albicarpa* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.
Fuente: Elaboración propia.

Para *O. joconostle* los genes cuantificados en la vía del metabolismo de glioxilato y dicarboxilato (Figura 15) tuvieron alta expresión en T3 y baja en T4 y T5: MD1

(OJ023352), rbcL (OJ051779, OJ051780), FdGOGAT (OJ056928), ACO3 (OJ131101), SHM7 (OJ097124), GDCSP (OJ060512) y AAE3 (OJ024149).

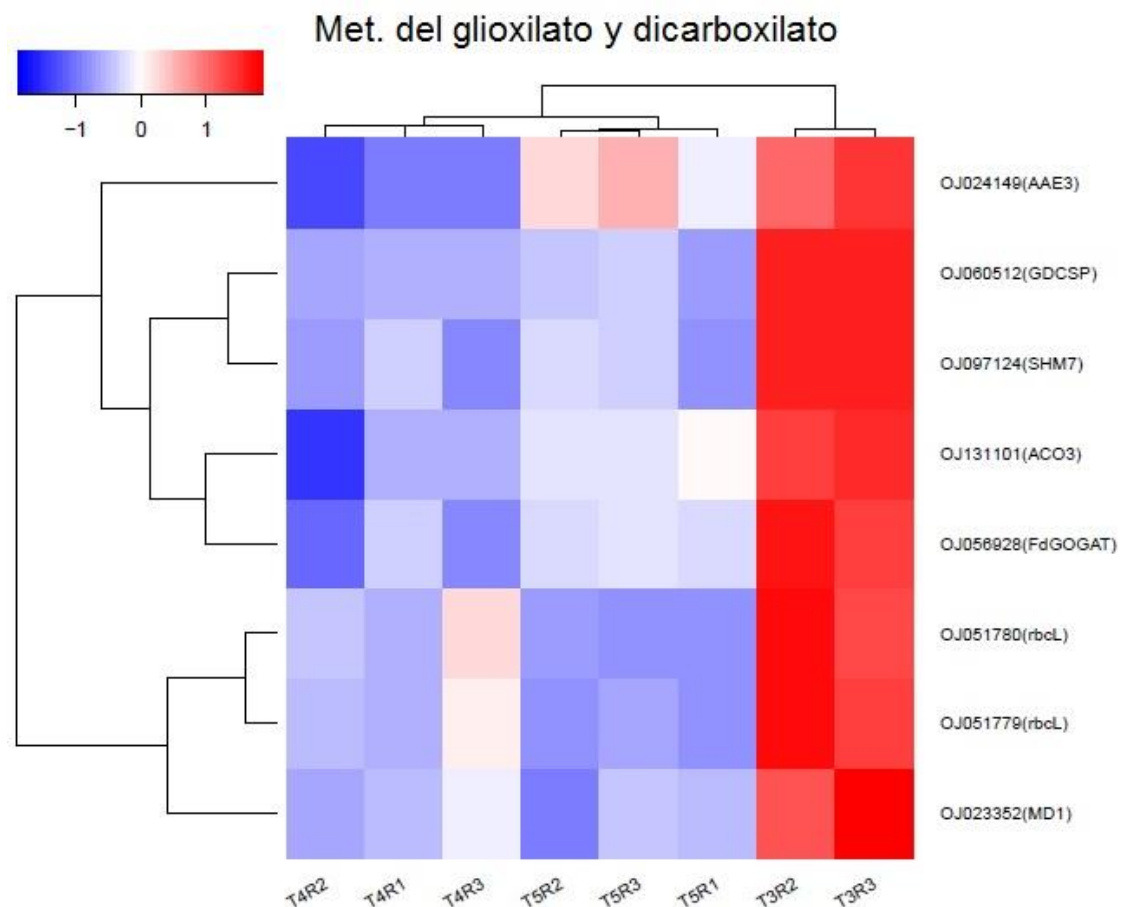


Figura 15: Mapa de calor de la vía KEGG metabolismo del glioxilato y dicarboxilato del desarrollo de fruto de *Opuntia joconostle* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.
Fuente: Elaboración propia.

