



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE VIRUS
ASOCIADOS A MANCHAS CLORÓTICAS EN DIFERENTES ESPECIES DE
NOPAL (*Opuntia*), ZAPOTITLÁN, PUEBLA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

Juan José García Gutierrez

Director de Tesis: **Dr. Rodolfo De La Torre Almaráz**

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Leticia y Jesús, sin el apoyo de ambos este trabajo no sería posible.

A mi hermana Ailin que siempre está presente en los momentos más difíciles.

A mi sobrino Ángel Miguel que aunque todavía eres un bebé me diste motivación para continuar.

A mis amigos por el apoyo incondicional, los que continúan formando parte de mí vida y también a los que formaron parte del proceso.

A Gloria y Claudia, debido a que estoy seguro que sin su apoyo, guía, comprensión, paciencia, consejos, tolerancia y sobre todo su amistad, no hubiese terminado la carrera y por ende no habría escrito este trabajo.

A mi tutor Dr. Rodolfo De La Torre Almaraz por su asesoría, apoyo, comentarios, sugerencias, enseñanzas.

A los miembros de mi comité, Dr. Jorge E. Campos Contreras, Dra. Martha Martínez García, M. en C. Alejandro Cruz Monsalvo Reyes y M. en C. David Vargas por su apoyo y comentarios hacia mi trabajo.

Al Dr. Héctor Salgado Ortiz por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.

Índice

INTRODUCCIÓN	5
REVISIÓN DE LITERATURA	6
Enfermedades en Nopal	6
Características generales de los virus	7
Virus reportados en Cactáceas	7
Métodos de diagnóstico para la detección de agentes patógenos	8
Microscopia electrónica de transmisión	8
Análisis electroforético por RNAdc de origen viral	8
Ensayo inmuno-absorbente ligado a la enzima, ELISA	9
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	9
Clonación	10
Secuenciación	10
OBJETIVO	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
Obtención de muestras	11
Extracción de ácidos nucleicos totales por método modificado de Dellaporta	11
Ensayos de Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	11
Purificación de bandas, secuenciación y análisis-comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral con secuencias disponibles en el GenBank	12
RESULTADOS	13
Diagnóstico de virus por ensayos de Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)	13
Análisis y comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral con secuencias disponibles en el GenBank	15
DISCUSIÓN	18

CONCLUSIÓN.....	20
PERSPECTIVAS	21
REFERENCIAS	22

INTRODUCCIÓN

El género *Opuntia* cuenta con el mayor número de especies en la familia de las cactáceas (Fam: *Cactaceae*), aproximadamente 150 de las cuales se distribuyen naturalmente en América, desde Canadá hasta Argentina. En México se reconocen 93 especies, donde es conocido popularmente como nopal (Guzmán, et al.; 2003; Hunt, et al. 2006; Daniloski, et al., 2022).

De las 93 especies nativas mexicanas de *Opuntia*, 70 son endémicas de México, encontrándose un gran número en el valle de Tehuacán-Cuicatlán, el cual cuenta con una alta diversidad biológica (Villaseñor, et al., 1990; Rzedowski, 1991). Por mencionar algunas: *O. aciculata*, *O. azurea*, *O. cochinerana*, *O. leucotricha*, *O. hyptiacantha*, *O. streptacantha*, *O. megacantha*, *O. durangensis*, *O. phaeacantha*, *O. robusta*, *O. parviclada*, *O. depressa*, *O. huajuapensis*, *O. pilifera* (Reyes-Agüero, et al., 2009; Scheinvar, et al., 2011; Arias, et al., 2012).

El uso que se les suele dar es el consumo de las tunas como fruta y de los cladodios como verdura además de usos medicinales en el control de la diabetes, colesterol, hipoglucemiantes, forraje para alimentar ganado vacuno y caprino, delimitación del suelo como cercas vivas, regeneración y estabilidad del suelo, cosméticos, fertilizantes, adhesivos, etc (Ávalos-Huerta, et al., 2013; Flores, 2003). En su rango nativo, *Opuntia* proporciona alimento a innumerables herbívoros, incluyendo tortugas, iguanas, pájaros, conejos, venados, murciélagos, perezosos, ardillas y coyotes (Majure, et al., 2012).

Sin embargo, se ve afectado por diversos problemas, entre los que destacan las plagas y enfermedades, lo cual podría explicarse al cultivo por esqueje de esta planta disminuyendo así la variabilidad genética y por ende favoreciendo las infecciones. La mayoría de las enfermedades en nopal están asociadas a pudriciones causadas por bacterias y hongos, por tanto, es reducida la información sobre enfermedades causadas por virus. Por lo tanto una identificación eficiente de los virus como agentes causales en las plantas constituye un punto de partida para adoptar medidas adecuadas de control.

En recorridos de campo realizados en Zapotitlán, Puebla, que cuenta con un nivel significativo de diversidad florística y endemismos (Flores-Maya, et. al., 2015) se observaron

pencas con manchas cloróticas, así como manchas irregulares (figura 1). Análisis preliminares de diagnóstico realizados en el Laboratorio de Fitopatología de la UBIPRO (FES IZTACALA-UNAM), no mostraron la presencia de hongos o bacterias asociados a los daños observados, por lo que se sospechó que estos pudieran ser causados por virus.

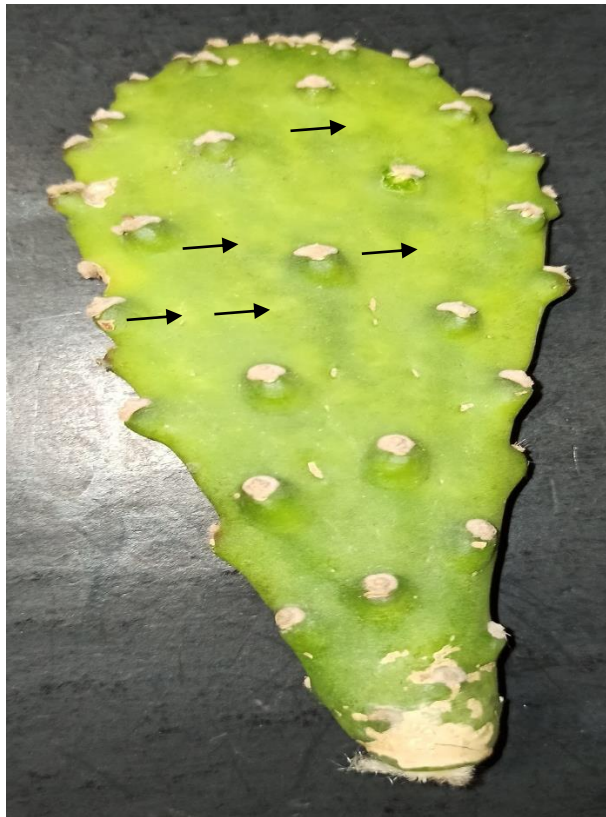


Figura 1. Nopal (*Opuntia parviclada*) con la presencia de manchas cloróticas irregulares, señalados por las flechas.

