



**UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA**

**Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias**

**Tolerancia genética de los nopales, *Opuntia* sps.,  
cultivados en Jalisco, a la enfermedad “mancha  
negra” producida por *Pseudocercospora opuntiae***

**Tesis  
que para obtener el grado de**

**Doctora en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo  
de Recursos Naturales y Agrícolas**

**Presenta**

**M. Sci. María Judith Ochoa**

**Zapopan, Jalisco a 12 de noviembre de 2015**



# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

Tolerancia genética de los nopales, *Opuntia* sps.,  
cultivados en Jalisco, a la enfermedad “mancha negra”  
producida por *Pseudocercospora opuntiae*

Tesis  
para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biosistemática, Ecología y Manejo de  
Recursos Naturales y Agrícolas

Presenta

M. Sci. María Judith Ochoa

DIRECTOR

Dr. Liberato Portillo Martínez

Zapopan, Jalisco a 12 de noviembre de 2015

## **DEDICATORIAS**

A la memoria de mi padre Ingeniero Agrónomo Luis Horacio Ochoa que me introdujo al mundo de los tunales y me enseñó a amarlos, sirva la presente para mantener vivo su recuerdo.

A mi madre, Marta Elena Beatriz Otero mujer única en su generosidad y exquisita educación, quien es mi ejemplo de una mujer capaz de superar las adversidades del destino y que es feliz sirviendo.

A la memoria de la Dra. Inocenza Chessa, “Enza” de la Cactusnet FAO-ICARDA a quien conocí desde un lugar de amistad, cooperación y comprensión sin fronteras.

A la memoria del Dr. Carlos López, profesional, amigo por ser siempre receptor de mis inquietudes y apoyarme desde su gestión en mi querida UNSE, Universidad Nacional de Santiago del Estero-Argentina.

A la memoria del Ingeniero Agrónomo Jorge Palacios, por su estímulo y entrega permanente y su ejemplo de vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis hijos Franco, Carlos Daniel y María Laura, la razón e incentivo de mi vida.

A Sergio Adolfo Uhart mi compañero en este transitar por la vida, por su continuo apoyo y estímulo en mi realización personal y profesional.

A Luis Angel Rivera López con quien compartí la pasión por los nopales y la fitopatología, excelente profesional y amigo a quien admiro y respeto.

A Maritza Gonzalez compañera de tareas durante mi estancia académica y cómplice en las bromas mexicano-argentinas, haciendo el ambiente de trabajo más llevadero.

Al Dr. Juan Florencio Gomez-Leyva, por su apoyo e inclusión en su equipo de trabajo.

A mi director Dr. Liberato Portillo y asesores: Dres. Fernando Santacruz Ruvalcaba, Jesus Sánchez González, Antonia Gutiérrez Mora y Juan Florencio Gómez-Leyva por el tiempo y dedicación en la lectura y mejora del presente trabajo.

Al Dr. Lino De La Cruz Larios por sus consejos siempre pragmáticos!

A los miembros de la Cactusnet, Red Internacional de Cooperación Técnica de FAO-ICARDA, nuestra “familia científica” en estas dos décadas.

Al Dr. Roberto Kiesling, nuestro referente y orgullo científico en cactáceas, por sus sugerencias.

A mi grupo de trabajo de la Facultad de Agronomía y Agroindustrias de la Universidad Nacional de Santiago del Estero, con quienes comparto la pasión por los tunales y la curiosidad por encontrar siempre algo más.

Mi reconocimiento especial a Enrique Arias-Jimenez, quien desde su lugar de trabajo, fue testigo y hacedor silencioso del apasionante mundo de los nopales y sus potencialidades.

A Rafael Soltero, por ese humor con el que disfruta la vida y la comparte.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIAS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	ii
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE CUADROS .....	ix
ABREVIATURAS UTILIZADAS .....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS .....	6
OBJETIVOS.....	7
CAPÍTULO I “Mancha negra” causada por <i>Pseudocercopora opuntiae</i> en sistemas productivos de nopal en Jalisco, México .....	8
Resumen.....	10
Introducción .....	10
Materiales y métodos .....	11
Resultados y discusión.....	13
Conclusiones.....	18
Literatura citada .....	19
CAPÍTULO II Obtención establecimiento y multiplicación de genotipos de <i>Opuntia</i> sps. con aparente tolerancia a la “mancha negra” <i>Pseudocercospora opuntiae</i> .....	22
Introducción .....	22
Materiales y métodos .....	27
Análisis estadístico .....	30
Resultados y Discusión.....	31
Conclusiones.....	40
Literatura citada .....	40
CAPÍTULO III Efecto del sustrato y del ácido giberélico (AG <sub>3</sub> ) en la germinación de semillas de diez cultivares de <i>Opuntia</i> sps. ....	45
Resumen.....	47
Introducción .....	47
Materiales y métodos .....	48
Resultados y discusión.....	52

Conclusiones.....	55
Literatura citada .....	55
CAPÍTULO IV Método de selección en explantes <i>in vitro</i> de <i>Opuntia</i> sps. con resistencia a la mancha negra causada por <i>Pseudocercospora opuntiae</i> .....	58
Resumen.....	59
Abstract.....	60
Introducción .....	61
Materiales y métodos .....	62
Análisis estadístico .....	65
Resultados y discusión.....	65
Conclusiones.....	68
Bibliografía .....	69
CAPÍTULO V Análisis de la variación genética mediante marcadores ISSR de genotipos de <i>Opuntia</i> sps. con resistencia a <i>Pseudocercospora opuntiae</i> .....	71
Introducción .....	71
Materiales y métodos .....	73
Análisis estadístico .....	74
Resultados y discusión.....	74
Conclusiones.....	78
Literatura citada .....	79
CAPÍTULO VI Resistencia en nopal <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Miller contra <i>Pseudocercospora opuntiae</i> mediada por la actividad de la $\beta$ -1,3 glucanasa y compuestos polifenólicos en cladodios .....	83
Resumen.....	83
Introducción .....	84
Materiales y métodos .....	86
Resultados y discusión.....	91
Conclusiones.....	95
Literatura citada .....	96
CONCLUSIONES GENERALES .....	100
CONTRIBUCIONES AL CONOCIMIENTO.....	103
LITERATURA CITADA.....	105
GLOSARIO.....	108
ANEXOS.....	109



## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Figura 1</b> Desarrollo de síntomas causados por <i>Pseudocercospora opuntiae</i> en nopal después de 90 d de infección. A) síntoma 1, B) síntoma 2, C) síntoma 3, D) síntoma 4, E) síntoma 5, F) síntoma 6, y G) síntoma 7.	14
<b>Figura 2</b> Síntomas de la mancha negra en forma circular encontrados en plantaciones de nopal en Ojuelos y Zapopan, Jalisco, México. A) Cladodio con manchas circulares color café oscuro con necrosis de tejido B) Pseudostromas tipo con conidióforos en fascículos, C) Pseudostroma con conidioforos y conidios (vista lateral).	14
<b>Figura 3</b> Diferentes tamaños de conidios y conidioforos desarrollados en MEA. A), B) y D) Conidios marrones y verde oliva unidos en conidioforos ramificados, C), E) y F) Conidio solitario cilíndrico con una marcada cicatriz de abscisión.	16
<b>Figura 4</b> Desarrollo de los síntomas después de la inoculación. Escala: 0 planta sana, 1-7 síntomas observados: 1-2: decoloración inicial de la cutícula cambio de un color verde claro con pequeños puntos de color verde oliva; 3-5: Las manchas se vuelven marrones oscuras y su diámetro aumenta 3-4 cm, se presenta un margen amarillo y hundimiento de la parte central; 6-7: La parte afectada se seca dejando un tejido leñoso visible, en muchas ocasiones se desprende dejando orificios que atraviesan el cladodio.	17
<b>Figura 5</b> Desarrollo de los síntomas en <i>Phaseolus vulgaris</i> causados por <i>Pseudocercospora opuntiae</i> aislada de cladodios de <i>Opuntia ficus-indica</i> .	17
<b>Figura 6</b> Dendrograma basado en las secuencias de la región ITS 1 y 2 de la cepa <i>Pseudocercospora</i> identificados en este estudio. El árbol se generó utilizando el método de máxima parsimonia. El conjunto de datos fue sometido a 1,000 pseudoréplicas. Las secuencias de referencia se obtuvieron de la base de datos GenBank. La secuencia de la cepa aislada se indica mediante un asterisco. Los números de acceso de GenBank se dan en las etiquetas.	18

## CAPÍTULO II

- Figura 1** a) Desinfección de los trozos de cladodios de los genotipos R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y S, b) secado y c) plantación en bandejas. **30**
- Figura 2** Número de brotes generados durante el período de estimulación para dos genotipos, promedio de tres dosis de BA. Genotipo tolerante (T) línea azul, resistente (R) línea roja. **31**
- Figura 3** Número de brotes en medio basal MS, genotipos tolerante (T) línea azul, resistente (R) línea roja. **32**
- Figura 4** Interacción entre genotipo R (resistente) y T (tolerante) y concentración de BA utilizada en el período de estimulación para el número de brotes por explante generados durante el periodo en MS. **33**
- Figura 5** Diferentes callos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller con oxidación. **34**
- Figura 6** Diferencias en la formación de callos de acuerdo al genotipo a) G<sub>3</sub>, b) G<sub>8</sub>. **36**
- Figura 7** Explantes del cultivar “Reyna” a) cotiledón, b) hipocotilos y c) raíz. **37**
- Figura 8** Trozos transplantados de los genotipos a) R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y S, b) desarrollo a los 2 meses de edad, c) detalle del genotipo R<sub>1</sub>. **39**

## CAPÍTULO III

- Figura 1** Diferentes frutos de *Opuntia* sps. utilizados en los experimentos de germinación A-G. Detalle del corte de la cubierta de la semilla de *Opuntia* (H-I). **50**
- Figura 2** Porcentaje de germinación de las semillas de diez cultivares de *Opuntia* sps. después de 28 d. Tratamientos: (AG<sub>3</sub>) MS 25 % más 25 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico, (S) escarificación con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (MS) Medio de Murashige y Skoog (1962), (B5) Gamborg, más 1.96 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina y 0.1 mg.L<sup>-1</sup> 2,4-D, (IS) jal:turba de musgo:arena (IS + H) turba de musgo:jal:compost de lombríz. **53**
- Figura 3** Actividad específica de la α-amilasa en semillas de *Opuntia* sps. después de 7 d de establecidas en (MS) Murashige y Skoog (1962) y (AG<sub>3</sub>) MS al 25 % mas 25 mg.L<sup>-1</sup> de ácido giberélico. **54**

## CAPÍTULO IV

- Figura 1** Evaluación de la efectividad del extracto de *Pseudocercospora opuntiae*. **63**
- Figura 2** Evolución de síntomas en explantes: 0 Explante sano, + necrosis en el punto de inoculación, ++ tejido acuoso sin avance, +++ explante necrosado, muerto. **66**
- Figura 3** Actividad enzimática del extracto de *Pseudocercospora opuntiae* a) almidón, b) caseína, c) celulosa. **66**
- Figura 4** Evolución de los síntomas respecto al tiempo 15, 30, 45 y 60 d después de la inoculación de cada uno de los genotipos evaluados A: G<sub>2</sub>, B: T (tolerante), C: G<sub>6</sub>, D: R (resistente), E: G<sub>7</sub>. **68**

## CAPÍTULO V

- Figura 1** Productos de amplificación con los oligonucleotidos (AG)<sub>8</sub> YC y G (AG)<sub>7</sub> AC. **75**
- Figura 2** Dendrogama generado con los oligonucleotidos (AG)<sub>8</sub> YC y G (AG)<sub>7</sub> AC ISSR para los genotipos T (tolerante), Ry, R (resistente), AP, G<sub>2</sub>, S y *Nopalea* evaluados. **76**
- Figura 3** Análisis de los componentes principales derivado de los productos amplificados con los oligonucleotidos (AG)<sub>8</sub> YC y G (AG)<sub>7</sub> AC ISSR para los genotipos: T (tolerante), Ry, R (resistente), AP, G<sub>2</sub>, S y *Nopalea*. **78**

## CAPÍTULO VI

- Figura 1** Perfil de las diferentes fracciones proteicas en gel de acrilamida al 10 % de los genotipos R (resistente) y S (susceptible). **92**
- Figura 2** Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de *Opuntia*. **93**
- Figura 3** Efecto de los extractos proteicos de *Opuntia* sobre la germinación y morfología de *Pseudocercospora opuntiae*. **94**

## LISTA DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Cuadro 1</b> Características morfológicas de <i>Pseudocercospora opuntiae</i> colonias después de 30 y 60 d de inoculación en los diferentes medios.	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Cuadro 1</b> Evaluación del número de brotes de los genotipos R (resistente) y T (tolerante) durante el período de estimulación con diferentes concentraciones de BA.	<b>30</b>
	<b>31</b>
<b>Cuadro 2</b> Evaluación del número de brotes de los genotipos R (resistente) y T (tolerante) en medio MS en explantes que provinieron del período de estimulación tratados con diferentes concentraciones de BA.	
<b>Cuadro 3</b> Frecuencia de formación de callos generados por genotipos G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub> , G <sub>3</sub> , G <sub>4</sub> , G <sub>5</sub> , G <sub>6</sub> , G <sub>7</sub> y G <sub>8</sub> provenientes de semillas de <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Miller. Resultados luego de 2 meses de cultivo con inducción 0.5 g.L <sup>-1</sup> BA, 0.1 g. L <sup>-1</sup> PIC.	<b>33</b>
<b>Cuadro 4</b> Porcentaje de supervivencia de los genotipos R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> y S por el método de propagación por trozos.	<b>37</b>
<b>Cuadro 5</b> Número y longitud de brotes de los genotipos R <sub>1</sub> , R <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> , R <sub>4</sub> y S.	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO III</b>	
<b>Cuadro 1</b> Características de los cultivares de <i>Opuntia</i> sps. utilizados en el estudio de germinación.	<b>49</b>

#### **CAPÍTULO IV**

**Cuadro 1** Análisis estadístico multifactorial de sustratos: arena y perlita; inóculos: extracto fungíco y hongo puro; y genotipos: T (tolerante), R (resistente) y genotipos cigóticos G<sub>2</sub>, G<sub>6</sub> y G<sub>7</sub>. **65**

#### **CAPÍTULO VI**

**Cuadro 1** Compuestos fenólicos contenidos en los extractos etanólicos de cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller de los genotipos susceptible (S) y resistente (R) y actividad inhibitoria sobre la germinación de conidios de *Pseudocercospora opuntiae*. **91**

**Cuadro 2** Determinación de glucanasas e inhibición de la germinación de conidios de *Pseudocercospora opuntiae* en los genotipos resistente (R) y susceptible (S). **93**

## ABREVIATURAS UTILIZADAS

<b>AAR:</b>	Actividad antirradicalaria
<b>ACP:</b>	Análisis de componentes principales
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AFLP:</b>	Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados
<b>AG<sub>3</sub>:</b>	Ácido Giberélico
<b>AIA:</b>	Ácido indol-3-acético
<b>AIB:</b>	Ácido indolbutírico
<b>ANA:</b>	Ácido naftalenacético
<b>BA:</b>	6-bencilaminopurina
<b>BAP:</b>	Bencilaminopurina
<b>BSA:</b>	Albúmina de suero bovino
<b>B5:</b>	Medio modificado Gambord
<b>Captan®</b>	Fungicida (N-triclorometiltio-4-ciclohexeno-1,2-dicarboximida)
<b>CTAB:</b>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
<b>DDSA</b>	Anhídrido dodecenil succinico
<b>DMS</b>	Diferencia mínima significativa
<b>HCL:</b>	Ácido clorhídrico
<b>IBA:</b>	Ácido indolbutírico
<b>ISSR:</b>	Inter secuencias simples repetidas
<b>KIN:</b>	Cinetina (6- furfural amino purina)
<b>MS:</b>	Murashige y Skoog
<b>MSA:</b>	Medio de cultivo de proliferación de yemas
<b>MEA:</b>	Malta extracto agar
<b>MSE:</b>	Medio de cultivo de inducción embriogénica
<b>Pb:</b>	Pares de bases
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PDA:</b>	Papa dextrosa agar
<b>PDB:</b>	Medio de cultivo líquido en inglés: papa-dextrosa-caldo
<b>PEG:</b>	Polietilenglicol
<b>PIC:</b>	Picloram (4-amino 3,5,6-tricloropicolínico)
<b>PR:</b>	Proteínas relacionadas con la patogenicidad
<b>R:</b>	Resistente
<b>S:</b>	Susceptible
<b>SDS-PAGE:</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato
<b>2,4-D:</b>	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
<b>T:</b>	Tolerante

**RESUMEN**

En el presente trabajo de investigación se identificó morfológica y molecularmente el hongo fitopatógeno (*Pseudocercospora opuntiae*) en sistemas productivos de nopal (*Opuntia* spp.) para fruta y verdura en México occidental (Ojuelos y Zapopan, Jalisco). La patogenicidad y virulencia del hongo se mostró en cladodios pre-cortados, en plantas completas en condiciones de campo, invernadero, *in vitro* y en *Phaseolus vulgaris* como una especie hospedera. Asimismo, se utilizaron distintos procesos de micropropagación y multiplicación de los genotipos seleccionados con aparente sanidad. En la obtención de callos el Picloram mostró un desempeño destacable aunque no se pudo obtener regeneración. No fue posible encontrar genotipos por su capacidad embriogénica. La propagación por trozos de cladodios resultó óptima para incrementar material seleccionado; los genotipos evaluados mostraron una respuesta diferencial en cuanto a número y longitud de brotes bajo las mismas condiciones ambientales y edad del cladodio. Se estableció un protocolo de germinación en semillas de diez cultivares de *Opuntia* spp. *in vitro* y *ex vitro*. La germinación se incrementó en un 40 % por escarificación mecánica. Se demostró que el ácido giberélico juega un papel esencial en la promoción de la germinación (por encima de 90 %), mediante el aumento de la actividad amilolítica en las semillas germinadas. Por otro lado se obtuvo un extracto de *Pseudocercospora opuntiae* en el que se evaluaron actividades enzimáticas de amilasa, proteasa y celulasa enzimas relacionadas con la patogenicidad y virulencia del hongo. También se observó que el extracto fungíco tiene la capacidad de generar patogenicidad en explantes jóvenes de *Opuntia* spp. con síntomas similares a los generados por el hongo puro. A través de colectas a campo y pruebas de patogenicidad, se seleccionaron materiales resistentes y susceptibles a la enfermedad. Se realizó un análisis de ISSR con el DNA genómico de los genotipos de interés. Los resultados de ISSR fueron evaluados en un dendrograma y componentes principales; que mostró que existe un agrupamiento entre los genotipos obtenidos como resistentes (R) y susceptibles (S). Un aporte importante fue el perfil fitoquímico de elementos de defensa en cladodios de *O. ficus-indica*; los metabolitos analizados: taninos condensados, compuestos fenólicos totales, flavonoides, se encontraron en mayor cantidad en los genotipos resistentes en comparación con los susceptibles. Asimismo existen diferencias en el contenido de proteínas entre ambos genotipos.