Metabolismo de fructosa y manosa

En esta vía para *O. albicarpa* se detectaron genes que en T3 estaban bajoexpresados y en T4 y T5 sobreexpresados: PFK6 (OP085151), FBA3 (OP075106), y XYLA (OP152586, OP027977); otros genes presentaron baja expresión en T3 y alta en T4 y T5: FBA2 (OP064628, OP064630), CFBP1 (OP089913), PFK3 (OP085149), TPI (OP132697), y At3g59480 (OP163884); y genes con alta expresión en T3, baja en T4 y alta en T5: At5g51830 (OP038818) y At1g50460 (OP035155) (Figura 16). En *O. joconostle* únicamente se

encontraron dos genes cuya expresión fue alta en T3 y baja en T4 y T5 (PFP-BETA1 y PFK7)

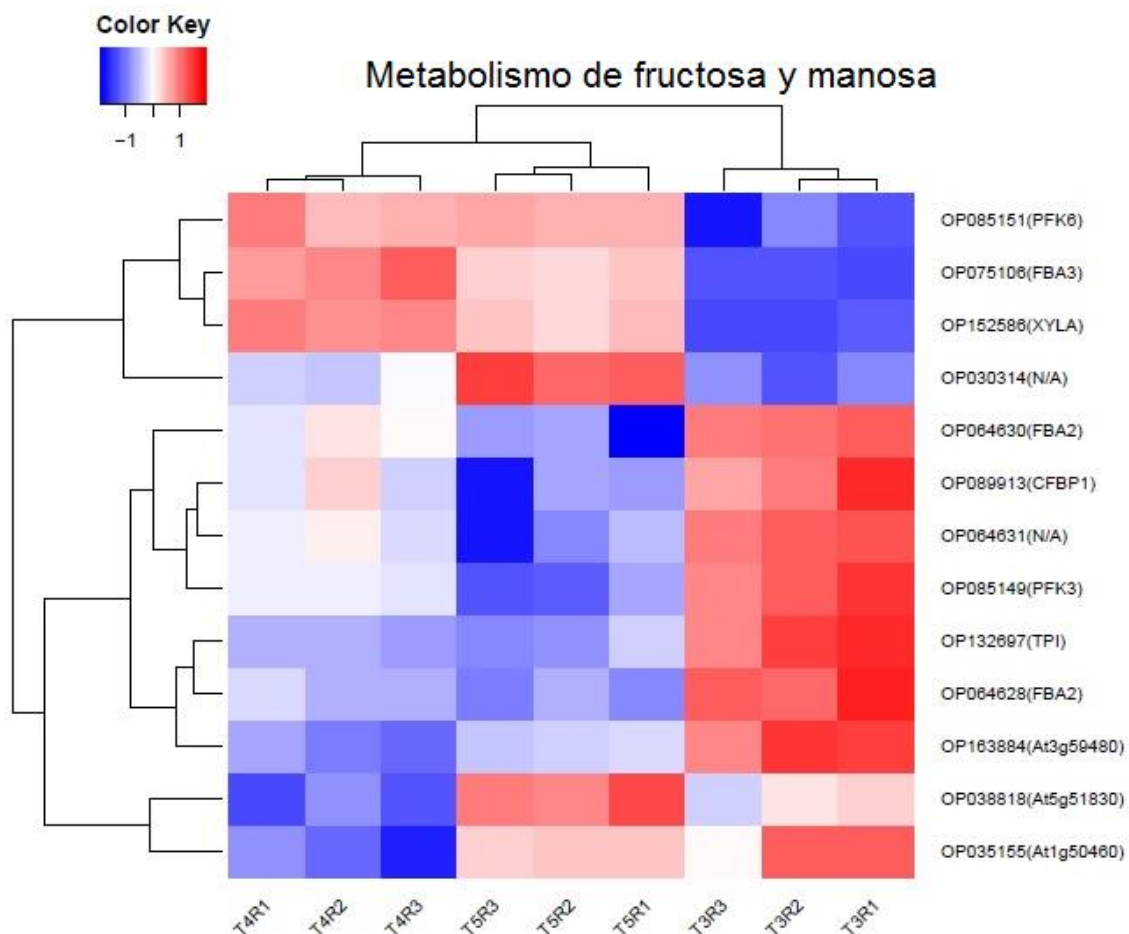


Figura 16: Mapa de calor de la vía KEGG metabolismo fructosa y manosa del desarrollo de fruto de *Opuntia albicarpa*. (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

Vía biosíntesis de flavonoides

Para *O. albicarpa* se cuantificaron genes bajoexpresados en T3 y sobreexpresados en T4 y T5: CHI (OP000217) y CYP75B2 (OP040720); genes con alta expresión en T3 y baja en T4 y T5: CYP98A2 (OP160423), CCOAOMT (OP023778, OP015161) y CYP73A16 (OP073728); y el gen FHT (OP095543) tuvo alta, baja y alta expresión en T3, T4 y T5, respectivamente (Figura 17).

Mientras que para *O. joconostle* el gen CHS (OJ127439) tuvo alta expresión en T3 y baja expresión en T4 y T5.