REVISIÓN DE LITERATURA

Enfermedades en Nopal

Entre las enfermedades de mayor relevancia se encuentran las causadas por hongos que producen pudrición de raíz, tallo y cladodios como por ejemplo *Pythium aphanidermatum* (Rodríguez-Alvarado, et al., 2001) y por otra parte las bacterias que se asocian a pudriciones

blandas, por ejemplo *Pectobacterium sp.* (antes *Erwinia*), *Pseudomonas viridiflora* y *Rhizobium radiobacter* (Campos, 1996, Granata, et. al., 2018).

Otros agentes patógenos reportados que afectan a *Opuntias* y otras plantas son los virus, parásitos intracelulares obligados de DNA o RNA, envueltos en una cápside proteica (Gergerich y Dolja, 2006), estos causan síntomas como mosaicos, moteados, marchitez, lesiones locales cloróticas o necróticas, manchas anilladas necróticas o cloróticas; deformación, pérdidas de tejidos, enanismos, proliferación de hojas; alteraciones en el color de hojas, flores, frutos tallos como calicós, variegados, clorosis o amarillamiento (De la Torre-Almaraz, 2014, Alonso et al., 2015; Salgado-Ortiz, et. al, 2020).

Características generales de los virus

Los virus son parásitos celulares obligados, su genoma está compuesto de moléculas de DNA o RNA de cadena sencilla o doble cadena, resguardado por una cubierta de naturaleza proteica conocida como cápside y en algunos casos se encuentran cubiertos por una envoltura a base de lipoproteínas y espículas de glicoproteínas. Las partículas virales infectan todo tipo de células, eucariotas (vertebrados, invertebrados, plantas y hongos) y procariotas (bacterias y archeas). Los virus utilizan la maquinaria celular de su hospedero para su replicación y posterior producción de más partículas virales (Gergerich y Dolja, 2006).

Virus reportados en Cactáceas

Se han reportado diversas especies de virus que infectan a plantas silvestres y cultivadas de la familia Cactaceae, como el *Carmovirus*, *Saguaro cactus virus* (SCV) reportado en *Carnegiea gigantea* (Milbrath y Nelson, 1972), el *Tospovirus* (familia *Bunyaviridae*), *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) que fue reportado en *Schlumbergera truncata* (Hausbeck y Gildow, 1991) y el Carlavirus, *Cactus virus 2* (CV2) en *Echinopsis chamaecereus f. cristata*, *Echinocereus pectinatus f. cristata*, *Mammillaria elongata f. cristata* y *Eriocereus jusbertii* (Maliarenko y Mudrak, 2013)

Otros virus reportados en cactáceas son los del género *Tobamovirus*, como el *Sammons' Opuntia virus* (SOV), que infecta regularmente a *Opuntia engelmannii*, *O. vulgaris* y *O. basilaris* (Giri y Chessin, 1975), el *Cactus mild mottle virus* (CMMoV) aislado de *Gymnocalycium mihanovichii* y *Opuntia amyclae* (Min et al., 2006; De la Torre, et al., 2007),

el *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) reportado en *Aporocactus flagelliformis*, *O. albicarpa*, *Notocactus leninghausii* f. *cristatus* (Kim et al., 2012; De La Torre et al. 2016b; Park, et al., 2018) y el *Opuntia virus 2* (OV2) reportado en *O. streptacantha*, *O. pilifera*, *O. depressa*, *O. robusta* y *O. ficus-índica* (Salgado-Ortíz, et al. 2020)

Además, también se han reportado con mayor frecuencia los pertenecientes al género *Potexvirus*: el *Cactus virus X* (CVX), *Zygocactus virus X* (ZyVX), *Opuntia virus X* (OpVX) y *Schlumbergera virus X* (SchVX), *Pitaya virus X* (PiVX) los cuales han sido reportados infectando solos o en mezcla en *Echinopsis macrogona*, *Acanthocereus tetragonus*, *Hylocereus undatus*, *Schlumbergera truncata*, *S. bridgesii*, *Opuntia tuna*, *Opuntia cochenillifera*, *Notocactus leninghausii* f. *cristatus*, *Aporocactus flagelliformis*, *Selenicereus undatus* (Izaguirre y Marys, 1996; Koenig, et al., 2004; Liou, et al., 2004; Duarte, et al., 2008; Maliarenko y Mudrak, 2013; Sanches, et al., 2015; De la Torre, 2016; Park, et al., 2018; Park, et al., 2021; Janssen, et al, 2022; Kim, et al., 2023).

Métodos de diagnóstico para la detección de agentes patógenos

Microscopia electrónica de transmisión

Con este equipo se pueden observar la forma y por ende determinar el tamaño de las partículas virales en las células de los tejidos infectados o en macerado de hojas de plantas enfermas. Sin embargo, es común no encontrar partículas virales en los tejidos enfermos además de que no se puede determinar la especie solo por morfología. Es un método de difícil acceso, solo disponible en algunos laboratorios especializados (De la Torre, 2014).

Análisis electroforético por RNAdc de origen viral

El RNA de doble cadena (RNAdc) es producido en plantas infectadas con virus de RNA, estos RNAs son muy resistentes a la degradación enzimática y no es normal encontrarlos en plantas sanas. Durante la replicación del genoma viral de RNA de cadena sencilla en las células de la planta, el RNAdc es producido como un producto intermedio, que corresponde al híbrido de la cadena viral positiva, y su copia complementaria negativa. Este RNAdc es conocido como la forma replicativa, y es el RNAdc que se encuentra más comúnmente, en las células infectadas, a pesar de la existencia de más tipos

de RNAdc presentes en la planta, lo cual hace que el análisis de RNAdc sea un método práctico para el diagnóstico viral. El análisis del electroforético de RNAdc de origen viral en gel de poliacrilamida al 6 %, permite visualizar los componentes del genoma viral y se ha utilizado como un método de diagnóstico para detectar múltiples virus que afectan a plantas, además de ser un método de diagnóstico barato y relativamente rápido, sin embargo, es necesario contar con virus cuyos patrones sean conocidos para emplearlos como un marcador y poder conocer la identidad del virus problema, además de que las condiciones ambientales pueden influir en el virus dentro de la planta y afectar los resultados de la prueba (Valverde, 1990).

Ensayo inmuno-absorbente ligado a la enzima, ELISA

Se realiza la detección de la partícula viral, por medio de la reacción antígeno-anticuerpo, uniendo cualquiera de estos dos reactivos a una enzima, posteriormente se agrega un sustrato y da como resultado una reacción con color que puede ser medida cuantitativamente, existen numerosas variaciones de la ELISA utilizadas para la identificación de virus fitopatógenos, de las cuales el Double Antibody Sandwich ELISA (DAS-ELISA), es el más utilizado. (Schulz y Spire, 1993; Clark, et al., 1977).

Aunque la prueba ELISA es muy sensible para la detección de virus en plantas, comparada con otras técnicas; posee un costo elevado, debido a los anticuerpos específicos. Otro inconveniente radica en la especificidad hacia ciertos virus, y no detectar incluso variantes filogenéticamente relacionadas, por lo que es necesario pruebas adicionales de diagnóstico de enfermedades.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (rt-PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permite amplificar y detectar secuencias específicas del genoma viral, y la retrotranscriptasa inversa ligada a la PCR (rt-PCR), que permite la detección de virus de RNA mediante la transcripción reversa a DNA complementario (cDNA) y la amplificación mediante PCR. Estas técnicas utilizan *primers* específicos que amplifican regiones del genoma viral (Mumford, et al. 2006; Jeong, Ju, y Noh, 2014). A pesar de que las técnicas moleculares como la PCR y la rt-PCR son muy

efectivas en la detección de virus, tienen limitaciones en cuanto a la cantidad de información que pueden obtener. Debido a que solo amplifican una porción del genoma viral, generalmente las regiones conservadas, y no el genoma completo. Además, solo son aplicables a virus previamente conocidos, lo que implica una limitación en la detección de nuevos virus (Jones, et al. 2017).