**ABSTRACT**

In this research the causal phytopathogenic fungus *Pseudocercospora opuntiae* disease in cactus pear production systems (*Opuntia* spp.) for fruit and vegetable in western Mexico (Ojuelos and Zapopan, Jalisco) was morphologically and molecularly identified. The pathogenicity and virulence of the fungus that was shown in pre-cut cladodes, whole plants under field and greenhouse conditions, in vitro explants and *Phaseolus vulgaris* as a host specie. Also, different micropropagation and multiplication processes of selected genotypes with apparent health were used. In callus generation, Picloram showed a remarkable performance but it could not produce regeneration. It was not possible to find genotypes with embryogenic capacity. Propagation by pieces of pads was optimal to increase the selected material. The evaluated genotypes showed a differential response in terms of number and length of sprouts under the same environmental conditions and cladode age. It was established a protocol on seed germination of ten *Opuntia* spp. cultivars *in vitro* and *ex vitro*. Germination was increased by 40 % using mechanical scarification. It was shown that gibberellic acid plays an essential role in promoting germination (above 90 %), as in the remobilization of carbohydrates, by increasing the amylolytic activity in germinated seeds. Moreover it was obtained an extract of *P. opuntiae* in this enzymatic activities of amylase, cellulase and protease were evaluated. These enzymes are related to pathogenicity and virulence of the fungus. It was also observed that the extract has the ability to generate pathogenicity in young *Opuntia* spp. explants. The fungal extract causes similar symptoms to those generated by pure fungus. Through field selection and pathogenicity tests, resistant and susceptible genotypes to the disease were selected. ISSR analysis of genomic DNA with genotypes of interest was conducted. ISSR results were evaluated in a dendrogram and principal components it showed that there is a grouping among the genotypes obtained as resistant (R) and susceptible (S). An important contribution of the study was the determination of phytochemical elements of defense against biotic factors in *O. ficus-indica* cladodes. Condensed tannins, total phenolic compounds, and flavonoids, were found in greater amounts in resistant genotypes compared to susceptible ones. There are also differences in the protein content between genotypes.

## INTRODUCCIÓN

Por mas de 9,000 años los nopales han sido consumidos por los habitantes de México y Colón los llevó a Europa en su segundo viaje en 1494, para evitar el problema de escorbuto (Kiesling, 1998).

*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller produce sabrosos frutos que se comercializan en más de 20 países en todo el mundo; también puede ser materia prima para biocombustibles, la apertura de oportunidades de investigación que se ocupan de convertir su lignocelulosa en azúcares y alcoholes es amplia. Debido a los datos existentes, *O. ficus-indica* (L.) Miller es una planta modelo para la exploración de las relaciones entre alta y baja temperatura, relaciones hídricas, y la productividad de biomasa en ambientes actuales y futuros, siempre que se preserve su estado sanitario general (Nobel, com. pers.).

En 1992 investigadores de Chile y México mostraron que las opuntias podían tener una productividad de 50 t de materia seca por hectarea y por año (García de Cortázar y Nobel 1992; Nobel y col., 1992). Esto supera la productividad anual de más de 99 % de todas las especies de plantas. Esta alta productividad ha sido aprovechada para el ganado vacuno, ovejas y cabras, especialmente en México, Chile, Perú, Brasil y Túnez; y en los últimos años Marruecos, y Argelia, sólo en México los cladodios se utilizan para el consumo humano a gran escala (Flores-Valdez, 2003).

Según Inglese (2010), Perú cuenta con aproximadamente 35,000 ha naturalizadas dedicadas en su mayoría a la grana cochinilla. En Brasil existen cerca de 500,000 ha cultivadas destinadas a forraje. Italia cuenta con 2,500 ha cultivadas para producción de fruta y Argentina y Chile, cerca de 1,100 ha en cada país. También es importante en el norte de África (Argelia, Egipto, Libia, Marruecos y Túnez, entre otros); solamente en Túnez habría entre 500,000 y 600,000 ha cultivadas y se pueden encontrar superficies menores en Bolivia, España, Estados Unidos de América, Israel, Jordania, Sudáfrica y Venezuela. Dada la alta dispersión de estas especies, las estadísticas oficiales son escasas y no se dispone de información precisa sobre la superficie plantada de nopales y sus destinos: tuna, nopalito, forraje o producción de grana cochinilla (Saénz, 2006).

El nopal es uno de los recursos más importantes de las zonas áridas y semiáridas de México. Como cultivo comercial está establecido en el Distrito Federal, Morelos, Estado de

México, Baja California Norte. En el estado de Jalisco se cultivan más de 2,400 ha para la obtención de fruta (tuna) y una superficie superior a las 1,500 ha para verdura (nopalito o cladodios tiernos); en términos de la producción nacional, representan una participación alrededor del 3 y 4 %, respectivamente, cifras significativas cuando se pondera la producción nacional anual, superior a 190,000 t de tuna y 600,000 t de nopalito (SIAP, 2013).

Las opuntias tienen reproducción sexual y asexual, de forma sexual mediante semillas y asexual a través de los cladodios. Para el establecimiento de las plantaciones comerciales no se utilizan las semillas, ya que al provenir de polinización cruzada, la combinación genética de cada una produce un genotipo independiente, y por consiguiente las plantas resultantes son muy heterogéneas (Pimienta y col., 1995). Por ello las plantaciones se establecen de manera asexual, ya que se permite la selección de plantas con características deseables, como lo son vigor notable (mayor tamaño y peso), precocidad para pronta madurez y cosecha, buen estado de salud, resistencia a plagas y enfermedades (Ochoa, 2013). Sin embargo se conoce que la variabilidad que genera el cultivo de embriones cigóticos provenientes de semilla puede incrementar la resistencia frente a microorganismos fitopatógenos. Las semillas de *Opuntia* presentan baja capacidad de germinación y alta latencia Altere y col. (2006) por lo que las plantulas provenientes de semillas, han sido poco utilizadas en la resistencia a enfermedades.

Los nopales al ser propagados comercialmente por cladodios, se considera que su diversidad genética es reducida (Mondragón-Jacobo, 2004), dicho procedimiento de propagación permite un incremento clonal de materiales genéticos con cualidades destacables, pero también potencialmente perjudiciales, para la proliferación de enfermedades (Fucikovsky, 2002), que en la actualidad han aumentado considerablemente, como consecuencia de factores abióticos como el aumento en los niveles de CO<sub>2</sub> en la atmósfera que acompañan el cambio climático global (Nobel, 2011). El aumento de la temperatura atmosférica continuo puede causar desequilibrios metabólicos en las plantas y consecuentemente enfermedades.

Según Méndez Gallegos y col. (2008) las enfermedades representan uno de los factores bióticos limitantes en el manejo agronómico de cualquier cultivo. En el caso particular del nopal, a pesar de la importancia social y económica que su cultivo y aprovechamiento

representan en el medio rural, los trabajos de investigación científica a nivel nacional, con respecto a las enfermedades son reducidos, por lo que el conocimiento y la literatura que existe sobre el tema es escaso, hecho ya consignado por Pimienta (1990) y Osorio y Soto (1994). Dicha tendencia ha permanecido invariable a través de estos años. Como consecuencia de lo anterior, se presenta una confusión entre la sintomatología y los agentes causales, lo cual dificulta su completa identificación y por ende su control.

Diversas enfermedades se han asociado con el cultivo del nopal en México, entre las de mayor incidencia es el “mal de oro” causada por el hongo *Alternaria alternata* (Granata y Sidoti, 1997), pudriciones blandas de tipo bacteriano cuyo agente causal esta asociado con bacterias del genero *Dickeya* (Fusickovsky, 2002).

En 1990 en el municipio de Tlanepantla, estado de México se detectó por primera vez la enfermedad conocida como mancha negra cuya sintomatología se caracterizaba por lesiones circulares dispersas en el tejido del cladodio, de consistencia acuosa al inicio de la enfermedad y con tejido seco y necrosado de la lesión, que marca el final de la sintomatología. Esta enfermedad provocó en municipios del estado de México baja productividad y pérdida total de huertas (Morales y Hernandez, 2002). Respecto a la etiología de la enfermedad se mencionaba como agente causal a *Colletotrichum gloeosporoides* (Osada y Cárcamo, 1991) y a *Fusarium solani* (Salinas y col., 2006). Sin embargo el primer estudio formal del agente causal de la enfermedad fue reportado por Ayala-Escobar y col. (2006) y Quezada Salinas y col. (2006), como *Pseudocercospora opuntiae*, aunque estudios actuales mencionan que el genero *Fusarium* podría ser el agente causal de la enfermedad (Salinas y col., 2006).

El estudio propuesto por Ayala-Escobar y col. (2006) fue en plantaciones del centro del país y describió poco sobre el ciclo de la enfermedad, procesos de infección, colonización, esporulación y crecimiento de *P. opuntiae in vitro*, lo cual se suma a la escasa información que existe sobre el género *Pseudocercospora*.

En Jalisco la mancha negra se comenzó a detectar desde 1990 (Portillo, com. per.) y su incidencia se mantiene con un incremento drástico, al grado que plantaciones completas han sido devastadas. En los últimos cinco años, su presencia ha alcanzado hasta el 100 % de infección en plantaciones comerciales. Sin embargo no existe reporte sobre *P. opuntiae* como agente causal de la mancha negra en el estado, y a nivel nacional no se tienen

reportes sobre si existen diferencias en cuanto a la variabilidad genética y patogenicidad entre las especies de *Pseudocercospora* que atacan el nopal.

La poca diversidad genética de la cual se inició la expansión del cultivo de nopal, con la consecuente reducción de la variabilidad genética de la especie Caruso y col. (2010); agravó la situación sanitaria de las plantaciones. El análisis molecular y bioquímico de las plantas enfermas comparativamente con las que presentan tolerancia o resistencia a la enfermedad de la mancha negra es una herramienta complementaria útil en la selección (Mondragón-Jacobo, 2001; Chessa, 2010).

Dentro de los programas de mejoramiento genético, la inducción de variabilidad se obtiene mediante la obtención de semillas de polinización abierta en poblaciones cultivadas y silvestres o bien mediante la inducción de mutaciones. Entre las alternativas para las especies de reproducción asexual como el nopal, la selección dentro de nopaleras con aparente sanidad y posterior sometimiento a pruebas de patogenicidad es una alternativa viable para hacer frente a los problemas fitosanitarios que actualmente se presentan en el cultivo, ya que dentro de la variabilidad que se induce, se obtienen cambios en el material genético, con probabilidad de obtener plantas con resistencia a enfermedades fungosas como la causada por *P. opuntiae* (mancha negra). Asimismo el establecer un protocolo de germinación de semillas de *Opuntia* representa una fuente importante de variabilidad frente a la enfermedad provocada por *P. opuntiae*.

Al tomar en cuenta que las selecciones que se generan en las especies perennes que se propagan de una manera asexual corresponden a cambios en las células somáticas, y por consiguiente no existe recombinación genética; se visualiza por consecuencia una ventaja en el mantenimiento y multiplicación vía cultivo de tejidos, por lo que en poco tiempo se puede disponer de una gran cantidad de plántulas para incorporarlas a producciones comerciales.

Muestreos en plantaciones comerciales de nopal en Jalisco han permitido seleccionar plantas con genotipos resistentes al ataque de *P. opuntiae*, las cuales fueron sometidas a los postulados de Koch en condiciones contraladas (Ochoa y col., 2015).

Con base en lo anterior es posible determinar la existencia de compuestos antifúngicos que pudieran ser sintetizados por los genotipos resistentes para contrarrestar el daño por *P. opuntiae*.

La síntesis de compuestos antifúngicos está relacionada con el sistema de defensa de la planta, en la producción de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR), tales como quitinasas, glucanasas y peroxidasas, cuya producción está relacionada con la interacción planta-patógeno, completando la integración del estudio.

## **HIPÓTESIS**

Existe variabilidad genética en el género *Opuntia* en la tolerancia a la enfermedad “mancha negra del nopal” cuyo agente causal es *Pseudocercospora opuntiae*.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Contribuir al conocimiento de la mancha negra del nopal mediante la selección, generación y multiplicación de genotipos resistentes o tolerantes, a través del uso de técnicas convencionales y biotecnológicas.

### Objetivos específicos

Determinar morfológica y molecularmente el agente causal de la enfermedad “mancha negra” en sistemas productivos de nopal en Jalisco, México, así como su patogenicidad y tolerancia en especies hospederas.

Obtener, establecer y multiplicar genotipos de *Opuntia* sps. con aparente tolerancia a la mancha negra *Pseudocercospora opuntiae*.

Obtener plantas de nopal a partir de semillas producidas bajo polinización abierta.

Estudiar el efecto del extracto fúngico extracelular e inóculo puro de *P. opuntiae* sobre plántulas nopal bajo condiciones *in vitro*.

Determinar la variabilidad genética de las diferentes líneas de plantas seleccionadas como susceptibles, resistentes a *P. opuntiae* mediante marcadores ISSR (Inter Simple Sequence Repeat).

Evaluar e identificar en los genotipos resistentes mecanismos de defensa que pudieran afectar el desarrollo de *P. opuntiae*: proteínas de defensa (PR), metabolitos secundarios.

## CAPITULO I

### **“Mancha negra” causada por *Pseudocercospora opuntiae* en sistemas productivos de nopal en Jalisco, México.**

En este trabajo se estudió el agente causal de la mancha negra *Pseudocercospora opuntiae* en cuanto a su variabilidad morfológica y molecular, patogenicidad y virulencia en sistemas productivos de nopal verdura y fruta en Jalisco, México. La patogenicidad del hongo se demostró en cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller pre-cortados, plantas de campo e invernadero, en explantes *in vitro* y en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*). El estudio es el primero de verificación del agente causal de Jalisco.

Este capítulo ha sido publicado en el Journal of the Professional Association for Cactus Development **JPACD**, a continuación se incluye el artículo.



**JOURNAL OF THE PROFESSIONAL ASSOCIATION FOR  
CACTUS DEVELOPMENT**

**REVISTA CIENTÍFICA DE LA ASOCIACIÓN  
PROFESIONAL PARA EL DESARROLLO DE LAS  
CACTÁCEAS**

April 27<sup>th</sup>, 2015.