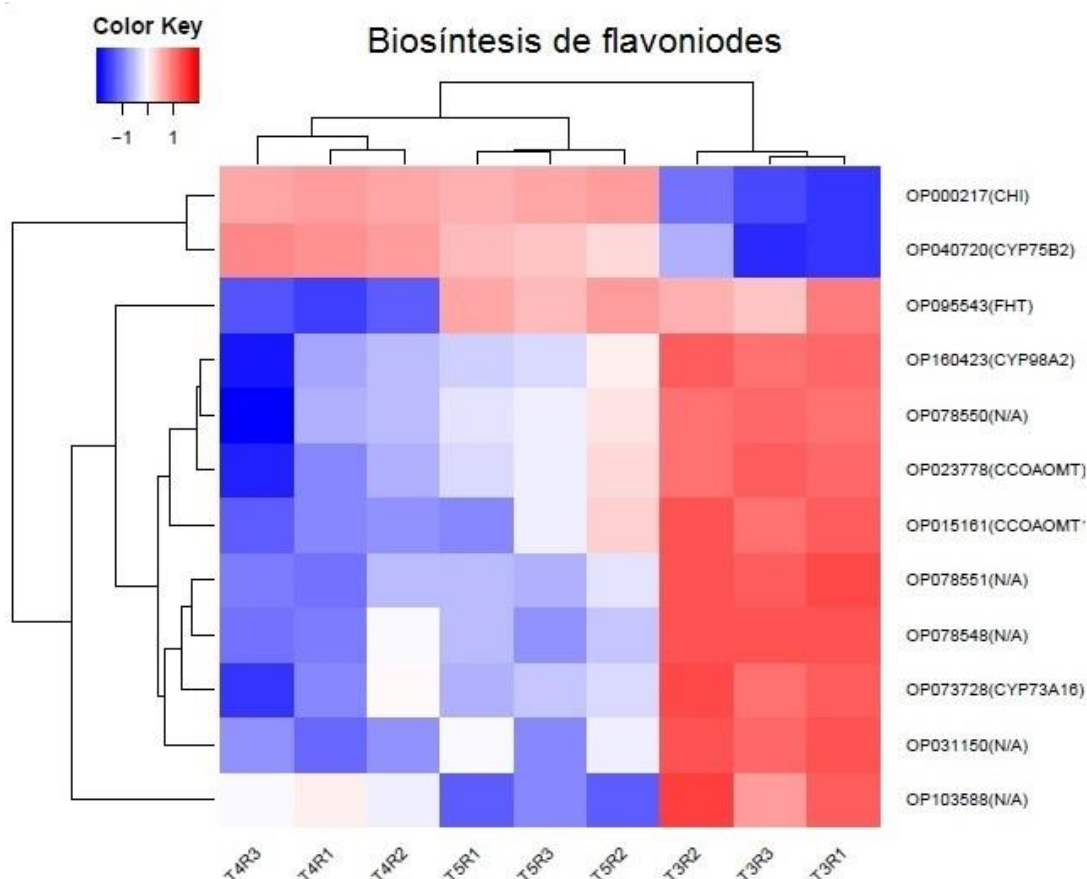


Figura 17: Mapa de calor de la vía KEGG biosíntesis de flavonoides del desarrollo de fruto de *Opuntia albicarpa* (T3: 60 días después de antesis, T4: inicio de maduración y T5: fruto maduro). En base a la puntuación Z-score de los conteos normalizados de los DET.

Fuente: Elaboración propia.

Proceso biosintético de etileno

En el Proceso biosintético de etileno, para *O. albicarpa* el gen ACS2 (OP095274) tuvo baja expresión en T3 y alta expresión en T4 y T5, mientras que el gen ACO (OP039114, OP039115 y OP039116) tuvo alta, baja y alta expresión en T3, T4 y T5, respectivamente. Para *O. joconostle* únicamente se detectó la participación del gen ACO3 (OJ131101) que tuvo alta expresión en T3 y baja expresión en T4 y T5.

6.6. Discusión

Debido a la importancia de *O. albicarpa* y *O. joconostle*, el análisis transcriptómico realizado durante el desarrollo y maduración del fruto proporciona información valiosa para comprender mejor la biología de estas especies en particular.

Filtrado de datos y ensamble *de novo*

El menor número de lecturas obtenido fue en *O. joconostle*, lo cual se puede atribuir a las condiciones experimentales y al método de extracción, ya que de acuerdo Ferriol-Marchena et al. (2015), el Trizol puede no resultar adecuado para la extracción de ARN probablemente por el alto contenido de polisacáridos y polifenoles. Así mismo, Sedano y Carrascal (2012) mencionaron que el alto número de lecturas generado por la secuenciación de Illumina incrementa la cobertura y puede permitir obtener la secuencia de todo el transcrito.