Clonación

La clonación es el proceso por medio del cual se obtienen múltiples copias de un segmento de DNA de interés, que puede corresponder a un gen o a un segmento del mismo, a los que se les designa como insertos, mediante su incorporación o ligación a un plásmido (elemento extracromosómico bacteriano de DNA de doble cadena). El componente plásmido-inserto, son introducidos a una célula competente o permisiva (regularmente cepas especiales de *Escherichia coli*), es replicado a la par de la célula permisiva, obteniéndose múltiples copias del plásmido-inserto. Posteriormente son separados bioquímicamente el DNA de la bacteria y el complejo plásmido-inserto. Este último puede ser secuenciado utilizando oligonucleótidos específicos que solo amplifican las regiones que flanquean al inserto y al inserto mismo o bien se puede separar el inserto por tratamiento enzimático, dirigido a las regiones flanqueadoras, y secuenciarse. En ambos casos, las secuencias obtenidas tienen que ser analizadas y editadas para eliminar secuencias del plásmido o de los oligonucleótidos que hayan sido incorporadas durante el proceso de clonación (Dubey, 2009).

Secuenciación

La secuenciación Sanger es un método que utiliza DNA de cadena sencilla como templado y utiliza dideoxinucleótidos como terminadores de cadena para producir una escalera de moléculas. La secuenciación de RNA (RNA-Seq) permite examinar la secuencia de virus en plantas debido a que la mayoría de los virus que afectan a plantas poseen un genoma de RNA. La secuenciación ha permitido el descubrimiento de nuevos virus en plantas que no podrían haber sido detectados por las técnicas convencionales, lo que ha llevado a su inclusión como método para la detección de virus en plantas (Pecman, et al. 2017).

Las ventajas de la secuenciación del genoma viral es que es altamente preciso y permite identificar especies, subespecies, y variantes de virus. Su principal desventaja es que requiere reactivos y equipos específicos además de personal altamente entrenado (De la Torre, 2014).

OBJETIVO

Identificar a los posibles virus que afectan a las diferentes especies silvestres del género *Opuntia* de Zapotitlán, Puebla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

Para estos experimentos se utilizó la dermis de los cladodios de *Opuntia depressa*, *Opuntia huajuapensis* y *Opuntia parviclada*, especies silvestres colectadas en Zapotitlán de las Salinas, Puebla y la última en un parque ubicado en Tlalnepantla, Estado de México. El material se mantuvo resguardado a -10°C en el congelador del Laboratorio de Fitopatología de la UBIPRO de la FES Iztacala hasta que se realizó la extracción.

Extracción de ácidos nucleicos totales por método modificado de Dellaporta

Se tomó 0.13 g de tejido de las muestras con la finalidad de reducir los polisacáridos, se realizó la extracción mediante el método modificado de Dellaporta y colaboradores (1983), que consiste en el macerado del tejido con buffer de extracción (Urea 7M, NaCl 0.35M, Tris-base 0.05M, EDTA 0.02M y Lauryl-sarcosina 1%) para la lisis celular. Posteriormente, se separó la fase orgánica mediante la adición de fenol-cloroformo v/v, se agitó la solución para posteriormente centrifugar a 12,000 rpm por 3min. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó con acetato de amonio 10M e isopropanol para centrifugar a 12,000 rpm por 10 min. La pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%, y se resuspendió en 30 μL de agua Milli-Q.

Ensayos de Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (rt-PCR)

Para detectar la presencia de los virus se realizaron ensayos de rt-PCR con el kit SuperScriptTM III One-Step rt-PCR System with PlatinumTM Taq DNA (Thermo Fisher Scientific). Las extracciones se utilizaron como templado para cuatro pares de

oligonucleótidos diseñados para amplificar el gen de la proteína de la cápside (*CP: capsid protein*) del *Opuntia virus 2* (OV2) (Salgado-Ortiz, et al. 2020; Salgado-Ortiz, 2020), *Schlumbergera virus X* (SchVX) (De La Torre, et al. 2016a), *Opuntia virus H* (OpVH) (Salgado, 2020) y *Rattail cactus necrosis-associated virus* (RCNaV) (De La Torre, et al. 2016b) (Tabla 1). Posteriormente, las mezclas se colocaron en un termociclador (BIORAD T100 Thermal Cycler) con las condiciones específicas para cada reacción. Los productos obtenidos se corrieron en geles de agarosa al 1% teñidos con Bromuro de Etidio (BrEt) durante 30 min a 100V. El tamaño de los productos se calculó comparando las bandas obtenidas por el marcador de peso molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en los análisis de rt-PCR para la detección de virus.				
Virus	Amplicón (pb)	Gen Objetivo	Tm (°C)	Ref.
<i>Opuntia virus 2</i> (OV2)	1,000	CP	55	Salgado-Ortíz, 2020
<i>Rattail cactus necrosis-associated virus</i> (RCNaV)	850	CP	55	De La Torre, et al. 2016a
<i>Schlumbergera virus X</i> (SchVX)	850	CP	55	De La Torre, et al. 2016b
<i>Opuntia virus H</i> (OpVH)	2,000	CP	52	Salgado-Ortíz, 2020

Purificación de bandas, secuenciación y análisis-comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral con secuencias disponibles en el GenBank

Los productos de la rt-PCR del tamaño esperado que se calcularon comparando las bandas obtenidas por el marcador de peso molecular de 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) se separaron de los geles de agarosa y se purificaron utilizando el kit Thermo Scientific GeneJET Gel extraction siguiendo las instrucciones del fabricante. De manera breve, el fragmento de interés se extrae de un gel de agarosa, se coloca en un tubo de microcentrífuga al que se le agrega un tampón de unión para solubilizar, posteriormente se

coloca en la columna de sílice, se centrifuga, se eliminan residuos y contaminantes con alcohol al 70% para finalmente centrifugar y resuspender en 30µL de agua Milli-Q.

Las secuencias de los productos esperados se obtuvieron utilizando secuenciación Sanger. Para confirmar la identidad de los posibles virus las secuencias obtenidas se compararon con las disponibles en el GenBank/NCBI por medio de BLAST (Altschul, et al., 1997).

Se construyeron dendrogramas usando la secuencia del gen de la proteína de la cápside de los virus identificados y otros virus reportados en el GenBank, realizando los alineamientos por medio del software Jalview 2.11.2.0 (Waterhouse, et al., 2009), y Mega 11.0.13 (Hall, 2013) para generar los árboles mediante el método del vecino más cercano (*Neighbor-Joining*) (Peña, 2011) utilizando el modelo de Kimura 2-parámetros con 1000 réplicas.