**DR. LIBERATO PORTILLO  
DEPARTAMENTO DE BOTANICA Y ZOOLOGIA.  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
ZAPOPAN, JALISCO, MEXICO**

This letters is to inform you and your colleagues that your article:

**“Black spot caused by *Pseudocercospora opuntiae* in cactus pear productive systems of Jalisco, Mexico”**

Maria Judith Ochoa<sup>1,2</sup>, Luis Angel Rivera<sup>3</sup>, Ramon Ignacio Arteaga-Garibay<sup>4</sup>, Marcos Daniel Martinez Peña<sup>4</sup>, Javier Ireta<sup>3</sup>, Liberato Portillo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. Av. Belgrano 1912, CP 4200 Santiago del Estero, Argentina.

<sup>2</sup>Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara. A. Post. 1-139, Zapopan, Jalisco 45101, Mexico, [portillo@cencar.udg.mx](mailto:portillo@cencar.udg.mx)

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Rancho Las Cruces, Tepatitlán de Morelos, Jalisco 47600, Mexico.

<sup>4</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP, Rancho Las Cruces, Tepatitlán de Morelos, Jalisco 47600, Mexico.

It has been **ACCEPTED** for PUBLICATION ON LINE: **JPACD-2015, Vol. 17.**

Thank you for choosing the JPACD for the diffusion of your important research findings.

Sincerely yours,

Dr. Gilberto Aranda Osorio  
Editor in Chief of the JPACD

Ochoa et al. 2015

## Black spot caused by *Pseudocercospora opuntiae* in cactus pear productive systems of Jalisco, Mexico

María Judith Ochoa<sup>1,2</sup>, Luis Ángel Rivera<sup>3</sup>, Ramón Ignacio Arteaga-Garibay<sup>4</sup>, Marcos Daniel Martínez-Peña<sup>4</sup>, Javier Ireta<sup>3</sup>, Liberato Portillo<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina. Av. Belgrano 1912, CP 4200 Santiago del Estero, Argentina.

<sup>2</sup>Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara. A. Post. 1-139, Zapopan, Jalisco 45101, México.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Rancho Las Cruces, Tepatitlán de Morelos, Jalisco 47600, Mexico.

<sup>4</sup>Centro Nacional de Recursos Genéticos-INIFAP, Rancho Las Cruces, Tepatitlán de Morelos, Jalisco 47600, México.

\*Corresponding Author: [liberatoportillo@hotmail.com](mailto:liberatoportillo@hotmail.com)

Received: October 15, 2014; Accepted: April 27, 2015

### ABSTRACT

Black spot is an important fungal disease widely spread in different cactus pear production systems in Mexico. In Jalisco, the disease was detected in the 1990's; nowadays almost 100% of plantations are damaged by it. The objective of this paper was to study the morphological variability, pathogenicity and virulence of the causal agent in cactus pear production systems, for fruit and vegetable (nopalitos) crops, in Jalisco, Mexico. *Pseudocercospora opuntiae* was isolated and characterized morphologically and molecularly from cladodes collected in cactus pear production systems of Zapopan and Ojuelos showing advanced symptoms of the disease. *Pseudocercospora opuntiae* exhibited high growth rates and conidia development in malt extract at 2% in 16/8 h light/darkness at 26°C. Pathogenicity and virulence were tested in healthy cladodes under field and greenhouse conditions, as well as on individual cladodes, *in vitro* young explants and *Phaseolus vulgaris* inoculated with the fungus. *Pseudocercospora opuntiae* was able to infect under all established conditions, the first symptoms appeared 120 days after inoculation. This is the first report of isolation, identification, morphological and molecular characterization, and pathogenicity of the causal agent of cactus pear black spot in Jalisco, Mexico.

**Keywords:** *Opuntia*; plant disease; pathogenicity tests; nopalitos.

### INTRODUCTION

*Opuntia* species are native plants of several environments in the Americas, from arid zones at sea level to high elevation arid zones of Andean regions of South America. They are in tropical regions of Mexico, Central and South America and the Caribbean (Anderson, 2001), where temperatures are always above 5°C and in areas of Canada may reach as low as -40°C (Nobel, 2011). For this reason, these plants can be a valuable genetic resource for very diverse ecological zones (Nobel and Bobich, 2002).

According to Inglese (2010), in Mexico *Opuntia* is cultivated in 100,000 ha for fruit production and in more than 1'000,000 ha for forage production. The highest producing states are:

Ochoa et al. 2015

Distrito Federal with 4,159 ha; Morelos 1,745 ha; Estado de Mexico 785 ha (Quezada-Salinas et al. 2006) and Jalisco 2,400 ha for fruit and 1,500 ha for nopalitos, with Zapopan and Ojuelos being the primary producing municipalities (SIAP, 2013).

Production level in many cactus pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) plantation systems are low due to scarce economic and social conditions, germplasm quality, dissimilar environments and high incidence of plagues and diseases. Diverse diseases have been associated with decreasing cactus pear production; among the most important ones are "mal del oro", caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. (Granata and Sidoti, 1997), a type of soft rotting related to the bacterium *Dickeya* (Fusickovsky, 2002).

Another recently reported disease is "black spot"; its causal agent was identified in central Mexico as *Pseudocercospora opuntiae* Ayala-Escobar, U. Braun, & Crous (Quezada-Salinas et al. 2006; Ayala-Escobar et al. 2006). However, the causal agent of black spot has also been suggested to be other genera (Flores et al. 2013). Likewise, the infection, colonization and sporulation process of the disease remain to be studied (Quezada-Salinas et al. 2013). This fungal pathogen has a great impact on those plantations without proper sanitary management, presenting plant losses from 70–100%, as black spot is a disease causing severe reduction of the photosynthetic area and eventually the death of cladodes (Ochoa, 2013). In the state of Jalisco this disease was detected in 1990, and since then its incidence has increased dramatically, but there is very little information about morphology, mechanisms of pathogenicity, and virulence of the causal agent of black spot. This condition has motivated the aim of the present work to isolate and characterize this fungus in different cactus pear productive systems in Jalisco, Mexico and to confirm it is the same causal agent previously described.

## MATERIALS AND METHODS

Cladodes with different symptoms of the disease were gathered during the humid and dry seasons of 2012 and 2013 in cactus pear commercial plantations of Ojuelos (Lat. N 21° 43' 41.8", 2,280 masl) and Zapopan (Lat. 20° 78' 33", 1,420 masl), in Jalisco, Mexico, designated for fruit and vegetable (nopalito) production, respectively. Portions of cladodes (0.5 cm<sup>2</sup>) were dissected from symptomatic tissues and the stomata cavity. They were disinfected with 1.5% sodium hypochlorite (NaOCl) for 1 min, rinsed three times with distilled sterile water, dried on paper towels, and established on water-agar (WA) (30 g/L of agar in distilled water). From this material, compatible pseudostromata and conidia of *Pseudocercospora* type were isolated and identified following Quezada-Salinas et al. (2006) and Ayala-Escobar et al. (2006). Samples and media were incubated under natural conditions.

### Morphological characterization

In order to find the best conditions for morphological development and conidia production, the fungus was cultivated from 5 mm mycelium discs in Petri dishes containing *Opuntia* agar (OPA) (40 g cactus pear cladodes boiled for 10 min and then blended with 20 g agar, 1 L distilled water); potato dextrose agar (PDA) (200 g potatoes, 20 g de dextrose, 20 g agar, 1 L distilled water) (Gams et al., 1998); WA medium; malt extract (MEA) (15 g malt, 20 g agar, 1 L distilled water) (Gams et al. 1998); and V8® juice suspension 30%. 10 Petri dishes for each medium were incubated 16/8 h light/darkness under near-ultraviolet lights at 27°C.

Ochoa *et al.* 2015

Evaluations were carried out after 30 and 60 days (d) by means of direct observations of colony diameter, color and texture, conidia production and mycelium growth. An analysis of variance and a multiple comparisons using a Tukey test were applied. Statgraphics Centurion XVI 2010 (version 16.1.15, StatPoint Technologies, Inc) was used to perform statistical analyses.

Morphological characterization of conidia was carried out with an Olympus® mod. CX 31 microscope with analysis of image Pro-bonus® software, size (length and width) and septa number for conidia were recorded. For every mounted sample, information from 30 isolated conidia was taken. Conidia were differentiated from conidiophores by color, size and abscission scar form, which was olive-green color and thin; its identification was done following Quezada-Salinas *et al.* (2006) and Ayala-Escobar *et al.* (2006).

### Pathogenicity tests

Pathogenicity and virulence of the isolations were tested by means of inoculating pre-cut cladodes, young *in vitro* explants (in the laboratory), and cladodes of approximately six months of age in field and greenhouse conditions. In order to test pathogenicity in other host plants, *Phaseolus vulgaris* L. (Saparrat *et al.* 2009) was inoculated with a concentration of  $8 \times 10^{-3} \text{ mL}^{-1}$  conidia, generated in MEA with a photoperiod of 16/8 h light/darkness at 27°C, using a phosphate buffer for conidia adherence. Pre-cut cladodes were inoculated with 200 µL with the same conidia concentration, once infected they were placed in chambers with 85% humidity. *In vitro* inoculation of young explants was carried out by injecting 20 µL of conidia suspension into stem tissue. *In vitro* explants were tested on WA with 25% of nutritive salts of MS (Murashige and Skoog, 1962) with 4 g L<sup>-1</sup> activated charcoal. Twelve plants in field conditions of approximately six months of age were inoculated by manual aspersion and during the first 10 d were covered with plastic bags to increase relative humidity. Symptoms were evaluated every week by direct observation and following Quezada-Salinas *et al.* (2006) and Ayala-Escobar *et al.* (2006).

To evaluate pathogenicity activation and virulence of *Pseudocercospora* isolated from *Opuntia ficus-indica* cladodes, infection tests in *Phaseolus vulgaris* plants were performed, as this plant is susceptible to *Pseudocercospora griseola* (Sacc.) (Saparrat *et al.* 2009). Twelve plants of 20 d of development were used to test *Pseudocercospora* pathogenicity. Plant inoculation was carried out with colonies of 60 d of development with abundant conidia production on WA, MEA and OPA media. For *Phaseolus vulgaris* inoculation, 50 µL of conidia suspension were placed on two leaves. Controls were sprayed with sterile buffer; plants were placed into a micro tunnel, which was used as a humid chamber.

### Molecular characterization

The isolated *Pseudocercospora* strain was subcultured on PDA agar at 28 °C for 72 h. Obtaining the total DNA for genetic identification was done as per Wallace (1987) for DNA extraction technique modified with phenol-isoamyl alcohol with proteinase K and RNase. The pellet was air-dried, and the DNA was resuspended in 100 µL of DNase-free water. The purified DNA sample was stored at -20 °C until use.

DNA samples were amplified using the primer forward ITS1 5'-CTT GGT CAT TTA GAG GAA GAT A-3' and ITS4 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT-3' (White *et al.* 1990; Redecker

Ochoa *et al.* 2015

2000; Unoura *et al.* 2011). PCR products were purified using EZ-10 Spin Column PCR Products Purification Kit BS363 (BioBasic Inc., Carlsbad, CA, USA), according to manufacturer's instructions. The product was directly sequenced on an ABI-PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Ontario, Canada) using the forward primer. Ambiguous and incorrectly called bases were manually corrected using BioEdit software, version 2.01 (Technelysium Pty Ltd) and Seaview software version 4.3.3 (Gouy *et al.* 2010). Sequences were then searched using the NCBI BLAST algorithm and GenBank database (<http://www.ncbi.nih.gov>); those from the top BLAST hits were downloaded for further phylogenetic comparison.

A multiple sequence alignment was performed using the program Clustal X, version 2.0, and the resulting alignment was edited using SeaView (Galtier *et al.* 1996). A phylogenetic tree was constructed based on the sequence distances using Maximum Parsimony algorithm. The phylogenetic analyses were performed using Mega 6 (Tamura *et al.* 2007). Stability or accuracy of the inferred topology was assessed via a bootstrap analysis of 1,000 pseudoreplicates.

## RESULTS AND DISCUSSION

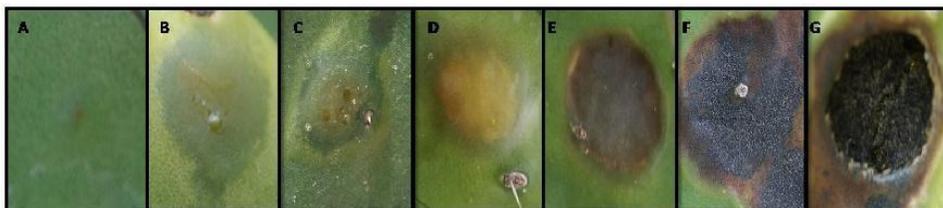
### Morphological characterization

In an advanced condition of the disease, symptoms found in cactus pear commercial plantations of Ojuelos and Zapopan infected with black spot presented a black subcircular necrotic spot, having low incidence in summer and higher incidence in autumn and the beginning of winter. Coincidence of maximum rainfall periods and relative humidity is an ideal situation for conidia penetration across stomata, according to Ávila *et al.* (2004) for *Pseudocercospora* in olive plantations. The incubation cycle of this pathogen was very slow, with the first symptoms appearing 90 d after plants became infected, which agrees with Quezada-Salinas *et al.* (2006) and Ayala-Escobar *et al.* (2006).

Symptoms of fungal infection appear quickly once *Pseudocercospora* is established: in 8 days qualification goes from a 1 to a 7 in a heptadecimal scale (Figures 1A-G). Injuries initiate with cuticle discoloration in a light green circular shape spot with a small brown point at the center (Figure 1A), which become transparent and oily in appearance (Figure 1B) and an increase in the size of the central brown color, presenting a yellow margin (Figure 1C). Later, the cladode tissue presents a light brown color within the circular spot (Figure 1D), which changes to a dark brown color, presenting collapsed tissue (Figure 1E).

Affected tissues turned black and formations of conidiophores and conidia emerged in small gray protuberances (Figure 1F). Finally, the affected zone changed to a black color and sank across the cladode (Figure 1G). Injuries reached 3–4 cm diameter at the end of the infection cycle. Different symptoms can appear simultaneously in the same cladode.

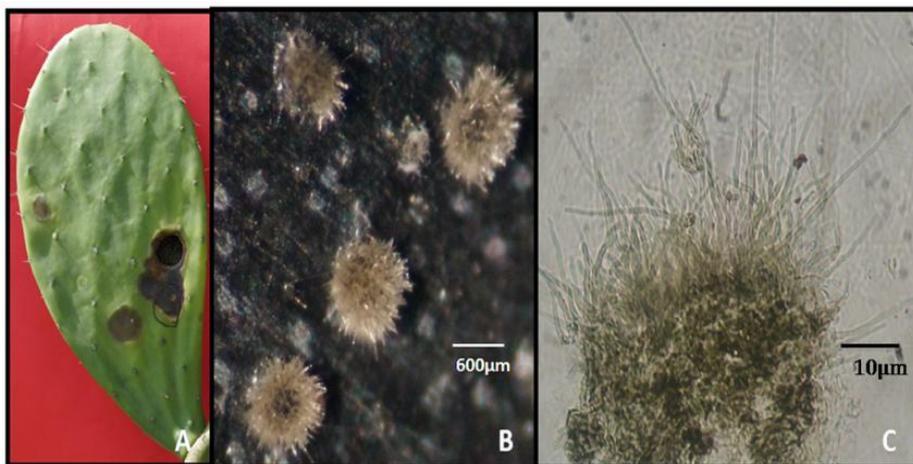
Ochoa et al. 2015



**Figure 1.** Symptom progression caused by *Pseudocercospora opuntiae* in cactus pear after 90 d of infection. A) symptom 1, B) symptom 2, C) symptom 3, D) symptom 4, E) symptom 5, F) symptom 6, and G) symptom 7.

Conidiophores and conidia were obtained from *Pseudocercospora* isolations in WA medium after 60 d under natural conditions of light and temperature, which formed colonies of about 1 cm diameter and olive-green color mycelium.

Pseudostromata immersed across olive color stomata of 45-150  $\mu\text{m}$  diameter were located in cactus pear infected tissue (Figuras 2A-C). Conidiophores were dark olive in color of subcylindrical fascicles, without branches (16.47  $\mu\text{m}$ ), and obclavate to cylindrical conidia with conical truncated base, obtuse ends, from 3 to 8 septa, and a thin olive color abscission scar (0.5-1.0  $\mu\text{m}$ ).



**Figure 2.** Symptoms of black spot in circular shape found in cactus pear plantations in Ojuelos and Zapopan, Jalisco, Mexico. A) cladode with circular dark brown spots with tissue necrosis, B) pseudostromata type with conidiophores in fascicles, C) pseudostromata with conidiophores and conidia (lateral view).