El ensamble del transcriptoma y el ensamble representativo tuvo mayor número de transcritos en *O. albicarpa* esto debido al mayor número de lecturas de la secuenciación. En contraste con el ensamble obtenido en plantas CAM, Mallona et al. (2011) en *Opuntia ficus-indica* encontraron un total de 43,066 contigs; Gross et al. (2013) reportaron 20,4530 y 128,869 contigs en *Agave tequilana* y *Agave deserti*, respectivamente; Cervantes-Pérez et al. (2018) generaron un ensamble con 170,844 transcritos a partir de los datos de hojas, raíces y callos en *Agave salmiana*; Wu et al. (2022) obtuvieron un ensamble de 95,412 unigenes en el desarrollo de flor de pitahaya; Zhang et al. (2022) indicaron un ensamble de 261,468 transcritos y 150,568 unigenes en el desarrollo del fruto de pitahaya; Valadez-Moctezuma et al. (2023) con la tecnología MACE (Massive Analysis of cDNA Ends) en *O. ficus-indica*, *O. robusta* y *O. joconostle* obtuvieron un ensamble de 8383 (GC:40.1%), 7890 (GC: 40.11%) y 5300 (GC:39.9%) transcritos, respectivamente. Las tasas de alineación obtenidas (*O. albicarpa*= 95.97 % *O. joconostle*= 96.82 %) nos indica cuántas secuencias han sido alineadas al transcriptoma y con ello la calidad del ensamble.

Anotación funcional

En *O. albicarpa* el porcentaje de transcritos que tuvieron coincidencia en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot fue 11.29 % para Blastx y 34.01 % para Blastp; mientras que en *O. joconostle* fue de 15,91 % para Blastx y 37.38 % para Blastx. Al respecto, Mallona et al. (2011) detectaron en *Opuntia ficus-indica* 29,835 contigs con aciertos BLAST; Gross et al. (2013) obtuvieron en *Agave tequilana* y *Agave deserti* secuencias de alrededor de 35,000 proteínas; Cervantes-Pérez et al. (2018) identificaron 40,644 marcos de lectura abierta (ORF) y 12,209 genes en *Agave salmiana*; Zhou et al. (2020) identificaron 44,263 unigenes anotados en pitahaya;; Zheng et al. (2021) localizaron 28,992 genes codificadores de proteínas en pitahaya; Wu et al. (2022) reportaron que 18,564 y 18,483 unigenes coincidían en Pfam y SwissProt para flores de pitahaya; Zhang et al. (2022) en pitahaya detectaron 40,461 unigenes con coincidencia en la base de datos de proteínas no redundantes del NCBI. Cabe mencionar que la mayor parte de las proteínas anotados con Blastp y Blastx coindicen en ambas especies (Figura 1).

El gran número de vías KEGG y términos GO identificados en el análisis EggNOG-mapper, indican que los transcriptomas ensamblados contienen genes funcionalmente diversos. Al respecto, Valadez-Moctezuma et al. (2022) en *O. ficus-indica*, *O. robusta* y *O. joconostle* reportaron 282 vías KEGG y 2,793 términos GO, pero el número de transcritos fue menor; y Zheng et al., (2021) en pitahaya detectaron que 21,655 proteínas fueron anotadas por eggNOG, 9,920 de ellas se asignaron a vías KEGG y 10,093 a términos GO.

Análisis de expresión diferencial y análisis KEEG

O. albicarpa presentó el mayor número de transcritos expresados diferencialmente, lo cual puede ser atribuido a que durante la maduración de estos frutos se sintetizan azúcares, flavonoides y diversos metabolitos secundarios, esto se ve reflejado un mayor número de términos GO y vías KEGG enriquecidas significativamente (metabolismo de carbohidratos, biosíntesis de metabolitos secundarios, vías metabólicas, biosíntesis de flavonoides y biosíntesis de aminoácidos). Mientras que en *O. joconostle* el fruto maduro es ácido, lo que podría explicar el menor número de transcritos expresados

diferencialmente y en consecuencia un menor número de vías KEGG y términos GO enriquecidos.

En ambas especies, el contraste T3 vs T4 registró el mayor número de DET, lo que indica que el periodo entre T3 y T4 manifiesta los cambios transcripcionales más dinámicos, lo cual está relacionado con el crecimiento acelerado del fruto; al respecto, Wu et al. (2020) identificaron un mayor número de DEG en R2_vs_W2 (25 días después de polinización) con 11,317 DEG regulados al alza y 4,788 regulados a la baja en pitaya de pulpa roja y de pulpa blanca. Así mismo, Wu et al. (2022) encontraron 1,492 DEG superpuestos entre las últimas cuatro etapas del desarrollo de la flor de pitahaya.