RESULTADOS

Diagnóstico de virus por ensayos de Transcriptasa Inversa ligada a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (rt-PCR)

Se generó el amplicón esperado para *Rattail cactus necrosis-associated virus (RCNaV)* en las muestras de *Opuntia parvyclada* y *Opuntia depressa* (figura 2). Para las muestras de *Opuntia parvyclada* y *Opuntia huajuapensis* se obtuvo producto para *Opuntia Virus 2 (OV2)* (figura 3) y para *Schlumberguera Virus X (SchVX)* se obtuvo amplicón para la muestra de *Opuntia parvyclada* (figura 4). La tabla 2 resume los resultados.

Tabla 2. Resultados rt-PCR			
Muestra	Virus		
	<i>SchVX</i>	<i>OV2</i>	<i>RCNaV</i>
<i>Opuntia parvyclada</i>	+	+	+
<i>Opuntia depressa</i>	+	-	-
<i>Opuntia huajuapensis</i>	-	+	-

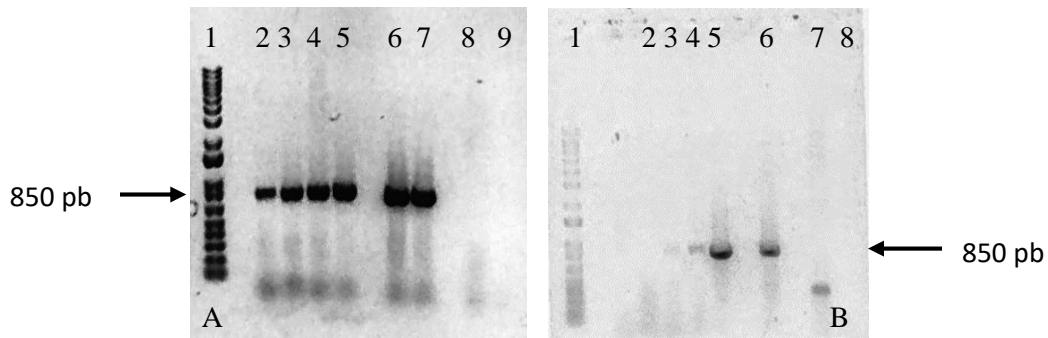


Figura 2. **A.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%; carril 1 marcador de peso molecular 1KB (Invitrogen, Thermo Fisher). Carril 2-5 muestra de *Opuntia parviclada*, carril 6 y 7 muestras de *Opuntia parviclada* control (+), carril 8 AP de *Euphorbia pulcherrima* control (-) y carril 9 agua destilada (-). **B.** Electroforesis en gel de agarosa al 1%; carril 1 marcador de peso molecular 1KB (Invitrogen, Thermo Fisher). Carril 2 y 3 muestra de *Opuntia huajuapensis*, carril 4 y 5 muestras de *Opuntia depressa*, carril 6 muestra de *Opuntia parviclada* control (+), carril 7 AP de *Euphorbia pulcherrima* control (-) y carril 8 agua destilada (-). Peso esperado 850 pb. Las electroforesis se corrieron a 100V/30 min.

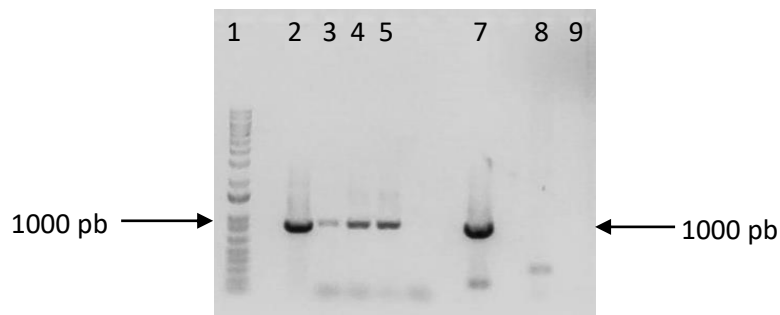


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1%; carril 1 marcador de peso molecular 1KB (Invitrogen, Thermo Fisher). Carril 2 y 3 muestra de *Opuntia parviclada*, carril 4 y 5 muestras de *Opuntia huajuapensis*, carril 7 muestra de *Opuntia megacantha* control (+), carril 8 AP de Nochebuena control (-) y carril 9 agua destilada (-). Peso esperado 1000 pb. La electroforesis se corrió a 100V/30 min.

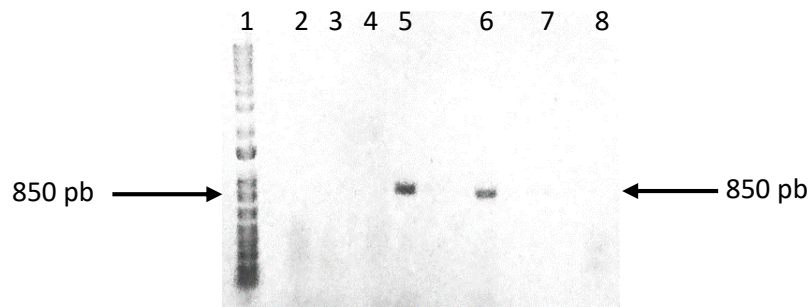


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%; carril 1 marcador de peso molecular 1KB (Invitrogen, Thermo Fisher). Carril 2-5 muestra de *Opuntia parviclada*, carril 6 muestra de *Opuntia parviclada* control (+), carril 7 AP de *Iresine* control (-) y carril 9 agua destilada (-). Peso esperado 850 pb. La electroforesis se corrió a 100V/30 min.

Análisis y comparación nucleotídica de fragmentos del genoma viral con secuencias disponibles en el GenBank

Cuatro secuencias obtenidas presentaron un porcentaje de identidad mayor al 98% con secuencias de la CP de *Tobamovirus* disponibles en el GenBank, con los siguientes números de acceso: KX087216.1 *Rattail cactus necrosis-associated virus (RCNaV)* y NC_040685.2 *Opuntia virus 2 (OV2)* (Tabla 3).

Tabla 3. Análisis en Blastn de las secuencias obtenidas para virus del género *Tobamovirus*

Muestra	Cobertura (%)	Identidad de nucleótidos (nt) (%)	Total score	Valor del error	Nombre	No. de acceso
<i>Opuntia parviclada</i>	100 (500/500)	100	924	0	<i>Rattail cactus necrosis-associated virus</i>	KX087216.1
<i>Opuntia depressa</i>	100 (500/500)	100	942	0	<i>Rattail cactus necrosis-associated virus</i>	KX087216.1
<i>Opuntia parviclada</i>	100 (540/540)	100	998	0	<i>Opuntia virus 2</i>	NC_040685.2
<i>Opuntia huajuapensis</i>	100 (540/540)	99.63	987	0	<i>Opuntia virus 2</i>	NC_040685.2

Para dos de las secuencias obtenidas se presentó un porcentaje de identidad mayor al 95% con secuencias de la CP de *Potexvirus* disponibles en el GenBank, con los siguientes números de acceso: KY348771.1 *Opuntia virus X (OpVX)* y KU854929.1 *Schlumbergera virus X (SchVX)* (Tabla 4).