For conidia formation, the *Pseudocercospora* strain was transferred to MEA medium where a large number of conidia were generated after 30 d under 16/8 h light/darkness and 27°C. In this medium, olive-green inner mycelia developed with conidia of 20-89  $\mu\text{m}$  length and 2.5-6.0  $\mu\text{m}$  width on average, from three to eight septa with a size of 16.43  $\mu\text{m}$  (Figures 3A-F). These morphological characteristics agree with those reported by Beiharz (1994) for *Pseudocercospora* and also match morphological analyses for *P. opuntiae* (Ayala-Escobar et al. 2006; Quezada-Salinas et al. 2006).

Ochoa et al. 2015

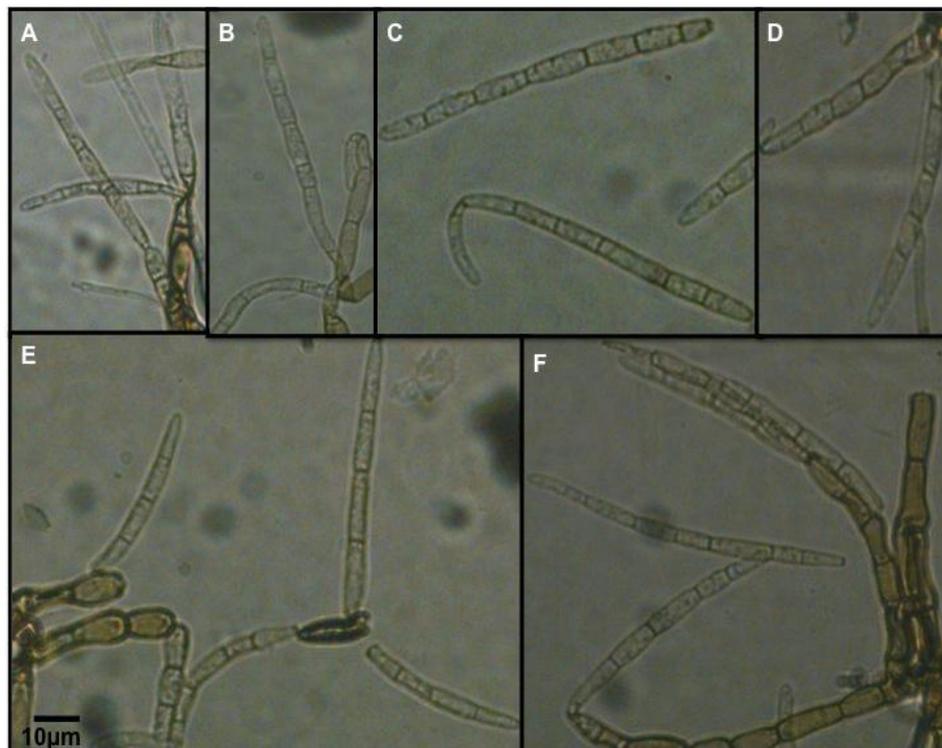
After 30 and 60 d of inoculation in all media, diameter, color and texture of the colony, as well as conidia production and mycelium growth were evaluated. After 60 d *Pseudocercospora* presented different morphologies in all media (Table 1), producing abundant pseudostromata, conidiophores and conidia. Highest conidia production was in MEA medium with 16/8 h light/dark and at 27°C. These results differ from those reported by Ayala-Escobar et al. (2006), who found the best *Pseudocercospora* development in OPA media. On the other hand, the use of near ultraviolet wavelength light was not necessary for its sporulation, as cited by Barrera (2011).

**Table 1.** Morphological characteristics of *Pseudocercospora opuntiae* colonies after 30 and 60 d of inoculation in all media.

Medium	Colony diameter (cm) after 30 d	Colony diameter (cm) after 60 d	Color	Mycelium	Conidia
MEA	2.16±0.091 <sub>c</sub>	4.18±.16b	brown/ olive-green	Aerial	Presented at 30 d
V8®	2.63±.07 a	6.8±.15c	dark green/whitish	Aerial	Presented at 60 d
NA	1.46±.16 d	1.86±.15d	dark green/whitish	Aerial	No presented
WA	2.27±.07 b	4.48±.2a	Olive-green	Immersed	Presented at 30 d

Means followed by the same letter are not significantly different ( $p = 0.05$ ) using Tukey test.

Ochoa et al. 2015



**Figure 3.** Different sizes of conidia and conidiophores developed in MEA. A), B) and D) brown and olive-green conidia united to branched conidiophores, C), E) and F) solitary cylindrical conidia with a marked thin abscission scar.

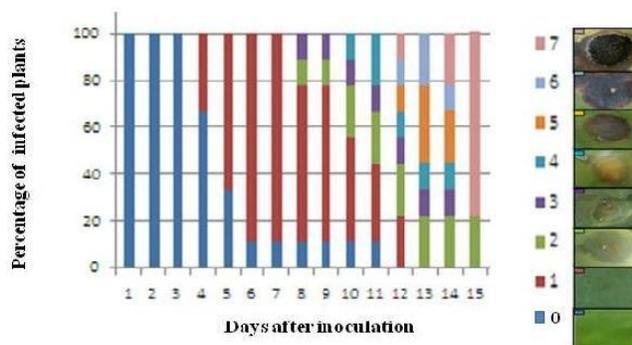
### Pathogenicity tests

Black spot symptoms in cut cladodes appeared after 30 d of infection with cuticle discoloration. The presence of dark brown spots originated from the infection point and exhibited symptomatic dehydrated tissue. Landa (2012) found that cut cladodes are more vulnerable to *Salmonella typhimurium* in comparison with cladodes collected by removal at the nodes, which indicates that defense mechanisms may diminish when cladodes are cut, allowing the establishment of diseases in less time. Saéñz *et al.* (2006) indicated that horticultural products after harvest present a fast senescence process and become more susceptible to microorganism invasion.

Injuries of material grown under field conditions were taken for symptom evaluation. Conidia concentration  $8 \times 10^{-3} \text{ mL}^{-1}$  is ideal to induce black spot, as reported by Quezada-Salinas *et al.* (2006). After 30 d, 20% of field and greenhouse inoculated plants, presented symptom 1 characterized by the appearance of circular to oval spots, which were oily and light green in color. This symptom prevailed in the majority of the plants without an apparent advance up to week 9, where 5% presented symptoms 2 and 3. Symptoms 4, 5 and 6 appeared from week 10 on. Finally, symptom 7 began in 5% of the plants in week 12 and evolved rapidly in week 14 and 15, where 78% of the plants presented collapse of affected tissue. In field and greenhouse conditions, only two of the infected plants presented the advance of the disease up to symptom 2. These results demonstrated (Figure 4) that *Pseudocercospora opuntiae*

Ochoa *et al.* 2015

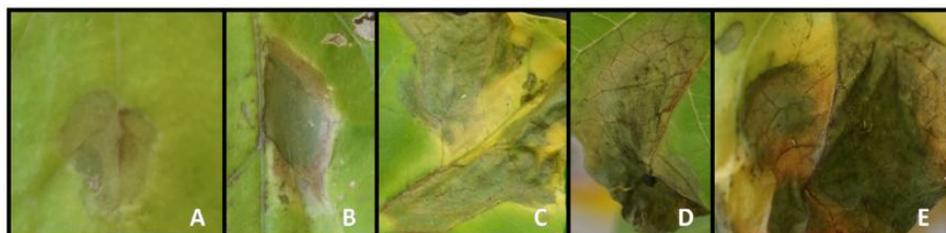
has a very long incubation period, which in controlled infection conditions encompasses approximately 109 d, coinciding with those results from Quezada-Salinas *et al.* (2006).



**Figure 4.** Symptoms progression after inoculation. Scale: 0 healthy plant, 1-7 observed symptoms: 1-2: Initial cuticle discoloration changing to a clear green color with small olive-green points; 3-5: Spots turn dark brown and their diameter increases to 3-4 cm, presenting a yellow margin and sinking of central part additionally; 6-7: The affected part dries up leaving a visible woody tissue, in many occasions it becomes detached leaving orifices that cross the cladode.

Nevertheless, differing from what Quezada-Salinas *et al.* (2006) report, symptom 7, where the injury becomes a black-colored circle, did manifest at the end of the infection cycle. Besides that, symptoms appeared in a similar way and in the same period in field and greenhouse incubation conditions. Injuries observed in infected plants corresponded to circular spots with more intense black color in comparison to those found in commercial plantations. Morphology of injuries under controlled infection conditions depends on the manner in which inoculation is carried out, as was demonstrated by Quezada-Salinas *et al.* (2006).

After 25 d, plants of *Phaseolus vulgaris* presented oily spots of light green color (Figure 5A). Around the spots, chlorotic tissue appeared and spread on the leaf surface (Figure 5B). The advance of symptoms was delimited by the appearance of yellowish tissue with an oily consistency (Figure 5C). Affected tissue suffered total necrosis (Figure 5D) throughout the entire leaf surface (Figure 5E). These symptoms appeared from the inoculation of three culture media (WA, MEA and OPA).



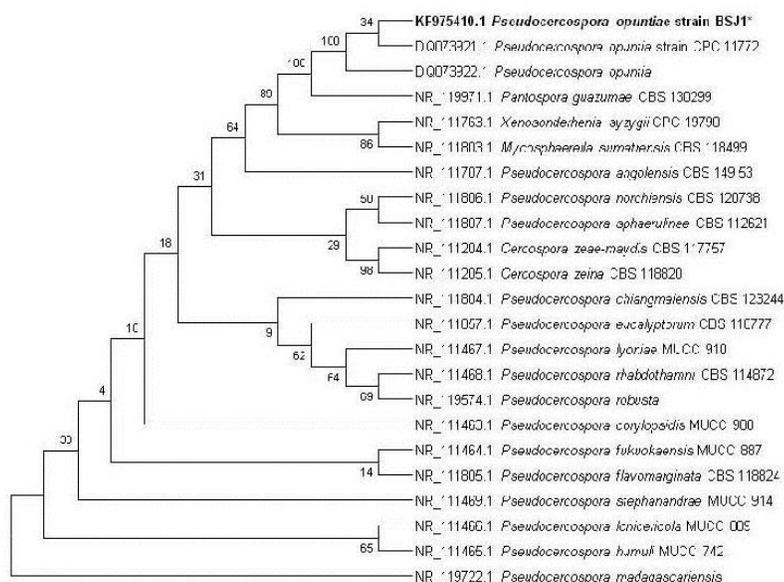
**Figure 5.** Symptom progression in *Phaseolus vulgaris* caused by *Pseudocercospora opuntiae* isolated from *Opuntia ficus-indica* cladodes.

Ochoa et al. 2015

Symptoms provoked by *Pseudocercospora* in *P. vulgaris* plants are similar to those found in *Opuntia* cladodes but likely due to tissue consistency, injuries were observed with major intensity and in less time. That a *Pseudocercospora* strain isolated from black spot injuries of *Opuntia* cladodes has the ability to infect other species of economic importance, verifies that *P. opuntiae* may not always be host-specific, which indeed represents huge implications in the epidemiology of the disease needing be studied.

### Molecular characterization

A comparison of the sequence obtained in this study with those deposited in GenBank database was performed using DNA sequence alignment in BLAST and a phylogenetic analysis. The nucleotide sequence was identified as *Pseudocercospora opuntiae* BSJ1 (GenBank accession number: KF975410). Identity of sequences was determined based on the highest percentage (a minimum of 97%) of total nucleotide match with sequences from nucleotide database in the GenBank (Rosselló-Mora and Amann, 2001; Morgulis et al. 2008), and were corroborated with a phylogenetic analysis (Figure 6).



**Figure 6.** Phylogram based on the ITS 1 and 2 region sequences of *Pseudocercospora* strain identified in this study. The tree was generated using the Maximum Parsimony method. Data set was subjected to 1,000 bootstrap pseudoreplicates. Reference sequences were obtained from GenBank database. Sequence from the isolated strain is indicated by an asterisk. GenBank accession numbers are given in the labels.

### CONCLUSIONS

Black spot is a severe disease in several cactus pear producing regions of Mexico, its etiology was described for the center of the country, but other regions need accurate information of the disease in their own environment.

Ochoa *et al.* 2015

In this research, the fungus involved with black spot symptoms in cactus pear cladodes from productive systems (fruit and vegetable) in western Mexico (Ojuelos and Zapopan, Jalisco) was identified. The study is the first verification of the causal agent for Jalisco. Though the isolated fungus shows some variations in morphological characteristics of development, amplification of the ITS region revealed a high level of conformity with taxonomic identification reported by Quezada-Salinas *et al.* (2006).

Pathogenicity of the isolated fungus from cladodes showed the symptoms in pre-cut cladodes, field and greenhouse plants, and *in vitro* explants. Virulence also was shown in *Phaseolus vulgaris* and different symptoms than those reported by Saparrat *et al.* (2009) for *Pseudocercospora griseola* were observed.

The causal agent of cactus pear black spot in the state of Jalisco, in Mexico, corresponds to *Pseudocercospora opuntiae*. Fungal infection route, as well as incidence level (low in summer and high in autumn), will allow us to recommend cultural management practices which may reduce host inoculum and infection. Knowledge of inoculum sources, the manner in which the fungus infects, infection time, and pathogen response to environmental temperature may aid in the control of this pathogen.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Sincere thanks are due to Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (from Mexico) and Universidad Nacional de Santiago del Estero (from Argentina) for funding this research.

#### REFERENCES

- Anderson, E. F. 2001. The cactus family. Timber Press, Portland, OR.
- Ávila De La Calle, A., Benali A., and Trapero Casas A. 2004. Variabilidad morfológica y cultural de *Pseudocercospora cladosporioides*, agente del emplomado del olivo. Boletín de Sanidad Vegetal Plagas 30:369-384.
- Barrera, B.A. 2011. Etiología de un síndrome fungoso y viral en cladodios de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*). Ph.D. Thesis, Colegio de Posgraduados, Montecillo, Mexico.
- Ayala-Escobar, V., Yañez-Morales M.J., Braun U., Groenewald J.Z., and Crous P.W. 2006. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. Fungal Diversity 21:1-9.
- Beilharz, V.C. 1994. Cercosporoid fungi on Australian native plants. PhD Thesis, University of Melbourne, Australia.
- Flores P, S., López J. C., Núñez E. C., Jiménez Castañeda V., and Sánchez J. L. 2013. Control biológico de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica*) en Milpa Alta D. F. 4º Congreso Internacional Biología, Química, Agronomía. Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Fucikovsky, L. 2002. Diseases of sole tropical and subtropical plants caused by bacteria, JPACD (2015) 17: 1-12

## Ochoa et al. 2015

- phytoplasmas and spiroplasmas. Guadalajara, Mexico. Universidad de Guadalajara and Colegio de Posgraduados.
- Galtier, N., Gouy M., Gautier C. 1996. SEAVIEW and PHYLO\_WIN: Two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer Applications in the Biosciences* 12:543-548.
- Gams, W., Hoekstra E.S., and Aptroot A. 1998. *CBS Course of Mycology*. Baarn, Netherlands. Centraalbureauvoor Schimmelcultures.
- Gouy, M., Guindon S., and Gascuel, O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution* 27:221-224.
- Granata, G., and Sidoti A. 1997. Appearance of *Alternaria* golden spot on cactus pear in Italy. *Acta Hort.* 438:129-130.
- Inglese, P. 2010. Cactus pear, *Opuntia ficus-indica* L. (Mill.) for fruit production: An overview. *Cactusnet Newsletter* 12:82-92.
- Landa, S., P. 2012. Calidad sanitaria de jugos de nopal, persistencia de *Salmonella typhimurium* respuesta de defensa de nopal verdura. PhD Thesis, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico.
- Morgulis, A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agarwala R., and Schäffer A.A. 2008. Database indexing for production megablast searches. *Bioinformatics* 24:1757-1764.
- Murashige, T., and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-479.
- Nobel, P. 2011. Sabiduría del desierto, agaves y cactus: CO<sub>2</sub>, agua, cambio climático. Montecillo, Mexico. Colegio de Postgraduados.
- Nobel, P., and Bobich E.G. 2002. Environmental Biology. In: Nobel P (Ed.) *Cacti biology and uses*. Los Angeles, USA. University of California Press. pp. 57-74.
- Ochoa, M.J. 2013. Black spot: an important disease for fodder, fruit, nopalitos cactus plantation. *Cactusnet Newsletter* 13:63-72.
- Quezada-Salinas, J., Sandoval Islas S., Alvarado Rosales D., and Cardenas Soriano E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) en Tlanepantla, Morelos, México. *Agrociencia* 40: 641-653.
- Quezada-Salinas, J., Sandobal Islas S., Alvarado Rosales D., and Moreno M. 2013. Histopatología y patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal. *Revista Mexicana de Micología*. 38: 9-18.