El mayor número de términos GO corresponde a la categoría de procesos biológicos. Al respecto, Valadez-Moctezuma et al. (2022) al realizar comparación de frutos de *O. ficus-indica* vs *O. robusta*, *O. ficus-indica* vs *O. joconostle* y *O. joconostle* vs *O. robusta* detectaron que la mayor parte de términos GO se clasificaron como procesos biológicos. De las vías KEGG enriquecidas en el presente estudio, Valadez-Moctezuma et al. (2022) reportaron coincidencias en *O. ficus-indica*, *O. robusta*, *O. joconostle*: vías metabólicas, biosíntesis de metabolitos secundarios, metabolismo del carbono, biosíntesis de aminoácidos y glucólisis/gluconeogénesis.

Vías del metabolismo de carbohidratos

Terán et al. (2014), detectaron que los sólidos solubles totales y azúcares totales aumentan significativamente en el transcurso de la maduración del fruto de *Opuntia*. Zenteno-Ramírez et al. (2015) en frutos de *Opuntia albicarpa* determinaron 14.55 mg mL⁻¹ de azúcares totales (glucosa=8.14 mg mL⁻¹, fructosa=6.39 mg mL⁻¹ y sacarosa=0.01 mg mL⁻¹); así mismo, Reyes-Ocampo et al. (2019) en mucílago de *Opuntia ficus-indica* cuantificaron ramnosa (20.26 %), ácido galacturónico (13.27 %), arabinosa (12.54 %), glucosa (12.24 %), galactosa (8.89 %), manosa (8.31 %), xilosa (6.85 %) y fucosa (1.6 %). Por lo anterior, se analizaron las vías del metabolismo de los carbohidratos en este estudio.

De las vías del metabolismo de carbohidratos enriquecidas en frutos de *O. albicarpa* y *O. joconostle*, Valadez Moctezuma et al. (2022) detectaron las vías metabolismo de amino-azúcares y nucleótidos de azúcar y metabolismo de galactosa en cladodios y frutos maduros de tres especies de *Opuntia*.

En las vías del metabolismo de carbohidratos, para fruto maduro de tuna se detectaron genes sobreexpresados (BGLU12, TPPA, TPS7, TPPG, BAM2, PFK6, FBA3, XYLA, AGAL3 y GALM) y genes bajoexpresados (ADG2, PGMP, WAXY, TPS9, SPS, BGLU44, SS1, SS, DPEP, PFK3, GOLS2, AGAL1, RFS, FBA2, CFBP1 y TPI); mientras que en fruto maduro de xoconostle los genes detectados tuvieron baja expresión (SS, SS4, TPS5, DPE2, AMY3, AGPS1, AAE3, ACO3, MD1, rbcL, SHM7, GDCSP, PPD, PPCA, accD y IPMSA); lo cual explica la acidez del fruto maduro de xoconostle.

En el metabolismo de carbohidratos, diversas investigaciones han reportado los genes involucrados: Para la vía del metabolismo del almidón y la sacarosa, Cortés-Sierra et al. (2015) en yuca identificaron patrones de expresión génica diferencial para genes de almidón como sucrose synthase (SS), beta-amylase (BAM2 y BAM3) y granule-bound starch synthase (WAXY=GBSS); Zhang et al. (2022) detectaron 17 genes involucrados en esta vía para pitahaya, donde VAI, NI y SS son cruciales para la acumulación de azúcar; Wu et al. (2022) encontraron que trehalosa-fosfato (TPS) y almidón sintasa (SS1, SS) participan en el transporte de carbohidratos y tuvieron una expresión diferencial significativa durante el crecimiento de yemas florales y flores en pitaya. La vía del metabolismo de piruvato fue estudiada en kiwi por Abid et al. (2022), donde identificaron genes como piruvato quinasa (PK), L-lactato deshidrogenasa (LDH), piruvato descarboxilasa (PDC), aldehído deshidrogenasa (ALDH), acetil-coenzima A sintetasa (CoA) y piruvato deshidrogenasa (PDH), esta vía confiere confieren tolerancia al estrés salino. Para la vía metabolismo de fructosa y manosa, Hai-Shun et al. (2020) en *Lolium perenne* cuantificaron los genes fructose-bisphosphate aldolase (FBA2 y FBA3) y 6-phosphofructokinase (PFK3 y PFK6).

Vía de biosíntesis de flavonoides

En relación con la biosíntesis de flavonoides, Fernández-López et al. (2010) identificaron a los flavonoides miricetina y luteolina, quercetina, isoramnetina y kaempferol en frutos de *Opuntia*. En el presente estudio se detectó flavonoide 3'-monooxigenasa (CYP75B2), el cual participa en la síntesis de quercetina. Valadez-Moctezuma et al. (2022), también cuantificaron la expresión diferencial del gen chalcone-flavonone isomerase (CHI) en tres especies de *Opuntia*, el cual está implicado en la ruta biosintética de todas las clases de flavonoides.