Tabla 4. Análisis en Blastn de las secuencias obtenidas para virus del género *Potexvirus*

Muestra	Cobertura	Identidad de nucleótidos (nt) (%)	Total score	Valor del error	Nombre	No. de acceso
<i>Opuntia parvoclada</i>	100 (690/690)	100	1275	0	<i>Opuntia virus X</i>	KY348771.1
<i>Opuntia parvoclada</i>	100 (678/678)	96.45	1118	0	<i>Schlumbergera virus X</i>	KU854929.1

Finalmente se realizó la construcción de los dendrogramas usando el gen de la proteína de la cápside (CP), mostrando así la similitud entre las secuencias obtenidas por secuenciación Sanger y las secuencias de la CP ya reportadas en el GenBank (figura 5, 6 y 7).

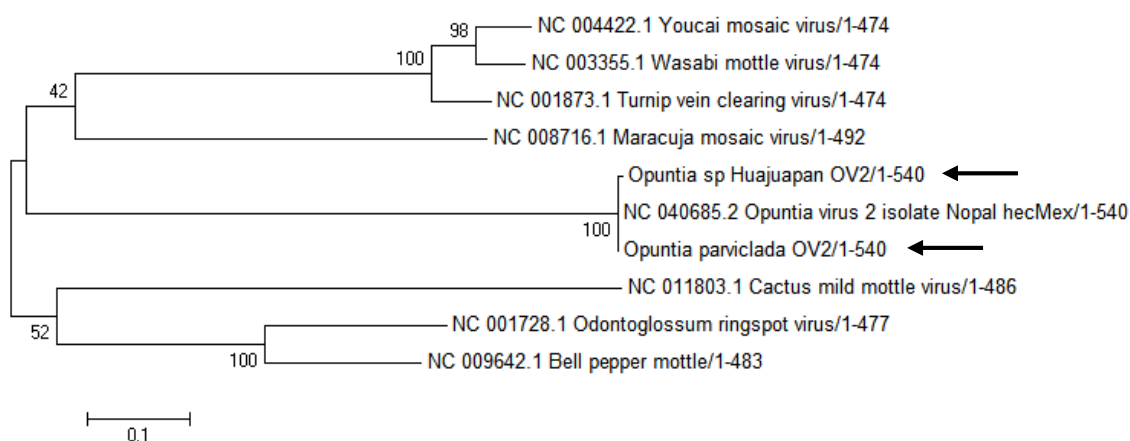


Figura 5. Dendrograma por el vecino más cercano con valores de Bootstrap (1000 réplicas), para el gen de la CP de *Tobamovirus*, se observa la similitud de las CP del OV2 de nopales señalados con una flecha, con otro OV2 reportado en nopal como hospedero en el GenBank.

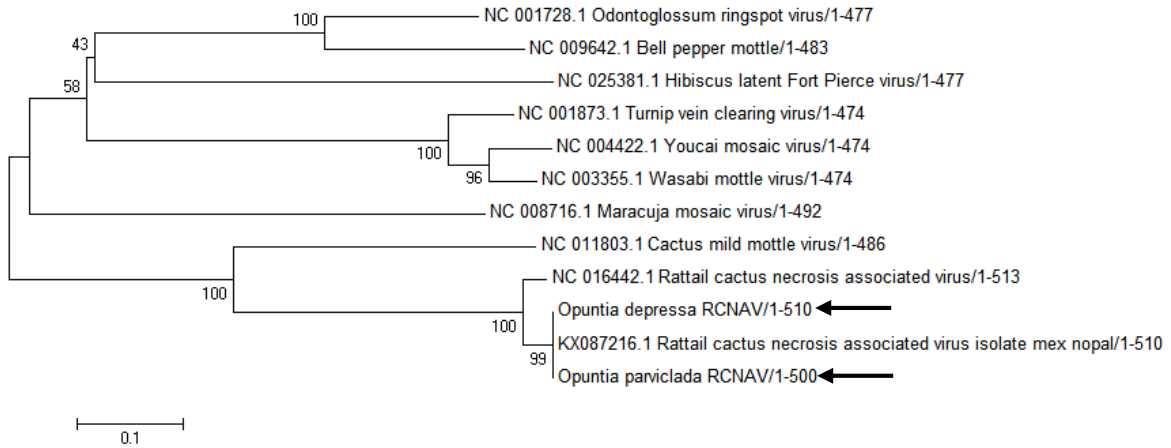


Figura 6. Dendrograma por el vecino más cercano con valores de Bootstrap (1000 réplicas), para el gen de la CP de *Tobamovirus*, se observa la similitud de las secuencias para la CP obtenidos del *RCNaV* del nopal como hospedero señalados con una flecha, con otros *RCNaV* y el *Cactus mild mottle virus* reportados en el GenBank.

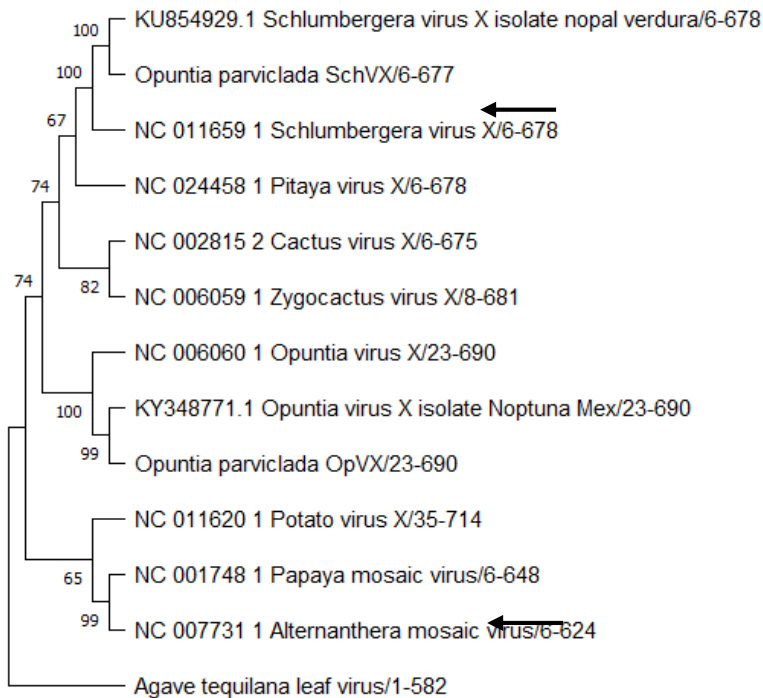


Figura 7. Dendrograma por el vecino más cercano con valores de Bootstrap (1000 réplicas), para el gen de la CP de *Potexvirus* (*OpVX* y *SchVX*) de los nopales hospederos señalados con una flecha, con otras secuencias para la CP de *OpVX* y *SchVX* reportados en el GenBank. Se observa la separación entre los *Potexvirus* reportados en Cactáceas y aquellos con un hospedero diferente.

Se detectó un posible *Carlavirus* (resultados no mostrados) amplificando la región de la *RNA-dependent RNA-polymerase (RdRp)* mediante ensayos de rt-PCR en la muestra de *Opuntia parviclada* sin embargo, no se pudo confirmar su presencia de manera certera debido a que no se logró obtener una secuencia directa.