## Ochoa et al. 2015

- Redecker, D. 2000. Specific PCR primers to identify arbuscular mycorrhizal fungi within colonized roots. *Mycorrhiza*. 10: 73-80.
- Roselló-Mora, R., and Amann R. 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* 25:39-67.
- Saézn, C., Berger H., Corrales-García J., Galletti L., García de Cortázar V., Higuera I., Mondragón C., Rodríguez-Felíx A., Sepulveda E., and Varnero M.T. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Roma, Italia. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO 162.
- Saparrat, M.C., Femoselle G.E., Stenglein S.A., Aulicino M.B., and Balatti P.A. 2009. *Pseudocercospora griseola* causing angular leaf spot on *Phaseolus vulgaris* produces 1,8-Dihydroxynaphthalene melanin. *Mycopathologia* 168:41-47.
- SIAP. 2013. Servicio de Información Agroalimentario y Pesquero. Available at: <http://www.siap.gob.mx>. Accessed on December 12, 2013.
- Tamura, K., Dudley J., Nei M., and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Unoura, K., Miyazaki Y., Sumi Y., Tamaoka M., Sugita T., and Inase N. 2011. Identification of fungal DNA in BALF from patients with home-related hypersensitivity pneumonitis. *Respiratory Medicine* 105(11): 1696-1703.
- Wallace, D.M. 1987. Large- and small-scale phenol extractions. In: Berger SL, Kimmel AR (eds.), *Guide to molecular cloning techniques Methods in enzymology*, vol. 152. San Diego 7 Academic Press. p. 33-41.
- White, T. J., Bruns T., Lee S., Taylor, and J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322, In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, (eds). Innis, M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., and White T. J. Academic Press, Inc., New York.

## CAPITULO II

### Obtención, establecimiento y multiplicación de genotipos de *Opuntia* sps. con aparente tolerancia a la “mancha negra” *Pseudocercospora opuntiae*

#### Introducción

#### Procesos de micropropagación

Existen tres procesos en los que se basa el cultivo de tejidos vegetales: proliferación de yemas axilares, organogénesis y embriogénesis somática. Los dos últimos pueden ser vía directa o indirecta, es decir, con o sin la formación de tejido desorganizado llamado callo (George, 2008).

La proliferación de yemas tiene su origen en el rompimiento de la dominancia apical que repercute en la estimulación de las yemas laterales o axilares (areolas), puede inducirse mediante la aplicación externa de reguladores de crecimiento del tipo citocininas en los medios de cultivo. Es una técnica que en teoría permite mantener la fidelidad genética de las plantas propagadas y es el método de micropropagación más aplicado y rentable en la propagación comercial *in vitro* (Pérez-Molphe y col., 1999; George, 2008).

La organogénesis o producción de brotes adventicios son brotes aéreos y raíces que pueden ser inducidos sobre el tejido del explante original (organogénesis directa) o a partir de callo (organogénesis indirecta). En general, para obtener plantas por esta vía se requiere la inducción de brotes aéreos, el desarrollo y multiplicación de los mismos, así como su enraizamiento. Este proceso resulta muy atractivo, al obtenerse una propagación rápida con pequeñas secciones de tejido (Pérez-Molphe y col., 1999; García-Saucedo y col., 2005).

La embriogénesis somática (ES), *in vitro* ha surgido como una nueva vía de propagación y constituye una herramienta de trabajo para la conservación *in vitro* de germoplasma y el mejoramiento genético (Das y col., 2002).

La embriogénesis somática tiene su origen en la capacidad totipotencial de las células (George, 1993), la cual es una característica que teóricamente tienen todas las células vegetales para desarrollar nuevos individuos genéticamente idénticos a la planta de procedencia (George, 1993; Pérez-Molphe y col., 1999). Las células somáticas dentro de la planta contienen la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La expresión temporal y espacial de los genes es fuertemente regulada para

permitir la diferenciación de varios sistemas de órganos, así como el desarrollo de una planta (Evans y col., 1981).

La embriogénesis somática induce estructuras parecidas a un embrión, donde el embrioides es un nuevo individuo que proviene de una célula no sexual (Haccius, 1978).

Para el caso de las dicotiledóneas, la embriogénesis somática pasa por los estados de desarrollo globular, corazón y torpedo (George, 2008), las dos últimas análogas a los estados escutelar y coleoptilar de las monocotiledóneas.

Los embrioides se pueden obtener de forma directa e indirecta, sin embargo, éstos no se clasifican como órganos, porque estas estructuras tienen una existencia independiente del cuerpo de la planta o callo de origen (Dodds y Roberts, 1985), sin conexión vascular con las células donde se generó. Este proceso es posible gracias a que las células vegetales responden a una gran variedad de señales del ambiente y de la misma célula, que están involucradas en el control de la división celular, elongación, polaridad y diferenciación (Dodeman y col., 1997).

La inducción exitosa de los embriones somáticos y su conversión final en plantas viables no es rutina eficiente para la mayoría de las especies (Lema-Rumińska y Kulus, 2014).

La secuencia de eventos de las fases de desarrollo de la ES se caracterizan por distintos acontecimientos bioquímicos y moleculares (Fujimura y Kumamine, 1980). Así, cuanto más se acerca el patrón de expresión génica de embriones somáticos con los embriones cigóticos, mayor será la probabilidad de obtener sistemas regenerativos de alta eficiencia (Merkle y col. 1995). La primera fase de la ES es la etapa de inducción en el que las células somáticas adquieren competencia embriogénica ya sea directa (sin una etapa de dediferenciación) o indirectamente (por dediferenciación e implica una fase de callo). Después del estímulo apropiado, esta fase es seguida por la expresión o la iniciación de ES en la que células o proembriones competentes comienzan a desarrollar. Finalmente, durante la maduración, la germinación de embriones somáticos anticipa la acumulación de reservas, esto sólo es posible si las células son competentes y reciben los estímulos inductores apropiados.

Dos categorías de condiciones inductivas permiten a las células diferenciadas desarrollarse en células indiferenciadas competentes, estos son reguladores del crecimiento vegetal (RCV) (niveles celulares internos y/o externos) y los factores de estrés (choque osmótico,

deshidratación del medio de cultivo, estrés hídrico, iones de metales pesados, alteraciones de pH del medio de cultivo, tratamientos térmicos, hipoxia, antibióticos, radiación ultravioleta, y tratamientos mecánicos o químicos) (Potters y col., 2007; Lincy y col., 2009). Existe una amplia evidencia de que los RCV actúan como señales centrales para reprogramar células somáticas hacia vías embriogénicas. Las auxinas son consideradas los reguladores de crecimiento más importantes que regulan la inducción de ES. El contenido endógeno y la aplicación de auxinas exógenas son a su vez factores determinantes durante la fase de inducción (Puigderrajols y col., 2001; Lema-Rumińska y Kulus 2014). Los niveles de hormona internos son extremadamente variables en células competentes de diferentes especies y genotipos. Por estas razones, otros factores deben estar involucrados en la determinación de la competencia de los explantes.

Con base en la amplia variación de inductores, la ES no puede ser definida como una respuesta específica a uno o más reguladores de crecimiento exógenos aplicados. Por el contrario, estas observaciones indican que el estrés desempeña un papel crítico como un estímulo embriogénico.

El uso de algunos agentes osmóticos como polietilenglicol PEG, manitol, sacarosa o sorbitol, también puede tener efectos positivos en la maduración de embriones somáticos, así como la presencia de nitrógeno, suplementado en forma de nitrato, amonio, aminoácidos individuales y/o caseína hidrolizada es un requerimiento indispensable para la histodiferenciación del embrión y su maduración (Merkle y col., 1995). Fuentes y col. (2000) sostienen que, el nitrato de plata desempeña un papel importante en la regulación de la embriogénesis somática de *Coffea canéphora* P.

Feher y col. (2003) sugirieron que el ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) funciona como un producto químico de estrés, así como una auxina sintética eficiente en la inducción de ES, en zanahoria se requiere 2,4-D para la iniciación de ES y puede seguir adelante por su cuenta, mientras que la eliminación de 2,4-D desde el medio de inducción puede ser importante para controlar la polaridad celular, que es el primer evento citológico en la fase de iniciación. Por esta razón el 2,4-D no sólo imita auxinas, sino también, pueden inducir preferentemente las respuestas al estrés en las células vegetales similares a otras condiciones de estrés.

**Propagación *in vitro* de *Opuntia* sps.**

La propagación de *Opuntia* sps. por cultivo de tejidos vegetales se inició en la década de los 80s, los que tuvieron éxito están relacionados a la micropropagación a través de yemas axilares y se hicieron con el objetivo de incrementar la cantidad de plantas seleccionadas con características deseables homogéneas (Escobar y col., 1986; Estrada-Luna y col. 2008; Lema-Rumińska, 2014).

Escobar y col. (1986) informaron sobre la inducción de brotes de plántulas cortados (en forma transversal y longitudinal) y expuestos a diferentes concentraciones de benciladenina BA en *Opuntia amyclaea* Tenore. Mohamed-Yaseen y col. (1995) evaluaron la respuesta de los brotes cortados en secciones de *O. ficus-indica* (L.) Miller a diferentes concentraciones de BA y ácido naftalenacético ANA.

Llamoca-Zárate y col. (1999) evaluaron en el cv “Gigante” de *O. ficus-indica* (L.) Miller el efecto del BA a diferentes concentraciones, con o sin ácido giberélico AG<sub>3</sub>. Los resultados en todos estos trabajos sugieren que la respuesta a los reguladores de crecimiento está relacionada con el genotipo y las condiciones de trabajo específicas.

En *Opuntia* existen reportes sobre procesos morfogénicos en varias especies, en particular para *O. ellisiana* Griff. estudiaron diferentes protocolos de desinfección, se aislaron areolas y se cultivaron suplementando el medio basal Murashige y Skoog, 1962 MS con sacarosa y diferentes combinaciones de la citocinina bencilaminopurina BAP y ácido (indol-3) butírico AIB (Juárez y Passera, 2002). Con *O. lanigera* Salm-Dyck se estudiaron diferentes orientaciones del explante (vertical y horizontal), y tipos de citoquinina (BA y 6-furfuril amino purina KIN) (Estrada-Luna y col., 2008).

En procesos de organogénesis con *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller (García-Saucedo y col., 2005; Angulo-Bejarano y Paredes-López, 2011) y embriogénesis somática (Santacruz-Ruvalcaba y col., 1998; Gomes y col., 2006) se han reportado con éxito diverso. El aumento del valor económico del nopal y sus frutos a través de la biotecnología ha sido enfatizado por Cruz-Hernández y Paredes-López (2010).

La idea de generar plantas de *Opuntia* con características superiores mediante la utilización de técnicas biotecnológicas sigue en consideración (Cruz-Hernández y Paredes-López 2010; Lema-Rumińska y Kulus, 2014), a pesar que la micropropagación para productores de opuntias ha dejado de ser atractiva, ya que al parecer no están convencidos de los

beneficios potenciales que ofrecen este tipo de técnicas (Paredes y col., 2006). Sin embargo, muchas instituciones de investigación mantienen proyectos sobre cultivo de tejidos de opuntias con fines diversos. Además la creciente demanda de los países emergentes en el cultivo justifica la necesidad de tener protocolos estandarizados en cuestiones de seguridad sanitaria y por consiguiente la selección y multiplicación de plantas resistentes a las enfermedades (Portillo com. pers.).

### **Propagación por trozos de cladodios**

El éxito evolutivo y ecológico de *Opuntia* sps. puede explicarse en parte en función de la riqueza de las modalidades de su reproducción.

La propagación a través de partes vegetativas es considerado el método más importante en poblaciones cultivadas y naturales en México (Pimienta, 1995). En zonas áridas como el Este de Texas, las poblaciones naturales son establecidas por semilla (Felker com. pers.).

La reproducción sexual parece ser más compleja y arriesgada en comparación con la multiplicación vegetativa, ya que el primero implica más etapas y procesos (botón floral, antesis, flor, la polinización, la fruta, la producción de semillas, la dispersión, germinación, plántulas desarrollo y crecimiento) hasta que un individuo crece (Nerd y Mizrahi, 1995; Pimienta y del Castillo, 2002). El estado de plántula es muy vulnerable ya que intervienen procesos como la polinización y dispersión de semillas, dependen de la interacción con animales (Mandujano y col., 1998) además de ser un proceso que implica mayor tiempo. Un individuo que se desarrolló a partir de una semilla tiene una baja probabilidad de alcanzar la edad reproductiva (Mandujano y col., 2001).

La ventaja de la reproducción sexual en *Opuntia* es la producción de individuos genéticamente únicos, que contribuyen a mantener la variabilidad genética de especies, así como tener el potencial de ser dispersado más fácilmente (Montiel y Montan, 2000). En contraste con la reproducción por semillas, la multiplicación vegetativa en *Opuntia* parece ser un proceso menos complejo (prácticamente, sólo requiere partes vegetativas, que son generalmente grandes y protegidas por espinas) con una alta probabilidad de convertirse en individuos adultos (Bobich y Nobel, 2001). Básicamente, las dos variantes principales derivan morfológicamente de las areolas, ya que sus meristemos dan lugar al crecimiento vegetativo, a través de los brotes o raíces.

Uno de los inconvenientes de la multiplicación por cladodios es que produce organismos genéticamente idénticos a la planta madre, lo que reduce la variabilidad de la población, en general implica menores oportunidades para la dispersión a largo plazo (Bobich y Nobel, 2001). Esto se convierte en una ventaja cuando se quiere incrementar genotipos seleccionados.

Teniendo en cuenta lo anterior el objetivo del presente estudio fue establecer, multiplicar e incrementar genotipos de *Opuntia* sps. resistentes a *P. opuntiae* a través de diferentes procesos del cultivo de tejidos y de multiplicación.

## **Materiales y métodos**

### Establecimiento y propagación *in vitro* del material vegetal

Para la obtención del material vegetal de *Opuntia*, se seleccionaron en ambientes discriminantes plantas con “aparentemente sanidad” dentro de nopaleras comerciales, que se denominaron resistentes (R) y tolerantes (T) de Santa Lucía y San Esteban, Zapopan (20° 79' 12" N; 103° 37' 30" O y 1,420 msnm). Asimismo se utilizaron plántulas provenientes de semillas de Ojuelos, (21° 43' 42" N, 101° 39' 30" O; 2,280 msnm) Jalisco. Cada uno se consideró como un genotipo independiente, mismos que fueron identificadas con números consecutivos G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub>, G<sub>6</sub>, G<sub>7</sub> y G<sub>8</sub>.

### ***Desinfección del material vegetal***

Se emplearon ápices de brotes que contenían de 3-4 aréolas, puntos meristemáticos en las *Opuntias*, el número de aréolas es importante y debe tenerse en cuenta ya que de esto dependerá el número de brotes obtenidos por explante. Todo el material vegetal se estableció en condiciones asépticas, para lo cual se lavó con jabón neutro y agua destilada, para posteriormente pasarlo por un proceso de desinfección (Anexo 2). Una vez desinfectados las partes afectadas por el proceso se eliminaron con bisturí.

### **Proliferación de yemas axilares**

Para la proliferación de yemas el material vegetal seleccionado de *Opuntia* se estableció en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), adicionando 1.1; 2.2 y 3.3 mg·L<sup>-1</sup> de la citocinina benciladenina (BA) y 7 g·L<sup>-1</sup> de agar (Sigma ®). En este medio de estimulación (MSE)

estuvieron los materiales por espacio de 30 d. Posteriormente se transpasaron, a medio basal MS sin reguladores de crecimiento durante 30 d.

Todos los medios de cultivo que se mencionan a lo largo del presente documento, se ajustaron a pH 5.8 previo a la esterilización en autoclave (121 °C de temperatura a 1.2 kg·cm<sup>-2</sup> de presión durante 15 min) y se incubaron bajo las condiciones indicadas en el Anexo 3.

### **Callos**

Para la inducción de callos se utilizaron los genotipos G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub>, G<sub>6</sub>, G<sub>7</sub> y G<sub>8</sub> que se establecieron en medio MS suplementado con 0.05 mg·L<sup>-1</sup> PIC, 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA, 20 g·L<sup>-1</sup> de sacarosa y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA más 0.5 mg·L<sup>-1</sup> 2,4-D. A todos los tratamientos se les agregó 0.1 g·L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico para evitar oxidación del tejido frecuente en las opuntias.

Todos los experimentos se efectuaron en condiciones de oscuridad a 27 ± 2 °C.

### **Embriogénesis somática**

Las dosis de los reguladores de crecimiento empleados en los protocolos de inducción de embriogénesis somática, fueron las únicas documentadas, mismas que se detallan más adelante.