Proceso biosintético de etileno

Los genes ACS2 y ACO detectados en *O. albicarpa* participan en dos pasos específicos de la biosíntesis de etileno; de acuerdo con Houben y Van de Poel (2019), en una primera reacción la S-adenosil-L-metionina (SAM) se convierte en ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) mediante la ACC-sintasa (ACS), posteriormente, la ACC-oxidasa (ACO) convierte el ACC en etileno. Mientras que el gen ACO3 (aconitate hydratase 3) cuantificado en *O. joconostle* juega un papel en la regulación de la resistencia al estrés oxidativo y la muerte celular, lo que podría explicar que el fruto de xoconostle maduro permanezca mucho tiempo en la planta.

6.7. Conclusiones

Los resultados sobre el transcriptoma de *O. albicarpa* y *O. joconostle* proporcionan información valiosa para comprender mejor los procesos moleculares que regulan su metabolismo, y pueden ser utilizados para estudios genéticos sobre el género *Opuntia*. El estudio transcriptómico en tuna y xoconostle reveló genes específicos involucrados en vías metabólicas importantes en el desarrollo y maduración de estos frutos; en tuna se detectaron genes involucrados en las vías del metabolismo de carbohidratos sobre expresados diferencialmente en fruto maduro (BGLU12, TPPA, TPS7, TPPG, BAM2, PFK6, FBA3, XYLA, AGAL3 y GALM) y genes cuya expresión tendió a la baja (ADG2, PGMP, WAXY, TPS9, SPS, BGLU44, SS1, SS, DPEP, PFK3, GOLS2, AGAL1, RFS, FBA2, CFBP1 y TPI); mientras que para xoconostle la

expresión de los genes del metabolismo de carbohidratos fue a la baja en fruto maduro (SS, SS4, TPS5, DPE2, AMY3, AGPS1, AAE3, ACO3, MD1, rbcL, SHM7, GDCSP, PPD, PPCA, accD y IPMSA). En la biosíntesis de flavonoides para tuna se detectaron genes que en fruto maduro tuvieron alta expresión (CHI, CYP75B2 y FHT) y genes con baja expresión (CYP98A2, CCOAOMT y CYP73A16; para xoconostle el gen CHS bajó su expresión en fruto maduro. En el proceso biosintético de etileno el gen ACO3 fue detectado en xoconostle, este regula la resistencia al estrés oxidativo y la muerte celular. La comparación de los perfiles transcriptómicos entre tuna y xoconostle podría ayudar a identificar genes específicos relacionados con características agronómicas y de calidad de los frutos.

6.8. Literatura citada

- Abid, M., Gu, S., Zhang, Y. J., Sun, S., Li, Z., Bai, D. F. Sun, L., Qi, X. J., Zhong Y. P. & Fang, J. B. (2022). Comparative transcriptome and metabolome analysis reveal key regulatory defense networks and genes involved in enhanced salt tolerance of *Actinidia* (kiwifruit). *Horticulture Research*, 9, Article uhac189. <https://doi.org/10.1093/hr/uhac189>
- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., Van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltemann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A. & Blankenberg, D. (2018). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018update. *Nucleic Acids Research*, 46, 537–544. <https://doi.org/10.1093/nar/gky379>
- Andrews, S. (2012). FastQC A Quality Control tool for High Throughput Sequence Data. Recuperado el 15 de febrero de 2022 de <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114-2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bu, D., Luo, H., Huo, P., Wang, Z., Zhang, S., He, Z., Wu, Y., Zhao, L., Liu, J., Guo, J., Fang, S., Cao, W., Yi, L., Zhao, Y. & Kong, L. (2021). KOBAS-i: intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, 49(1):317–325, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab447>
- Cervantes-Pérez, S. A., Espinal-Centeno, A., Oropeza-Aburto, A., Caballero-Pérez, J., Falcon, F., Aragón-Raygoza, A., Sánchez-Segura, L., Herrera-Estrella, L., Cruz-Hernández, A. & Cruz-Ramírez, A. (2018). Transcriptional profiling of the CAM plant *Agave salmiana* reveals conservation of a genetic program for regeneration. *Developmental Biology* 442(1), 28-39 <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2018.04.018>
- CONABIO. (2023). Nopales. Diversidad natural y cultural. Recuperado el 22 de febrero de 2023 de <https://www.biodiversidad.gob.mx/diversidad/alimentos/nopales>
- Cortés-Sierra, S., Chavarriaga, P., Ceballos, H. & López-Carrascal, C. (2015). Evaluación de la expresión de genes implicados en la biosíntesis de almidón en diferentes variedades de yuca. *Acta Biológica Colombiana* 20(2), 37-46. <https://doi.org/10.15446/abc.v20n2.42875>
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S. & Kaller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Ferriol-Marchena, X. R., Luis-Pantoja, M., Ruiz, Y., Hernández-Rodríguez, L., & Pérez-Castro, J. M. (2015). Comparación de métodos de extracción de ARN y ADN de hojas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) para ensayos de reacción en cadena de la polimerasa. *CitriFrut*, 32(1), 23-30. <https://www.researchgate.net/publication/303752147>