DISCUSIÓN

En este trabajo se identificaron los *Tobamovirus Opuntia Virus 2* y *Rattail cactus necrosis-associated virus* así los *Potexvirus Opuntia virus X* y *Schlumberguera Virus X* en tres especies de *Opuntia* silvestres.

El criterio de identificación fue con base en la composición de las proteínas de la cápside o *CP* ya que se ha demostrado que la composición de esta es característica de diferentes grupos ya que han mostrado una alta homología de secuencia entre virus de la misma especie y al contrario poca homología entre distintos grupos de géneros y/o familias de virus (Fauquet, 1986; Shukla y Ward, 1988).

De acuerdo a los dendrogramas de *Tobamovirus* las secuencias de *OV2* para nopales silvestres (figura 5), se agrupan en un solo grupo con la secuencia de *Opuntia virus 2* (NC_040685.2) detectada igualmente en una muestra de nopal (Salgado, *et. al.*2020). Las secuencias de *RCNaV* se agrupan con *Rattail cactus necrosis-associated virus* (KU854932.1 y NC_016442.1) (figura 6), sin embargo, se separan en dos grupos al ser uno detectado en una planta de la familia *Cactaceae* pero tres en nopal como su planta hospedera (De la Torre, *et. al.*, 2016) igualmente se agrupan con *CMMoV* (NC_011803) por ser detectado en cactus, pero se mantiene una distancia al ser especies virales diferentes.

Por tanto, de acuerdo con el comité internacional de taxonomía de virus (*International Committee on Taxonomy Viruses*), las secuencias de *Tobamovirus* presentes en las muestras de *Opuntia* analizadas para *OV2* y *RCNaV* pertenecen a la misma especie, ya que se menciona que secuencias con valores de similitud de nucleótidos mayores al 90% son la misma (Adams *et al.* 2017) (Tabla 3).

Para la similitud de secuencias obtenidas para *Potexvirus* (figura 7) la secuencia de *SchVX* se agrupó con *Schlumberguera Virus X* (KU854929.1 y NC_011659.1) con un valor de soporte del 100% y de igual manera la secuencia de *OpVX* se agrupó con *Opuntia virus X* (KY348771.1 y NC_006060.1), ambos en la misma especie a manera de co-infección como ya se ha reportado para otros miembros de la familia *Cactaceae* (Park, et al. 2021), para las secuencias de *Potexvirus* se menciona que aquellos aislados de la *CP* con porcentajes de similitud de nucleótidos mayores al 72% son la misma especie, por lo tanto tenemos la misma variante de los virus pero en hospederos diferentes (Jan, et al., 2020) (Tabla 4).

Hay que recalcar que son pocos los virus que se han llegado a detectar en nopales silvestres, en comparación con los detectados en otro cactus, en donde inclusive se han encontrado co-infecciones (Park, et al., 2018; Park, et al., 2021) posiblemente debido al manejo de las plantas, reproducción por esqueje, etc. observándose así diferencias en la diversidad de virus presentes en plantas silvestres y cultivadas , esto podría sustentar la hipótesis del efecto dilución, la cual enuncia que “a mayor diversidad, menor riesgo de infección”, lo que explicaría que una mayor diversidad genética y una disminución en el manejo humano se traduce en un menor riesgo de infección (Pagán et al., 2012).

La idea anterior bien podría ser refutada si se recuerda que la muestra de *Opuntia parviclada* es de origen silvestre y por tanto, no presenta un constante manejo o interacción humana, y aun así se encuentra presente una mezcla de virus, sin embargo, esto podría deberse a que de acuerdo con Arias y colaboradores (2012), esta especie podría tener un posible origen híbrido, además de frutos prolíficos, que no es más que una forma de propagación vegetativa, común en zonas áridas donde se ha reportado que varias especies de *Opuntia* se reproducen principal o exclusivamente por esta (Delfin-Vazquez, et al., 2005) reduciendo así la variabilidad genética. Además se reporta que su zona de distribución es Puebla y Oaxaca por tanto, como posible hipótesis se aborda que un cambio de ambiente podría hacerla propensa a un mayor número de infecciones, se requieren más estudios para corroborar esto.

Ahora bien, de acuerdo a diferentes autores estas co-infecciones podrían deberse por la complementación (resultado del intercambio genético y reordenamiento entre dos virus), la trans-complementación (proceso donde la proteína viral expresada de un virus mejora o apoya la infección de otro virus) o transcapsidación (un genoma viral es encapsidado por las

cápside de otro virus) (Moreno y López-Moya, 2020; Zhou, et al. 2020). Por lo anterior, se cree que encontramos en las muestras una complementación de virus entre *Potexvirus* y *Tobamovirus* permitiendo así posiblemente, el movimiento de célula a célula en algunos casos, por lo que se debería dejar de realizar estudios para un solo virus y empezar a realizarlos en conjunto ya que más que ser una opción la infección en mezclas parece ser una regla de los virus.

Al realizar una identificación de virus en muestras silvestres nos permite conocer los posibles virus presentes en los cultivos ya que estos tienen un origen silvestre hasta su domesticación, Vavilov (1932) percibiendo así la importancia fundamental de los programas de mejoramiento de plantas a través del estudio de la diversidad de enfermedades y plagas en plantas silvestres y afines a un determinado cultivo, ya que se podrían aprovechar los genes resistentes derivados de una población silvestre.

Por tanto, de acuerdo con lo anterior y Chessin y colaboradores (1972), este estudio contribuye a un mejor entendimiento de la evolución de los virus en nopales y el rol de los silvestres como reservorios de virus, ya que los ecosistemas silvestres suelen estar adyacentes a los campos de cultivo y los virus pueden moverse a través de esta interfaz agroecológica (Rodríguez-Nevado, et al., 2020).

CONCLUSIÓN

Se detectó e identificó la presencia de virus en *Opuntia depressa*, *Opuntia huajuapensis* y *Opuntia parviclada*, SchVX y el OpVX ambos del género *Potexvirus*, al igual que el RCNaV y el OV2 del género *Tobamovirus*.

PERSPECTIVAS

Se recomienda un estudio más profundo en *Opuntia parviclada* al haberse detectado *SchVX*, *RCnaV*, *OV2*, *OpVX* y un posible *Carlavirus*, cinco virus para una muestra de origen silvestre, aunque colectado en el Estado de México, cuando su distribución de acuerdo con diferentes autores se limita a Puebla-Oaxaca.

Para detectar y determinar bien la presencia de *Carlavirus* en diferentes muestras de *Opuntias* se recomienda el diseño de primers que flanqueen únicamente la región de la *CP*. Ya que los que se usaron comúnmente rinden amplicones de 2 kb, lo cual al obtener la secuencia solo se obtiene una porción muy pequeña del gen de la *CP*.