Se aplicaron las dosis en la regeneración de *Opuntia* sps. vía embriogénesis somática directa, mediante el cultivo de ápices: MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0,1, 0,5 y 2,0 mg·L<sup>-1</sup> PIC, en condiciones de oscuridad (Gomes y col., 2006). También se aplicó el protocolo de Santacruz y col. (1998), se empleó la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la citocinina BA en dosis de 0.5 mg·L<sup>-1</sup> y 0.5 mg·L<sup>-1</sup>.

La fase experimental se llevó a cabo en medios sólidos.

Se realizaron varios experimentos preliminares que no se describen, pero que sirvieron de soporte para estructurar posteriormente otros experimentos.

### **Selección de callo**

Se evaluaron ocho genotipos, obtenidos de la germinación de semillas de *O. ficus-indica* (L.) Miller (G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub>, G<sub>6</sub>, G<sub>7</sub> y G<sub>8</sub>), de cada uno se tomaron trozos del explante sin tejido meristemático y se colocaron en cajas de Petri con 25 mL de medio de inducción,

con cuatro repeticiones. Después de 30 d, los diversos tipos de callos generados se individualizaron para permitir la expresión embriogénica.

### ***Polietilenglicol***

Se emplearon los genotipos G<sub>3</sub> y G<sub>4</sub> por presentar la mejor formación de callos se colocaron en 15 g·L<sup>-1</sup> PEG Polietilenglicol PM  $\cong$  3,350 Sigma<sup>®</sup> como agente osmótico y sin PEG, para evaluar el efecto osmótico del mismo sobre explantes de *Opuntia*. Para cada uno de los tratamientos se realizaron ocho repeticiones.

### ***Hidrolizado de caseína***

Los genotipos G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub> y G<sub>4</sub> se utilizaron para realizar un experimento con tres niveles de caseína hidrolizada 0, 250 y 500 mg·L<sup>-1</sup> con cuatro repeticiones para evaluar la capacidad embriogénica en ausencia de luz. De esta forma se tuvieron cuatro genotipos que se repitieron seis veces cada uno para dar un total de 24 unidades experimentales.

### ***Azúcares***

Los genotipos G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub> se emplearon para realizar un experimento con dos concentraciones de sacarosa 3 y 6 % con el objetivo de inducir embriogenesis. Cada tratamiento con cinco repeticiones para dar un total de 20 unidades experimentales, conformadas por dos callos cada una. Estos tratamientos fueron seleccionados con base en experimentos previos datos no mostrados.

### ***Explantos de raíz, hipocotilos y cotiledones***

Se realizó un experimento para evaluar la producción de callos en tres tipos explantes: raíces blancas terminales, hipocotilos, y cotiledones, del genotipo “Reyna” (Ry) *O. albicarpa*, provenientes de semillas de Ojuelos. La inducción se realizó con 0.1 mg·L<sup>-1</sup> PIC y 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BA. Los tratamientos generados contaron con tres repeticiones conformadas cada una por diez cotiledones, raíces e hipocotilos.

### ***Multiplicación por trozos de cladodios***

Se eligieron cladodios de al menos un año de edad, en su tamaño final de crecimiento, de los genotipos denominados: R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y S seleccionados a partir de pruebas de patogenicidad (Capítulo 1).

Los cladodios se cortaron en trozos con al menos tres aréolas en cada trozo, el instrumental empleado se desinfectó previamente, se obtuvieron un promedio 28 trozos de cada cladodio. Los trozos se sumergieron en alcohol etílico AZ<sup>®</sup> 96° G.L. sin desnaturalizar (Figura 1a). Se dejaron secar sobre una rejilla y papel, a la sombra. Los trozos fueron sumergidos durante 1 min en una solución de ácido indolacético (IAA) 1mg.mL<sup>-1</sup> Sigma-Aldrich<sup>®</sup> y se colocaron sobre una bandeja de 6 cm de profundidad con vermiculita como sustrato (Figuras 1b y c). Se regaron semanalmente con una solución de agua con 15 mL de hipoclorito comercial cada 10 L. Todo el experimento se realizó en condiciones de invernadero, con un promedio de intensidad lumínica (luxes) otoño-invierno 2014, medido de 12-13 h 496.6 luxes.

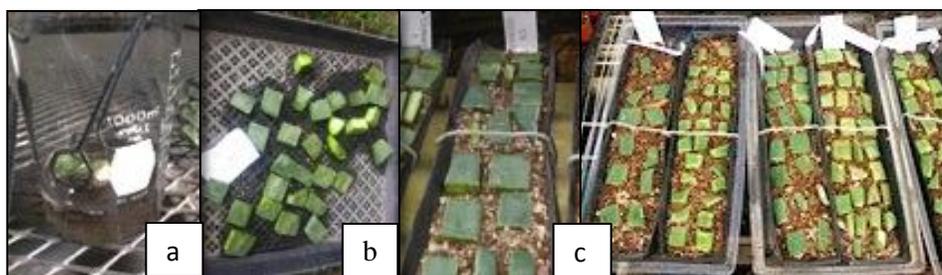


Figura 1 a) Desinfección de los trozos de cladodios de los genotipos R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y S, b) secado y c) plantación en bandejas.

### **Análisis estadístico**

Para la evaluación de proliferación de yemas, se realizó un análisis de varianza (ANVA) bifactorial con la prueba de Tukey HSD  $p \leq 0.05\%$ , utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurión<sup>®</sup>. Se evaluaron los factores genotipo: (Tolerante y Resistente) y el factor concentración de BA (1.1, 2.2 y 3.3 mg.L<sup>-1</sup>). Por cada tratamiento se realizarón 4 repeticiones. La variable de respuesta analizada fue el número de brotes evaluados con la comparación múltiple de medias.

Para la multiplicación por trozos se empleó la misma prueba estadística evaluando el genotipo respecto a las variables número y longitud de brotes.

## Resultados y Discusión

### *Proliferación de yemas*

Los dos genotipos seleccionados con aparente sanidad que se establecieron para proliferación de yemas mostraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en el número de brotes por explante en el período de estimulación, sin diferencias entre dosis de BA, aunque con una tendencia de la dosis intermedia a registrar los mayores valores. En los medios de estimulación el mayor número de brotes después de 30 d de la inducción se presentó en el genotipo R, con una concentración de BA de  $2.2 \text{ mg.L}^{-1}$  (Figura 2, Cuadros 1). Estos resultados no presentaron interacción entre los dos factores evaluados (genotipos y dosis de BA) lo que no concuerda con lo reportado para varios cultivares de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller y dosis de BA por Llamoca-Zárate y col. (1999) y Zuñiga (2012).

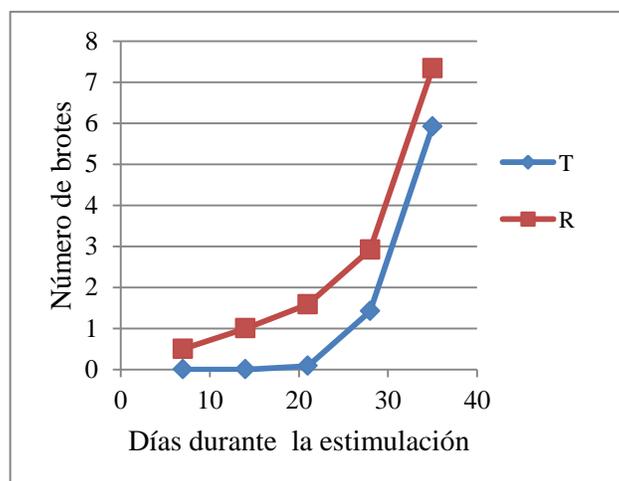


Figura 2 Número de brotes generados durante el período de estimulación para dos genotipos, promedio de tres dosis de BA. Genotipo tolerante (T) línea azul, resistente (R) línea roja.

Cuadro 1 Evaluación del número de brotes de los genotipos R (resistente) y T (tolerante) durante el período de estimulación con diferentes concentraciones de BA.

Genotipo	Concentración BA mg.L <sup>-1</sup>	Brotos por explante
T	1.1	4.3
T	2.2	5.3
T	3.3	5.0
R	1.1	7.0
R	2.2	9.6
R	3.3	8.0

Esta respuesta es común en el reino vegetal, y está ligada a la reacción de cada genotipo a señales celulares y del ambiente, como son las hormonas y la luz (Dodeman y col., 1997). Este efecto ha sido reportado para varias especies de *Opuntia* (Escobar y col., 1986; Juarez y col., 2002; Estrada-Luna y col., 2008).

Por otro lado los explantes que se utilizaron durante el período de estimulación fueron colocados en el medio basal MS sin reguladores de crecimiento generándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) entre genotipos en el número de brotes, con mayores valores para el genotipo T (Figura 3).

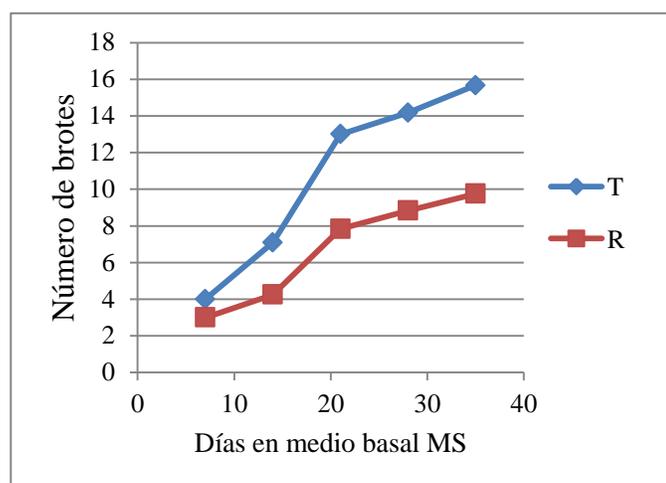


Figura 3 Número de brotes en medio basal MS, genotipo tolerante (T) línea azul, resistente (R) línea roja.

El genotipo tolerante presentó la mayor cantidad de brotes en aquellos explantes que provinieron de las concentraciones de BA de 2.2 y 3.3 mg.L<sup>-1</sup> aunque las diferencias entre

concentraciones de BA aplicadas en el período de estimulación no fueron significativas (Cuadros 2). En general de acuerdo a estudios previos realizados por varios autores en *Opuntia* sps. para proliferación de yemas axilares, bajos o nulos niveles de auxina en combinación con moderados a altos niveles de citocininas mostraron los mejores resultados (Angulo-Bejarano y Paredes-López 2012).

Cuadro 2 Evaluación del número de brotes de los genotipos R (resistente) y T (tolerante) en medio MS en explantes que provinieron del período de estimulación tratados con diferentes concentraciones de BA.

Genotipo	Concentración BA mg.L <sup>-1</sup> durante el período de estimulación	Brotos por explante
T	1.1	13.0
T	2.2	15.6
T	3.3	19.0
R	1.1	9.3
R	2.2	9.0
R	3.3	1.3

En el Figura 4 se puede observar una interacción significativa entre el genotipo y la concentración de BA ya que el número de brotes se redujo en mayor medida a la dosis de 2.2 mg.L<sup>-1</sup> que en el resto de las dosis al comparar el genotipo R (resistente) con el T (tolerante).

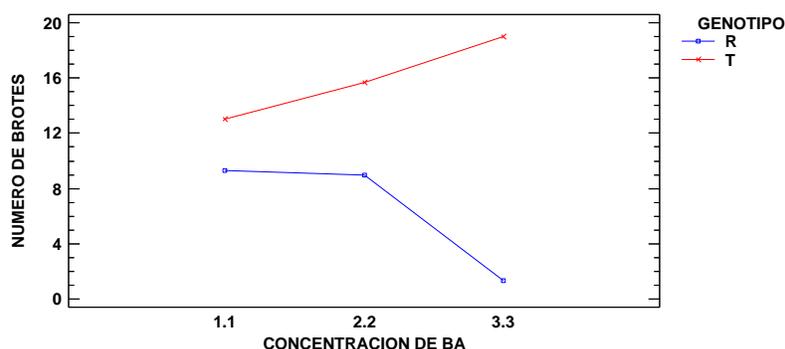


Figura 4 Interacción entre genotipo R (resistente) y T (tolerante) y concentración de BA utilizada en el período de estimulación para el número de brotes por explante generados durante durante el periodo en MS.

### Formación de callo

Relativamente poco se ha informado sobre el establecimiento de cultivos de callos y organogénesis de cactus. Llamoca-Zárate y col., (1999) desarrollaron un método para la producción de callos y la suspensión de células en *O. ficus-indica* (L.) Miller. Estos autores afirmaron que estos tipos de células podrían ser utilizados en la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, pero no obtuvieron ninguna evidencia de regeneración.

Durante el período de inducción se observaron diferentes colores y formas en los callos obtenidos. La mayoría de los callos eran compactos y mostraron una amplia variación en el color verde, que eran diferentes a la de los explantes iniciales. Algunos callos mostraron una reducción visible en la producción de clorofila, mientras que otros tenían algunas zonas de color marrón, que podrían ser causa de una oxidación fenólica (Fig. 5).

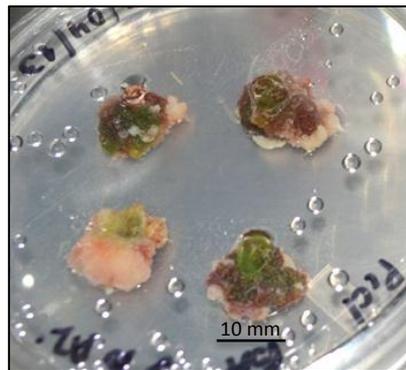


Figura 5 Diferentes tipos callos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller con oxidación.

El crecimiento de callo óptimo se observó en medio MS suplementado con  $0.05 \text{ mg.L}^{-1}$  PIC,  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  BA  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarosa y  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  BA más  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  2,4-D. Estos resultados concuerdan con Angulo-Bejarano y Lopez-Paredes (2011) quienes sugieren que la formación de callos se produce cuando se añaden niveles similares de auxina y citoquinina en el medio. Por lo tanto, la relación entre estos dos reguladores de crecimiento constituye un factor crítico que desencadena los eventos de desarrollo *in vitro*. Sin embargo los callos perdían peso y mostraron graves problemas de oxidación, a pesar de los tratamientos aplicados que impidió un desarrollo favorable.

### Inducción a embriogénesis somática

Los ocho genotipos establecidos provenientes de semillas formaron callo con variable tamaño y color. Este comportamiento se ha asociado a que los genotipos de semillas provienen de una polinización cruzada y por lo tanto presentan variabilidad, en tanto los de trozos de cladodios tienden a tener menor variabilidad, debido a la propagación vegetativa usual en opuntias (Gomes y col., 2006). Pero también puede deberse al estado juvenil del explante, ya que las plántulas de semilla ofrecen un alto grado de respuesta, al presentar una competencia celular más alta (George, 2008). Para la evaluación de la formación de los callos se estableció una escala arbitraria de frecuencia: Alta: cuando el 70-100 % del genotipo formaba callo, Media: cuando el 30-70 % formaba callo y baja cuando 0-30 % del genotipo formaba callo (Cuadro 3).

Cuadro 3 Frecuencia de formación de callos generados por los genotipos G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub>, G<sub>5</sub>, G<sub>6</sub>, G<sub>7</sub> y G<sub>8</sub> provenientes de semillas de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller. Resultados luego de 2 meses de cultivo con inducción 0.5 g.L<sup>-1</sup> BA, 0.05 g. L<sup>-1</sup> PIC.

Genotipo	Frecuencia de formación de callos
G <sub>1</sub>	Media
G <sub>2</sub>	Baja
G <sub>3</sub>	Alta
G <sub>4</sub>	Media
G <sub>5</sub>	Media
G <sub>6</sub>	Baja
G <sub>7</sub>	Baja
G <sub>8</sub>	Media

Durante los experimentos realizados para inducir la embriogénesis somática de *Opuntia* sps., se pudo observar que los realizados con PIC fueron los que mejor desarrollaron callos, pero no se tuvo la oportunidad de observar las diferentes etapas de desarrollo, ya que los callos sólo perdían peso, observándose diferencias en la producción de callo de acuerdo al genotipo (Figura 6).

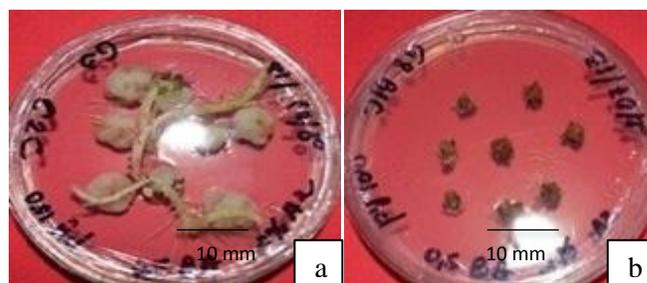


Figura 6 Diferencias en la formación de callos de acuerdo al genotipo a) G<sub>3</sub> b) G<sub>8</sub>.