- Fu, L., Niu, B., Zhu, Z., Wu, S., & Li, W. (2012). CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. *Bioinformatics*, 28(23), 3150–3152. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts565>
- Gallegos-Vázquez, C., Scheinvar, L., Núñez-Colín, C. A. & Mondragón-Jacobo, C. (2012). Morphological diversity of xocostles (*Opuntia* spp.) or acidic cactus pears: a Mexican contribution to functional foods. *Fruits* 67(2), 109-120. <https://doi.org/10.1051/fruits/2012001>
- Giovannoni, J. (2001). Molecular Biology of Fruit Maturation and Ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 725–749. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.725>
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B. W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N. & Regev, A. (2011). Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*, 29(7), 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>
- Gross, S. M., Martin, J. A., Simpson, J., Abraham-Juarez, M. J., Wang, Z. & Visel, A. (2013). De novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. *BMC Genomics* 14(1), 563. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-563>
- Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N. & Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols*, 8(8), 1494–1512. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.084>
- Hai-Shun, X., Su-Ming, G., Lin, Z. & Jin-Cheng, X. (2020). Growth, physiological and transcriptomic analysis of the perennial ryegrass *Lolium perenne* in

- response to saline stress. *Royal Society Open Science*, 7(7), Article 200637. <http://doi.org/10.1098/rsos.200637>
- Houben, M. & Van de Poel, B. (2019) 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase (ACO): The Enzyme That Makes the Plant Hormone Ethylene. *Frontiers in Plant Science*, 10, 695. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00695>
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H., Mende, D. R., Letunic, I., Rattei, T., Jensen, L. J., Von Mering, C. & Bork, P. (2019) eggNOG 5.0: a hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47, D309–D314. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1085>
- Law, C. W., Chen, Y., Shi, W., & Smyth, G. K. (2014). Voom: precision weights unlock linear model analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology* 15(2), R29 <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-2-r29>
- Liaw, A., Gentleman, R., Maechler, M., Huber, W., Warnes, G. (n.d.). heatmap.2: Enhanced Heat Map. Recuperado el 20 de noviembre de 2023 <https://rdocumentation.org/packages/gplots/versions/3.1.3/topics/heatmap.2>
- Mallona, I., Egea-Cortines, M. & Weiss, J. (2011). Conserved and Divergent Rhythms of Crassulacean Acid Metabolism-Related and Core Clock Gene Expression in the Cactus *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiology*, 156(4), 1978–1989. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179275>
- Mendez-Llorente, F., Ramírez-Lozano, R. G., Aguilera-Soto, J. I. & Arechiga-Flores, C. F. (2011). Performance and nutrient digestion of lambs fed incremental levels of wild cactus (*Opuntia leucotrichia*). *Journal of Applied Animal Research*, 39(3), 248–251. <https://doi.org/10.1080/09712119.2011.588406>
- Moeder, W., Del Pozo, O., Navarre, D. A., Martin, G. B. & Klessig, D. F. (2007). Aconitase plays a role in regulating resistance to oxidative stress and cell death in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana. *Plant Molecular Biology* 63(2):273-87. <https://doi.org/10.1007/s11103-006-9087-x>

- Ochoa-Alejo, N., Gómez-Jiménez, M. C., & Martínez, O. (2024). Transcriptomics of fruit growth, development and ripening. *Frontiers in Plant Science*, 15, <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1399376>
- Osorio, S., & Fernie, A. R. (2013). Biochemistry of fruit ripening. In G. B. Seymour, M. Poole, J. J. Giovannoni & G. A. Tucker (Eds). *The molecular biology and biochemistry of fruit ripening*, 1-19. <https://doi.org/10.1002/9781118593714.ch1>
- Reyes-Ocampo, I., Córdova-Aguilar, M. S., Guzmán, G., Blancas-Cabrera, A. & Ascanio, G. (2019). Solvent-free mechanical extraction of *Opuntia ficus-indica* mucilage. *Journal of Food Process Engineering*, 42(1), e12954. <https://doi.org/10.1111/jfpe.12954>
- Sedano, J. C. S., & Carrascal, C. E. L. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, 16(2), 101-113. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209126216009>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V, & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Supek, F., Bošnjak, M., Škunca, N., & Šmuc, T. (2011). REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PloS ONE*, 6(7), Article e21800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021800>
- Terán, Y., García, T., Chaparro, L., Petit, D., Garrido, E., Barazarte, H., Aubeterre, R. D. & Mujica, Y. (2014). Cambios en las características químicas y físicas del fruto de *Opuntia ficus-indica* L. durante la maduración. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 756-765. <https://www.researchgate.net/publication/308925836>
- Torres-Ponce, R. L., Morales-Corral, D., Ballinas-Casarrubias, M. D. L., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). El nopal: planta del semidesierto con aplicaciones en farmacia, alimentos y nutrición animal. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 1129-1142.