Referencias

- Adams, M.J., Adkins, S., Bragard, C., Gilmer, D., Li, D., MacFarlane, S.A., Wong, S-M., Melcher, U., Ratti, C., Ryu, K.H., y ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Virgaviridae*. Journal of General Virology, 98: 1999–2000.
- Alonso, B. B., Mora, A. G., Valdovinos, P. G., Ochoa, M. D. L., Rodríguez, L. E. De La Torre, A. R. 2015. Asociación de un *Potexvirus* como Agente Causal de Manchas Cloróticas en *Opuntia ficus-indica*. Revista Mexicana de Fitopatología 33:(1) 75-86.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Reserch. 25: 3389-3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389
- Arias, S., Gama-Lopez, S., Guzmán-Cruz, L., Vázquez-Benítez, B. 2012. Flora del valle de Tehuacán-Cuicatlán. Fascículo 95: Cactaceae. Instituto de Biología, UNAM. México, 246 pags.
- Ávalos-Huerta, I., Sánchez-López, D., López-González, C. 2013. Nomenclatura Vernácula, uso y manejo de *Opuntia* spp. en Santiago Bayacora, Durango, México. Revista Chapingo serie Horticultura, 19 (3), 367-380. doi: 10.5154/r.rchsh.2012.09.048.
- Campos B., A. M. 1996. Identificación del agente causal de la pudrición café del nopal (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) en Milpa Alta, DF. Tesis Profesional. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 41 pags.
- Chessin, M. and Lesemann, D. 1972. Distribution of cactus viruses in wild plants. Phytopathology 62: 97-99. doi: 10.1094/Phyto-62-97.
- Clark, M. F. and Adams, A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme linked immunosorbent assay for the deduction plant viruses. Journal of General Virology 340:475–483. doi: 10.1099/0022-1317-34-3-475
- Daniloski, D., D'Cunha, N., Speer, H., McKune, A., Alexopoulos, N., Panagiotakos, D., Anka, T. y Naumovski, R. 2022. Recent developments on *Opuntia* spp., their

- bioactive composition, nutritional values, and health effects. *Food Bioscience*, 47. doi:10.1016/j.fbio.2022.101665
- De La Torre- Almaráz, R., Salgado-Ortiz, H.; Salazar-Segura, M., Pallás, V.; Sánchez-Navarro J. A. y Valverde, R. A. 2016 (a). First Report of *Schlumbergera virus X* in Prickly Pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico. *Plant Disease* 100 (8): 1799. doi:10.1094/PDIS-11-15-1326-PDN
- De La Torre-Almaráz, R.; Salgado-Ortiz, H.; Salazar-Segura, M.; Pallás, V.; Sánchez-Navarro, J. A. y Valverde, R. A. 2016 (b). First Report of *Rattail cactus necrosis-associated virus* in Prickly Pear Fruit (*Opuntia albicarpa Scheinvar*) in Mexico. *Plant Disease* 100 (11): 2339. doi: 10.1094/PDIS-04-16-0554-PDN
- De La Torre-Almaráz, R., Salazar-Segura, M. y Ruiz-Medrano, R. 2007. Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41: 763-773.
- De la Torre-Almaraz. 2014. Enfermedades de origen viral en plantas cultivadas en México. Plaza y Valdés. Consultado el 20 de Agosto del 2023. Disponible en: <https://www-digitaliapublishing-com.pbidi.unam.mx:2443/a/52503>.
- Dellaporta, S., Wood, J., Hicks, J. 1983. A plant miniprep: Version II. *Plant Molecular Biology Report* 1: 19-21. doi:10.1007/bf02712670
- Duarte, L. M. L., Alexandre, M. A. V., Rivas, E. B., Harakava, R., Galleti, S. R., Barradas, M. M. 2008. Potexvirus Diversity in Cactaceae from Sao Paulo state in Brazil. *Journal of Plant Pathology* 90(3): 545-551.
- Dubey R. C. 2009. *Biotechnology. Plant Biotechnology*. Ed. S. Chand. Pp 365-385.
- Fauquet, C., Dejardin, J., Thouvenel, J. 1986. Evidence that the amino acid composition of the particle proteins of plant viruses is characteristic of the virus group. 1. Multidimensional classification of plant viruses. *Intervirology* 25:1–13. doi: 10.1159/000149650

- Flores, C. A. V. 2003. Importancia del nopal. En Flores, C.A.V. (1ra Ed.) Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización. Universidad Autónoma Chapingo-CIESTAAM, México, pp. 1-18.
- Flores-Maya, S., Vargas-Jurado, M., Suárez-Mota, M. y Barrera-Escorcía, H. 2015. Análisis cariotípico de *Agave marmorata* y *Agave peacockii* (Agavaceae) ubicados en las terrazas aluviales del río Zapotitlán, Puebla, México. *Polibotánica*, 40: 109-125.
- Gergerich, R.C. y Dolja, V. V. 2006. Introduction to Plant Viruses, the Invisible Foe. The Plant Health Instructor. Consultado en línea el 20 de agosto del 2023 en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/pathogengroups/pages/plantviruses.aspx>
- Giri, L. y Chessin, M. 1975. A severe strain of *Tobacco mosaic virus* from cactus. *Phytopathology* 65: 824-825. doi: 10.1094/Phyto-65-824.
- Granata, G., Faedda, R. y Ochoa, M. J. 2018. Enfermedades del nopal. En Inglese, P., Candelario, M., Nefzaoui, A. y Sáenz, C. Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal, pp. 97 – 107. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma (ICARDA).
- Guzmán, U., Arias, S., Dávila, P. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. UNAM, CONABIO, México, 315 p.
- Hall, B. 2013. Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution* 30(5):1229–1235. doi: 10.1093/molbev/mst012
- Hausbeck, M. K. y Gildow, F. E. 1991. First report of *Tomato spotted wilt virus* on Thanksgiving cactus. *Plant Diseases* 75: 215. doi: 10.1094/PD-75-0215C.
- Hunt, D., R., Taylor, N., P. y Charles, G. 2006. The new cactus lexicon: Text. DH Books, Milborne Port, England.
- Izaguirre, M. M. L. y Marys, E. 1996. Interactions between Irradiance Levels and Cactus X Virus infection on the Crassulacean Acid Metabolism in *Nopalea cochenillifera* and

- Acanthocereus tetragonus* Plants. Journal of Plant Physiology 149: 35-42.
doi: 10.1016/S0176-1617(96)80170-2
- Jan F., Anna Maria Vaira, Wulf Menzel, Thierry Candresse, Sergei K. Zavriev, John Hammond, Ki Hyun Ryu, y ICTV Report Consortium. 2020. *ICTV Virus Taxonomy Profile: Alphaflexiviridae*. Journal of General Virology, 101, 699–700.
- Janssen, D., García, C. y Ruiz, L. 2022. First Report of Schlumbergera Virus X in Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) in Spain. Plant Disease, 106 (7). doi: 10.1094/PDIS-09-21-1879-PDN
- Jeong, J.-J., Ju, H.-J., y Noh, J. (2014). A Review of Detection Methods for the Plant Viruses. Research in Plant Disease. Korean Society of Plant Pathology, 20(3): 173-181.
doi: 10.5423/rpd.2014.20.3.173
- Jones, S., Baizan-Edge, A., MacFarlane, S. y Torrance, L. (2017). Viral Diagnostics in Plants Using Next Generation Sequencing: Computational Analysis in Practice. Front. Plant Sci. 8:1770. doi: 10.3389/fpls.2017.01770.
- Kim, N. R., Hong, J. S., Song, Y. S., Chung, B. N., Park, J. W., Ryu, K. H. 2012. The complete genome sequence of a member of a new species of tobamovirus (rattail cactus necrosis-associated virus) isolated from *Aporcactus flagelliformis*. Archives of Virology 157(1): 185-187. doi:10.1007/s00705-011-1142-5
- Kim, NY., Jo, Y.H., Bae, Y.M. *et al.* 2023. First report of pitaya virus X infecting dragon fruit (*Selenicereus undatus*) in Korea. Journal of Virological Methods. doi.org/10.1007/s42161-023-01335-y.
- Koenig, R., Pleij, C. W. A., Loss, S., Burgermeister, W., Aust, H., Schiemann, J. 2004. Molecular characterization of potexvirus isolated from three different genera in the family *Cactaceae*. Archives of Virology 149: 903-914. doi: 10.1007/s00705-003-0268-5