Un aspecto importante a resaltar, es que a pesar de formar callo, aunque se asuma que todas las células son igualmente totipotentes y que los factores inductores se encuentran disponibles de forma homogénea en un medio, la habilidad embriogénica está limitada a una fracción de la población celular (Dodeman y col., 1997)

Los genotipos evaluados presentaron un desempeño embriogénico nulo. Este comportamiento ha sido reportado con anterioridad en diversas especies de cactus (Santacruz y col., 1998).

Varios genotipos mostraron oxidación en los explantes, entre los que fue más intenso, destacaron G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y G<sub>8</sub> en tanto que los genotipos G<sub>3</sub>, G<sub>4</sub> y G<sub>5</sub> produjeron callo abundante y sin presencia de oxidación. En estos últimos genotipos, se observó un callo blaquescino con estructuras globosas compactas.

La presencia de callo no fue siempre similar en los diferentes genotipos y tuvo una ocurrencia muy errática, sobre todo por la presencia de oxidación incluso en las masas celulares que conformaban el callo. La oxidación impide el subsiguiente desarrollo de los linajes celulares que deben conformar el embrión en formación.

La ubicación de características físicas por sí mismas en los materiales no embriogénicos, no ofrece información completa sobre la influencia del genotipo en el mecanismo involucrado en el establecimiento de la embriogénesis somática (Da Costa y col., 2001).

Asimismo, algunos genotipos presentaron demasiada oxidación, lo que hizo más difícil que los tejidos se desorganizaran, requisito indispensable para producir callo. Aunque el genotipo G<sub>3</sub> produjo más callo que otros, frecuencia alta 70-100 % de formación de callo (Cuadro 3) la oxidación persistió aún con los tratamientos empleados para evitarla; sin embargo las características observadas no dejan mucho que se puede resumir, ya que ninguno de los tratamientos facilitó la generación de embriogénesis. Esta información pudiera ser de utilidad para genotipos que muestren oxidación moderada. La presencia diferencial de la oxidación en los genotipos, parece estar ligada a los sistemas de defensa al estrés por temperatura (Ali y col., 2005).

No fue necesario realizar análisis estadísticos, ya que la respuesta fue igual para todos los tratamientos. No fue posible ubicar grupos de genotipos por su capacidad embriogénica, a pesar de haber repetido el experimento en cuatro ocasiones.

### ***Explantos de raíz, hipocotilos y cotiledones***

En los tres experimentos realizados con el cultivar Reyna (Ry) (cotiledones, hipocotilos y raíces) la generación de callo se formó primero en los explantes provenientes de hoja que aquellos de raíz e hipocotilos, pero luego de 20 d todos los explantes mostraron callo, aunque en menor cantidad en los explantes de raíz, lo que se esperaba debido a que existe mayor cantidad de células en los explantes de hoja que en raíz, además diferentes tipos de explantes se comportan de manera diferencial, esto coincide con lo reportado por Llamoca-Zarate y col. (1999). El aspecto de los callos generados en ambos tipos de explantes fue muy diferente, el callo obtenido de hoja fue más variable que el de hipocotilos (Figura 7 a y b). En cambio el tipo de callo generado de raíz, aunque también friable o compacto, su aspecto era más lustroso, se observaron sectores verdes-cremosos (Figura 7 c).



Figura 7 Explantes del cultivar “Reyna” a) cotiledón, detalle de cotiledones con formación de callos b) hipocotilos, detalle de hipocotilos con formación de callo c) raíz.

El hecho que el aspecto de los callos de hoja sea tan variable, está relacionado con los diferentes tipos celulares que conforman los tejidos de la hoja, donde están activos los cloroplastos, es por ello que el color verde no se observó en los callos de raíz, ya que en sus células no está activa la fotosíntesis. Gomes y col., 2006 encontraron que la fuente del explante y la concentración de reguladores de crecimiento, son factores importante para la inducción de la embriogénesis somática en las especies de *Opuntia*, por lo tanto, el balance hormonal de los explantes también está ligado a la respuesta morfogénica (George, 2008). Ninguno de los tratamientos con las diferentes fuentes de explantes prosperó.

### Multiplicación por trozos de cladodios

Un cladodio puede sostener la pérdida de agua hasta 6 meses sin disminuir la viabilidad si se encuentra en un sitio sombreado y seco. Cuando exista una aréola por ambos lados del trozo o cladodio, se puede formar una planta (Mondragón-Jacobo 2001). La observación-aseveración del autor citado aplicó, según el caso, para todos los genotipos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller aquí evaluados.

En cladodios, las raíces adventicias se desarrollan a partir de aréolas que están en contacto con el suelo, lo que permite su arraigo y la absorción de agua y nutrientes. Posteriormente comienza el surgimiento de brotes vegetativos a partir de aréolas sin contacto con el suelo, que generan un nuevo individuo (Reyes-Agüero y col., 2005). El genotipo R<sub>3</sub> mostró diferencias significativa ( $p=0.05$ ) en cuanto al número de los brotes, pero tuvo un bajo porcentaje de sobrevivencia en este tipo de propagación (Cuadro 4), así mismo el genotipo R<sub>1</sub> tuvo el mayor porcentaje de supervivencia mayor al 90 % y la máxima longitud de brotes a los 3 meses de implantados (Cuadro 4 y 5).

Singh (2003) ha informado que el tamaño de cladodios plantados afecta significativamente el número de cladodios formados por planta, al igual que las interacciones entre el tamaño, edad y métodos de plantación. Asimismo, la formación de más cladodios por planta posiblemente pueda deberse a la presencia de un mayor número de aréolas activas. También señala que a menor tamaño (anchura) de cladodios plantados, la tasa de crecimiento relativo disminuye, y en el caso contrario, aumenta, probablemente debido a raíces más vigorosas y la acumulación relativa de más fotosintatos. Esto aplicó también para los trozos, donde aquellos con mayor anchura y tamaño mostraron un mejor desarrollo de los brotes (datos no mostrados) (Figura 8 a, b, c).

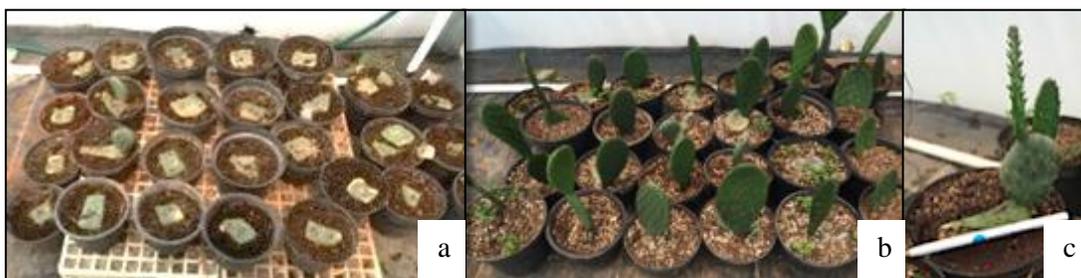


Figura 8 Trozos transplantados de los diferentes genotipos seleccionados R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y S (a) desarrollo a los 2 meses de edad (b) detalle del genotipo R<sub>1</sub>.

Cuadro 4 Porcentaje de supervivencia de los genotipos R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y S por el método propagación en trozos.

Genotipo	% de supervivencia en trozos
R <sub>1</sub>	92.85
R <sub>3</sub>	37.71
R <sub>4</sub>	7.14
R <sub>2</sub>	17.85
S	21.42

Las aréolas, yemas homólogas a las yemas axilares de otras dicotiledóneas, pueden producir hojas reducidas, brotes, flores, nuevos tallos y además espinas, gloquidias, cerdas, pelos o lana, y a veces raíces adventicias (Bravo-Hollis, 1978). En todos los genotipos evaluados las aéreas produjeron, raíces y brotes, mostrando diferencias significativas en la longitud de los brotes entre los genotipos seleccionados y el susceptible. En cuanto al número de brotes R<sub>1</sub> fue el genotipo que tuvo más brotes y longitud de los mismos (Cuadro 5).

La sombra y la mayor humedad del suelo en plantas de vivero son dos factores ambientales muy importantes que facilitan el establecimiento de plántulas (Flores y Jurado 2003; Delgado-Sánchez y col., 2013). Gallardo y De la Barrera, (2007) sugieren que las plántulas bajo sombra protegidas por el invernadero retardan los efectos del estrés. Por lo tanto, las plántulas de *Opuntia* parecen haberse adaptado a la protección de la sombra, similar a los hallazgos de otros cactus y a lo observado en este experimento.

Cuadro 5 Número y longitud de brotes de genotipos R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub> y S.

Genotipo	Nº de brotes	Longitud
R <sub>1</sub>	1.0± 0.4665 <sup>b</sup>	12.02±1.14 <sup>a</sup>
R <sub>2</sub>	0.6±0.5477 <sup>c</sup>	3.84±3.76 <sup>c</sup>
R <sub>3</sub>	1.8±.08366 <sup>a</sup>	4.90±7.09 <sup>c</sup>
R <sub>4</sub>	1.4±0.5477 <sup>b</sup>	2.34±0.37 <sup>c</sup>
S	1.2±0.6750 <sup>b</sup>	7.38±1.57 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes, muestran diferencias estadísticas entre los tratamientos DMS p ≤0.05%.

## Conclusiones

Los resultados de todos los experimentos efectuados, en conjunto con las observaciones cualitativas hechas durante el desarrollo experimental, permitieron destacar:

Proliferación de yemas:

En el período de estimulación el genotipo resistente R mostró un mayor número de brotes que el genotipo tolerante T en todas las dosis de la citocinina BA. Lo opuesto ocurrió en medio basal MS.

La dosis intermedia de BA ( $2.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) mostró el mayor número de brotes en el período de estimulación para ambos genotipos sin diferenciarse significativamente de las otras concentraciones.

El Picloram en la obtención de callos mostró un desempeño destacable aunque no se pudo obtener regeneración.

No fue posible ubicar genotipos por su capacidad embriogénica, a pesar de haber repetido el experimento en cuatro ocasiones.

La propagación por trozos de cladodios resulta útil para incrementar material seleccionado. Los genotipos evaluados mostraron una respuesta diferencial en cuanto a su capacidad de brotación, número y longitud de brotes bajo las mismas condiciones ambientales y edad del cladodio.

## Literatura citada

- Ali, M. B., E. J. Hahn y K. Y. Paek. 2005. Effects of temperature on oxidative stress defense systems, lipid peroxidation and lipoxygenase activity in *Phalenopsis*. *Plant Physiology. Biochemistry*. 3: 213- 223.
- Angulo-Bejarano, P. I. y O. Paredes-López. 2011. Development of a regeneration protocol through indirect organogenesis in prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.). *Scientia Horticulturae*. 128: 283- 288.
- Bobich, E. G. y P. S. Nobel. 2001. Biomechanics and anatomy of cladode junctions for two *Opuntia* (Cactaceae) species and their hybrid. *American Journal of Botany*. 88: 391-400.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Universidad Autónoma de México. México, D.F. 743.

- Cruz-Hernández A. y O. Paredes-López. 2010. Enhancement of economical value of nopal and its fruits through biotechnology. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 12: 110- 126.
- Da Costa, S. P., A. A. Soares y B. Arnholdt-Schmitt. 2001. Studies on the induction of embryogenic globular structures in *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 4: 61- 73.
- Das, D., M. Reddy, K. Upadhyaya y S. K. Sopory. 2002. An efficient leaf-dise culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*. 20: 991- 1005.
- Dodds, J. H. y R. W. Roberts. 1985. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, Nueva York. 232.
- Dodeman, V. L., G. Ducreux y M. Kreis. 1997. Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*. 313: 1493- 1509.
- Escobar, H. A., V. M. Villalobos y A. Villegas. 1986. *Opuntia* micropropagation by axillary proliferation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 7: 269- 277.
- Estrada-Luna A., J. J. Martinez-Hernandez, M. E. Torres-Torres y F. Chable Moreno. 2008. Micropropagation of an ornamental prickly-pear cactus (*Opuntia lanigera* Salm-Dyck) and effects of GA<sub>3</sub> on plant growth after transplantation. *Scientia Horticulturae*. 117: 378- 385.
- Evans, D, W. Sharp W y Flick C. 1981. Growth and behavior of cell cultures, embryogenesis and organogenesis. En: *Plant Tissue Cultura, methods and applications in agriculture*. Thorpe, T (Ed). Academic Press. New York. 45- 113.
- Fehér, A., Pasternak, T. P. y Dudits, D. 2003. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 3: 201- 228.
- Flores J., E. Jurado. 2003. Are nurse-protégé interactions more common among plants from arid environments? *Journal of Vegetation Science*. 14: 911- 916.
- Fuentes S., M. Calheiros, J. Manetti Filho, y L. Vieira. 2000. The effect of silver nitrate and different carbohydratesources on somatic embryogenesis in *Coffea canophora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 60: 5- 13.
- Fujimura, T. y A. Komamine. 1980. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspensión culture. *Plant Science Letters*. 5: 359- 367.
- Gallardo-Vásquez J C, E. De la Barrera. 2007. Environmental and ontogenetic influences on growth, photosynthesis, and survival for young Pitayo (*Stenocereus queretaroensis*) seedlings. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 9: 118- 135.

- García-Saucedo, P.A., M. Valdés Morales, M. E. Valverde, A. Cruz Hernández, O. ParedesLópez. 2005. Plant regeneration of three *Opuntia* genotypes used as human food. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 80: 215- 219.
- George, E. F. 1993. *Plant propagation by tissue culture*. Ed. Exegetics. Edington. Part 1. 574.
- George, E. F. 2008. *Plant propagation by tissue culture* 3<sup>rd</sup> edition Ed. E F George, M A Hall and Geert-Jan De Klerk Springer. 500.
- Gomes, F. L., F. F. Heredia, P. B. Silva, O. Faco y F. A. P. Campos. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *O. ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Scientia Horticulturae*. 108: 15- 21.
- Haccius, B. 1978. Questions of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures. *Phytomorphology*. 28: 74- 81.
- Juarez, M. C. y C. B. Passera. 2002. In vitro propagation of *Opuntia ellisiana* Griff. and acclimatization to field conditions. *Biocell*. 26: 319- 324.
- Lema-Rumińska, J. y D. Kulus. 2014. Micropropagation of Cacti-a Review. *Haseltonia*. 19: 46- 63.
- Lincy, A., K. Remashree, B. Azhimala y B. Sasikumar. 2009. Indirect and direct somatic embryogenesis from aerial stem explants of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.). *Acta Botanica Croatica*. 1: 93- 103.
- Llamoca-Zárate, R. M., L. F. Aguiar, J. Landsmann y F. A. P. Campos. 1999. Whole plant regeneration from the shoot apical meristem of *Opuntia ficus-indica* Mill (Cactaceae). *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 73: 83- 85.
- Llamoca-Zarate, R. M., C. Studart-Guimarães, R. M., Landsmann, C. y F. A. Campos. 1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cell and Tissue Organ Culture*. 58: 155- 157.
- Mandujano, M. C., C. Montaña, I. Méndez, J. Golubov. 1998. The relative contribution of sexual reproduction and clonal propagation in *Opuntia rastrera* from two habitats in the Chihuahuan Desert. *Journal of Ecology*. 86: 911- 921.
- Mandujano, M. C., C. Montaña, y J. Golubov. 2001. Importancia de la reproducción sexual y clonal en tres especies de *Opuntia* en el desierto Chihuahuense: un enfoque demográfico. In: Memoria del XV Congreso Mexicano de Botánica. Sociedad Botánica de México, Querétaro, México. Octubre 14- 19.