- Valadez-Moctezuma, E., Samah, S., Mascorro-Gallardo, J. O., Marbán-Mendoza, N., Aranda-Osorio, G., Flores-Girón, E., Brito-Nájera, G. & Rodríguez de la O, J. L. (2023). The first transcriptomic analyses of fruits and cladodes for comparison between three species of *Opuntia*. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 70, 951–970. <https://doi.org/10.1007/s10722-022-01480-w>
- Wu, Z., Huang, L., Huang, F., Lu, G., Wei, S., Liu, C., Deng, H. & Liang, G. (2022). Temporal transcriptome analysis provides molecular insights into flower development in red-flesh pitaya. *Electronic Journal of Biotechnology*, 58:55-69. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2022.05.005>
- Zenteno-Ramírez, G., Juárez-Flores, B. I., Aguirre-Rivera, J. R., Ortiz-Pérez, M. D., Zamora-Pedraza, C. & Rendón-Huerta, J. A. (2015). Evaluación de azúcares y fibra soluble en el jugo de variantes de tunas (*Opuntia* spp.). *Agrociencia* 49(2), 141-152.
- Zhang, Z., Xing, Y., Ramakrishnan, M., Chen, C., Xie, F., Hua, Q., Chen, J., Zhang, R., Zhao, J., Hu, G. & Qin, Y. (2022). Transcriptomics-based identification and characterization of genes related to sugar metabolism in ‘Hongshuijing’ pitaya. *Horticultural Plant Journal*, 8(4), 450-460. <https://doi.org/10.1016/j.hpj.2021.06.004>
- Zheng, J., Meinhardt, L. W., Goenaga, R., Zhang, D., & Yin, Y. (2021). The chromosome-level genome of dragon fruit reveals whole-genome duplication and chromosomal co-localization of betacyanin biosynthetic genes. *Horticulture Research*, 8, 63. <https://doi.org/10.1038/s41438-021-00501-6>
- Zhou, Z., Gao, H., Ming, J., Ding, Z., Lin, X. E. & Zhan, R. (2020). Combined Transcriptome and Metabolome analysis of Pitaya fruit unveiled the mechanisms underlying Peel and pulp color formation. *BMC Genomics*, 21,734 <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07133-5>

VII. CONCLUSIONES GENERALES

Se proporciona información valiosa para una comprensión detallada de los procesos moleculares que regulan el metabolismo del desarrollo de frutos de *Opuntia albicarpa* y *Opuntia joconostle*. Lo que beneficia la comprensión de la biología de estas especies en particular.

Los estudios revelaron la expresión de genes específicos relacionados con importantes vías metabólicas. En el metabolismo de carbohidratos: para fruto maduro de tuna, genes sobreexpresados (BGLU12, TPPA, TPS7, TPPG, BAM2, PFK6, FBA3, XYLA, AGAL3 y GALM) y subexpresados (ADG2, PGMP, WAXY, TPS9, SPS, BGLU44, SS1, SS, DPEP, PFK3, GOLDS2, AGAL1, RFS, FBA2, CFBP1 y TPI); en fruto maduro de xoconostle, genes subexpresados (SS, SS4, TPS5, DPE2, AMY3, AGPS1, AAE3, ACO3, MD1, rbcL, SHM7, GDCSP, PPD, PPCA, accD y IPMSA). En la biosíntesis de flavonoides: para fruto maduro de tuna, genes sobreexpresados (CHI, CYP75B2 y FHT) y subexpresados (CYP98A2, CCOAOMT y CYP73A16); en fruto maduro de xoconostle el gen CHS subexpresado. En el proceso biosintético de etileno: en fruto maduro de tuna genes con alta expresión (ACS2 y ACO) y para fruto maduro de xoconostle se detectó el gen ACO3 con baja expresión. Estos genes son cruciales para el desarrollo y la maduración de los frutos de xoconostle y tuna.

La comparación de perfiles transcriptómicos entre xoconostle y tuna permite identificar diferencias y similitudes en la expresión génica entre estas especies. Este enfoque puede ayudar a descubrir genes específicos relacionados con características agronómicas y de calidad de los frutos, lo que tiene implicaciones importantes para la mejora genética y la selección de genotipos.

Los resultados proporcionan una base sólida y completa para futuros estudios genéticos y moleculares en el género *Opuntia*.