- Liou, M. R., Chen, Y. R., Liou, R. F. 2004. Complete nucleotide sequence and genome organization of a *Cactus virus X* strain from *Hylocereus undatus* (Cactaceae). *Archives of Virology* 149(5): 1037-1043. doi: 10.1007/s00705-003-0251-1
- Majure, L.C., Puente, R., Griffith, M.P., Judd, W.S., Soltis, P.S. and Soltis, D.E. (2012). Phylogeny of *Opuntia* s.s. (Cactaceae): Clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *American Journal of Botany*, 99: 847-864. doi:10.3732/ajb.1100375
- Maliarenko, V. M. y Mudrak, T. P. 2013. Cactus viruses in fasciated plants. *Biologija* 59 (2): 213-218. doi: 10.6001/biologija.v59i2.2754
- Milbrath, M. G. y Nelson, M. R. 1972. Isolation and characterization of a virus from Saguaro cactus. *Phytopathology* 62: 739-742. doi: 10.1094/Phyto-62-739
- Min, B. E., Chung, B. N., Kim, M. J., Ha, J. H., Lee, B. Y., Ryu, K. H. 2006. Cactus mild mottle virus is a new cactus-infecting tobamovirus. *Archives of Virology* 151(1): 13-21- doi: 10.1007/s00705-005-0617-7
- Moreno, A. y López-Moya. 2020. When Viruses Play Team Sports: Mixed Infections in Plants. *Phytopathology*, 110: 29-48. doi:10.1094/PHYTO-07-19-0250-FI
- Mumford, R., Boonham, N., Tomlinson, J., y Barker, I. (2006). Advances in molecular phytodiagnostics - new solutions for old problems. *European journal of plant pathology*, 116 (1): 1–19. doi:10.1007/s10658-006-9037-0
- Pagán, I., Gonzalez, J. P., Moreno, L. A., Rodelo, U. M., Fraile, A., Piñero, D., Garcia-Arenal, F. 2012. Effect of Biodiversity Changes in Disease Risk: Exploring Disease Emergence in a Plant-Virus System. *PLoS Pathogens* 8(7). doi: 10.1371/journal.ppat.1002796
- Park, C., Song, E., Ryu, K. 2018. Detection of Co-Infection of *Notocactus leninghausii* f. *cristatus* with Six Virus Species in South Korea. *Plant Pathology*, 34(1), 65-70. doi: 10.5423/PPJ.NT.08.2017.0187

- Park, C., Song, E., Ryu, K. 2021. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of five potexviruses infecting cactus plants using dual-priming oligonucleotides (DPOs) primers. *Journal of Virological Methods*, 298. doi:10.1016/j.jviromet.2021.114280
- Pecman, A., Kutnjak, D., Gutiérrez-Aguirre, I., Adams, I., Fox, A., Boonham, N. y Ravnikar, M. (2017). *Frontiers in microbiology*, 8: 1998.
- Peña, C. 2011. Métodos de inferencia Filogenética. *Revista peruana de biología* 18(2): 265 – 267.
- 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. San Luis Potosí, México. 350 p.
- Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S., Landa-Hernández, L. 2001. First Report of *Pythium aphanidermatum* Causing Crown and Stem Rot on *Opuntia ficus-indica*. *Plant Disease* 85 (2): 231. doi: 10.1094/PDIS.2001.85.2.231B
- Rodríguez-Nevado, C., Gavilán, R., y Pagán, R. 2020. Host Abundance and Identity Determine the Epidemiology and Evolution of a Generalist Plant Virus in a Wild Ecosystem. *Phytopathology*, 110: 94-105. doi: 10.1094/PHYTO-07-19-0271-FI
- Rzedowski, J. 1991. El endemismo en la flora fanerogámica mexicana: una apreciación analítica preliminar. *Acta Botánica Mexicana* 15:47-64.
- Salgado, O. H. 2020. Diversidad de virus en algunas especies del género *Opuntia* en México. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 61 pags.
- Salgado-Ortíz, H., De La Torre-Almaraz, R., Sánchez-Navarro, J. Á., y Pallás, V. 2020. Identification and genomic characterization of a novel tobamovirus from prickly pear cactus. *Archives of virology*, 165(3), 781–784. doi: 10.1007/s00705-020-04528-3

- Sanches, M. M., Lamas, N. S., Reis, M. B. A., Arieta-Sosa, J. G., Romano, E., Melo, F.L., Ribeiro, S. G. 2015. Genome Assembly of Schlumbergera Virus X Infecting Prickly Pear (*Opuntia cochenillifera*) in Brazil. *Genome Announcements* 3 (2): 1-2. doi: 10.1128/genomeA.00133-15
- Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467.
- Scheinvar, L., Olalde, G. y Sule, D. 2011. Especies silvestres de nopales mexicanos. Universidad Nacional. Autónoma de México. Instituto de Biología. Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. GE005. México D.F.
- Schulz, F. T. y Spire, B. 1993. Molecular analysis of immunodeficiency viruses. pp. 139-164. In: *Molecular Virology. A practical approach*. Davison, J. A.; Elliott, M. (Eds.). OIRL Press. USA.
- Shukla, D. y Ward, C. 1988. Amino Acid Sequence Homology of Coat Proteins as a Basis for Identification and Classification of the Potyvirus Group. *Journal of General Virology*, 69(11); 2703–2710. doi:10.1099/0022-1317-69-11-2703
- Valverde, R. 1990. Analysis of double-stranded RNA for plant virus diagnosis. *Plant Disease* 74:255-258.
- Vavilov, N. (1932) El proceso de evolución en plantas cultivadas. En: *Actas del sexto congreso internacional de genética*, vol I. Transacciones y direcciones generales. Sitio web editado por Donald F. Jones; Publicaciones académicas electrónicas. 1968, págs. 331–342.
- Vázquez-Delfín, E., F., Sánchez-Serrano, S., L., y Martorell-Delgado, C. 2005. La producción de frutos prolíficos en *Cylindropuntia leptocaulis* (Cactaceae) como una alternativa ante el fracaso de la reproducción sexual. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 76: 79-81.

- Villaseñor, J., L., Dávila, P. y Chiang, F. 1990. Fitogeografía del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 50:135-149.
- Waterhouse, A.M., Procter, J., B., Martin, D., Clamp, M. y Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2 multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25 (9): 1189-1191.
- Zhou, Y., Ghidey, M., Pruett, G., Kearney, C. 2020. The use of functionally deficient viral vectors as visualization tools to reveal complementation patterns between plant viruses and the silencing suppressor p19. *Journal of Virological Methods*, 286. doi:10.1016/j.jviromet.2020.113980