- Merkle, S. A., W. A. Parrott y B. S. Flinn. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: *In vitro* Embryogenesis in plants (Thorpe, T. A. ed.). Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 155- 204.
- Mondragón Jacobo, C. 2001. Cactus pear breeding and domestication. *Plant Breeding Reviews*. 20: 135- 166.
- Montiel, S. y C. Montaña. 2000. Vertebrate frugivory and seed dispersal of a Chihuahuan Desert cactus. *Plant Ecology*. 146: 221- 229.
- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plant*. 15: 473- 497.
- Nerd, A. y Y. Mizrahi. 1995. Reproductive biology. In: Barbera, G., Inglese, P., Pimienta, B.E., Arias, J.E. de J. (Eds.), *Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear*. FAO, Rome. 49- 58.
- Pérez-Molphe, E., R. Ramírez-Malagón, H. Núñez-Palenius y N. Ochoa-Alejo. 1999. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Aut. de Aguascalientes. 179.
- Pimienta-Barrios, E. y A. Muñoz-Urías. 1995. Domestication of *Opuntias* and cultivated varieties, pp. 58-61. In: Barbera, G.; Inglese, P.; Pimienta-Barrios, E. (eds.). *Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear*. International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. FAO publications. Rome, Italy.
- Pimienta, B. E. y R. F. del Castillo. 2002. Reproductive biology. In: Nobel, P.S. (Ed.), *Cacti, Biology and Uses*. University of California Press, Los Angeles. 75- 90.
- Potters, G., T. Pasternak, Y. Guisez, K. Palme y M. Jansen. 2007. Strees-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science*. 3: 98- 105.
- Puigderrajols P., G. Mir y M. Molina. 2001. Ultraestructure of early secondary embryogenesis by multicellular and unicellular pathways in cork oak (*Quercus suber* L.) *Annals of Botany*. 2: 179- 189.
- Reyes-Agüero, J. A., J. R. Aguirre-Rivera y H. M. Hernández. 2005. Notas sistemáticas y una descripción detallada de *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia*. 4: 395- 408
- Santacruz-Ruvalcaba, F., A. Gutierrez-Mora y B. Rodriguez-Garay. 1998. Somatic embryogenesis in some cactus and agave species. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 3: 15- 26.
- Singh Gurbachan. 2003. General Review of *Opuntias* in India *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 30- 46.

Zhao, X. Y., Y. H. Su, Z. J. Cheng, X. Z. Zhang. 2008. Cell fate switch during in vitro plant organogenesis. *Journal of Integraty Plant Biology*. 7: 816- 824.

Zuñiga C. 2012 Micropropagación de varios cultivares de *Opuntia ficus-indica* L. Miller (Cactaceae) CUCBA –UDG 47.

## CAPÍTULO III

### **Efecto del sustrato y el ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) en la germinación de semillas en diez cultivares de *Opuntia* sps.**

Este trabajo de investigación se realizó con el objeto de establecer los efectos del ácido giberélico y diferentes sustratos *in vitro* y *ex vitro* que estimulan la germinación de semillas de *Opuntia* sps. bajo polinización abierta de los principales cultivares de Jalisco. Este estudio permitió obtener material para incrementar la variabilidad genética y su posterior evaluación frente a la resistencia a *Pseudocercospora opuntiae*.

Este capítulo ha sido publicado en el Journal of the Professional Association for Cactus Development **JPACD**, a continuación se incluye el artículo.



JOURNAL OF THE PROFESSIONAL ASSOCIATION FOR  
CACTUS DEVELOPMENT

REVISTA CIENTÍFICA DE LA ASOCIACIÓN  
PROFESIONAL PARA EL DESARROLLO DE LAS  
CACTÁCEAS

May 1<sup>st</sup>, 2015.

DR. JUAN FLORENCIO GOMEZ LEYVA  
LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TLAJOMULCO  
JALISCO, MEXICO

This letter is to inform you and your colleagues that your article:

**Effect of substrate and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on seed germination in ten cultivars of  
*Opuntia* spp**

**Ochoa M. J.<sup>1,2,3</sup>, González-Flores L. M.<sup>2</sup>, Cruz-Rubio J. M.<sup>2</sup>, Portillo L.<sup>3</sup>, Gómez-Leyva J. F.<sup>2\*</sup>**

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía-UNSE, Av. Belgrano 1912, 4200, Santiago del Estero, Argentina

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de  
Zúñiga, Jalisco 45640, México

<sup>3</sup>Universidad de Guadalajara, Km 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Zapopan, Jalisco 45101,  
México

It has been **ACCEPTED** for PUBLICATION ON LINE: **JPACD-2015, Vol. 17.**

Thank you for choosing the JPACD for the diffusion of your important research findings.

Sincerely yours,

Dr. Gilberto Aranda Osorio  
Editor in Chief of the JPACD

Ochoa et al. 2015

## Effect of substrate and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia* sps.

Ochoa M. J.<sup>1,2,3</sup>, González-Flores L. M.<sup>2</sup>, Cruz-Rubio J. M.<sup>2</sup>, Portillo L.<sup>3</sup>, Gómez-Leyva J. F.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Agronomía-UNSE, Av. Belgrano 1912, 4200, Santiago del Estero, Argentina.

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco 45640, México.

<sup>3</sup>Universidad de Guadalajara, Km 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Zapopan, Jalisco 45101, México.

\*Corresponding Author: [jfgleyva@hotmail.com](mailto:jfgleyva@hotmail.com)

Received: February 3, 2015; Accepted: May 1, 2015.

### ABSTRACT

The seeds of *Opuntia* sps show low germination capacity and high latency, so this study compares different inert and synthetic substrates *in vitro* with the addition of gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) to stimulate seed germination in ten cultivars of *Opuntia* sps. (*O. megacantha*, *O. amyclaea*, *O. streptacantha*, *O. albicarpa* and *O. ficus-indica*). The photoperiod 16/8 h, light/darkness had a positive stimulating effect on the seed germination rate, while an inert substrate (pumice:peat moss:sand, 1:1:1 v/v) showed on average 20% germination. The use of *in vitro* Gamborg medium increased the germination rate to 40%. The addition of 25 mg L<sup>-1</sup> gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) to Murashige and Skoog (1962) medium, prepared to ¼ basal salt concentration, increases the germination rate across all cultivars, up to 90% at four weeks. GA<sub>3</sub> was shown to play an important role in breaking the latency of the seed, and increased amylolytic activity during seed germination in *Opuntia* sps.

**Keywords:** cactus pear fruit, scarification, substrate, *in vitro* germination, α-amylase

### INTRODUCTION

Plants of the *Opuntia* genus are native to several ecosystems, from arid zones at sea level to territories of great elevation, such as the Peruvian Andes; from tropical regions in Mexico where temperatures never fall below 5 °C, to regions in Canada where winter temperatures drop below -40 °C. This remarkable adaptability can be an interesting genetic resource for very diverse ecological zones (Nobel, 1999). Vegetative reproduction using the cladodes is the most important and used method for both natural and cultivated populations in Mexico (Pimienta, 1990). However, in other arid zones, such as East Texas, natural populations are established by seeds. The latter method has several advantages, among which are: the creation of individuals with a different genetic makeup; it is the only available method if a species is difficult to reproduce by vegetative means, and it lowers the overall operating costs. Its main drawbacks are the difficulty in obtaining viable seeds, and the growth and

Ochoa et al. 2015

development of the plants take a longer time (Reyes *et al.*, 2005). Despite the importance and advantages of this method, there are few studies evaluating the germination in *Opuntia*, since as stated before, cultivation is usually done by the propagation by cladodes (Mondragón and Pimienta-Barrios, 1995). However, it is important to consider propagation by seeds as a strategy for the long term conservation of these cacti, as well to keep and increase the genetic diversity.

Seeds of *Opuntia ficus-indica* L. Miller, like many other species of *Opuntia*, have a very low germination rate, mostly due to its lignified pericarp which contains 55% of lignin and cellulose, surrounding the embryo with 90-95% of the seed weight, blocking the radicular protrusion (Werker, 1997; Habibi *et al.*, 2008). Scarification methods show mixed results. It is known that exposing the seeds to mineral acids the temperature increases, and this phenomenon acts as a metabolic signal, initiating the first stages of germination, or denaturing germination inhibitors (Potter *et al.*, 1984). Avilés (2001) reports that the best scarification method for *Stenocereus gummosus* is the treatment with concentrated sulfuric acid, resulting in germination rate of 63%. Crisóstomo, (2009) achieved almost 100% germination at 20 d in *Astrophytum ornatum* seeds treated with 15% sulfuric acid and placed in 50% MS media. In MS media alone, very few seeds germinated after three months. Gibberellins are phyto regulators synthesized in several plant tissues, but especially so in tissues of active growth, such as embryos or meristems. Another important role is the induction of hydrolytic enzymes such as  $\alpha$ -amylase and proteases in seeds, and so increases the mobility of the endosperm. Gibberellic acid ( $GA_3$ ) induces the synthesis of  $\alpha$ -amylase, which is responsible for the processing of the starch reserves present in the seed during germination. Thus,  $GA_3$  is widely used as a promoter or inducer of germination in several plant species (Tigabu and Odén, 2001). In Cactaceae, there are few reports on the use of gibberellins as germination promoters, and the results are quite heterologous. Deno (1994) reports that in *Opuntia* sps,  $GA_3$  is an indispensable promoter. Sánchez-Venegas, (1997) showed similar results in concentration of  $40 \text{ mg L}^{-1}$  in *O. joconostle*. Olvera *et al.*, (2003) reported no significant effect in germination at concentrations up to  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  in *O. tomentosa*. The aim of this research was to determine the optimal germination conditions in ten cultivars of *Opuntia* sps, as well as evaluate the effect of gibberellic acid as promoters of seed germination.

## MATERIALS AND METHODS

### *Opuntia* sps samples

Seeds of ten mature fruits of *Opuntia* sps (Table 1, Fig. 1) were collected in the “Las Papas de Arriba” field, located in Ojuelos, Jalisco State, Mexico, between  $21^{\circ}43'30''$  and  $21^{\circ}43'77''$  N,  $101^{\circ}39'48''$  and  $101^{\circ}43'42''$  W, with an average altitude of 2260 m. The climate in this area is classified as dry template, with an average rain fall of 390-450 mm annual, and a mean temperature of 16-18 °C; rainfall occurs mainly in summer from May to September (Pimienta, 1990).

Ochoa et al. 2015

**Seed Extraction and cleaning**

The pulp of the fruit was extracted and washed several times with water at 60 °C on a 150 µm mesh until only the seeds remain. Afterwards, the seeds were treated with 10% phosphoric acid (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) for 10 min at room temperature, followed by two water rinses to remove the remaining acid. Finally, the seeds were left to dry on absorbent paper, and were used six months after extraction.

**Table 1.** Characteristics of the *Opuntia* spp. cultivars used in the germination study.

Scientific Name	Common name	Use <sup>a</sup>	Pulp color	Seeds per Fruit <sup>b</sup>	Abortive seeds (%) <sup>b</sup>
<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck	“Amarillo Plátano”	F	Orange	290±45	17±5
<i>O. amyclaea</i> Tenore	“Burróna”	F	Light Green	197±30	75±10
<i>O. streptacantha</i> Lemaire	“Cardona”	F-Fo	Red	ND	ND
<i>O. amyclaea</i> Tenore	“Cristalina”	F	Light Green	255±48	50±8
<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck	“Huesuda”	F	Orange	192±27	12±5
<i>O. megacantha</i> - Salm-Dyck	“Naranjón Legítimo”	F	Orange	ND	ND
<i>O. megacantha</i> Salm-Dyck	“Pico Chulo”	F	Orange	265±38	20±6
<i>O. albicarpa</i> Sheinvar	“Reyna”	F	Light Green	240±40	55±14
<i>O. albicarpa</i> Sheinvar	“Rojo Ojuelos”	F	Red	344±35	21±4
<i>O. ficus-indica</i> (L.) Miller	“Copena Torreoja”	TP	Red	215±33	28±9

<sup>a</sup> Cultivar use as according to Mondragon-Jacobo and Pimienta-Barrios (1995). F=Fruit; Fo=Feed; TP=Triple purpose.

<sup>b</sup> Mean ± standard deviation based on measurement of 20 fruits from at least ten plants. ND= not determined.

**Inert substrate (IS)**

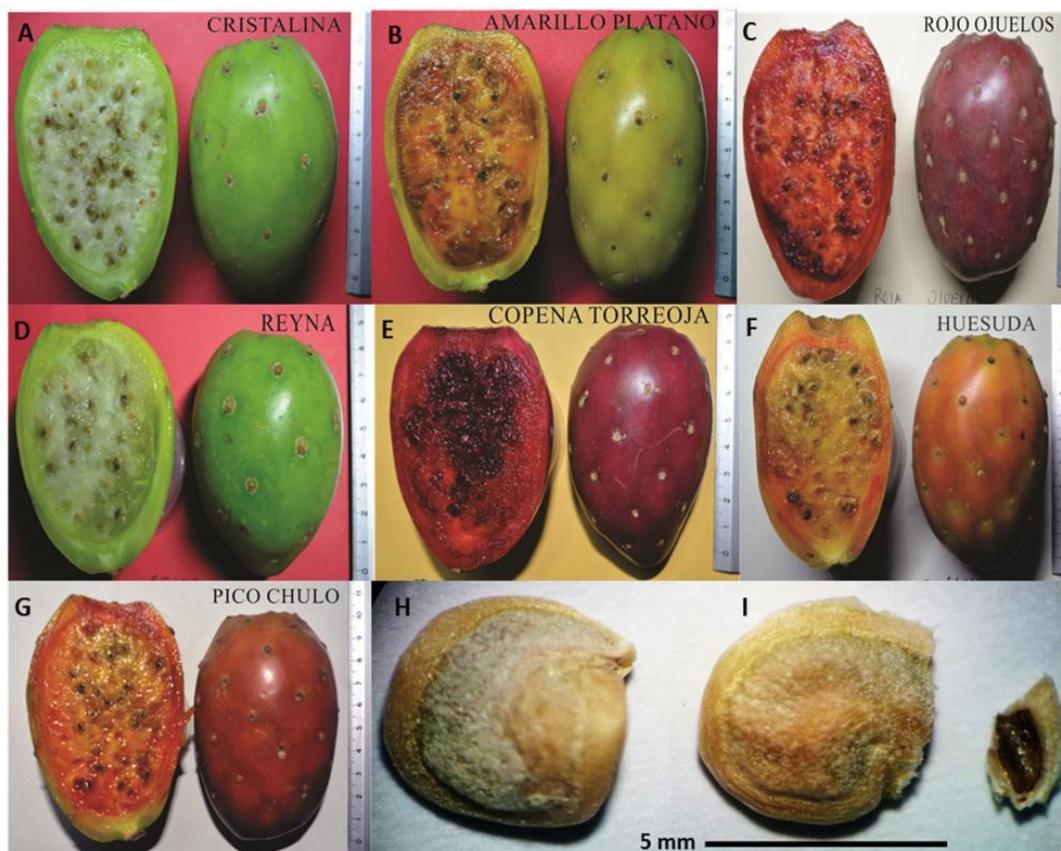
A mixture of pumice (3 mm mean size), peat moss (*Sphagnum* sp) and sand was prepared in a 1:1:1 (v/v/v) relation. The mixture was moistened and sterilized in an autoclave at 121 °C for 30 min.

**Inert substrate plus vermicompost (IS + H)**

A mixture of pumice, peat moss (*Sphagnum* sp) and vermicompost (*Eisenia foetida*) was prepared in a 1:1:1 (v/v/v) relation. The mixture was sterilized by placing in a microwave oven for 3 minutes. 20 seeds per cultivar were soaked in distilled water for 24 h. Afterwards, they

Ochoa *et al.* 2015

were placed in expanded polystyrene pots in either substrate (IS or IS+H) and kept in greenhouse conditions.



**Figure 1.** Fruits of different *Opuntia* sps. used in the germination experiments **A-G**. Cutout detail on the *Opuntia* seed coat (**H-I**).

#### Scarification (S)

Scarification was performed as described by Altere *et al.* (2006). Concentrated sulfuric acid was added to a group of seeds for 5 min. The seeds were rinsed twice with distilled water and were incubated with 6% hydrogen peroxide for 30 min. After this time, the seeds were placed in Petri dishes containing wet cotton in the bottom and filter paper on top as seeding surface. Each dish contained 20 seeds, with three repetitions per cultivar, and were incubated at 26 °C with 16 h light and 8 h darkness cycles.

Ochoa *et al.* 2015

### ***In vitro* medium germination**

#### **Murashige and Skoog medium (MS)**

The scarified seeds were disinfected by immersion in 5% sodium hypochlorite (w/v) for 10 minutes, and then rinsed three times with distilled, sterile water. The seed cover was clipped with pliers (Figure 1) in sterile conditions, and the seeds were placed in 100 mL Erlenmeyer flasks with Murashige and Skoog, (1962) media with 7.5 g L<sup>-1</sup> agar, and adjusted to pH 5.8, and were incubated at 26±1 °C with 24 h cycle, 16 h of light and 8 h of darkness, with a light intensity of 58 µE.

#### **MS plus gibberellic acid (GA<sub>3</sub>)**

MS medium was prepared at 25% of total salt concentration with 7.5 g L<sup>-1</sup> agar, to which 25 mg L<sup>-1</sup> of gibberellic acid was added. The seed cover was clipped with pliers in sterile conditions, and the flasks were incubated 28 °C ± 1 with 12 h light/8 h dark cycles with a light intensity of 58 µE.

#### **Gamborg liquid medium (B5).**

Seeds were disinfected with 5% sodium hypochlorite (w/v) for 24 h. The seed cover was broken with pliers in sterile conditions. Twenty seeds were then placed for four weeks in 30 ml of liquid B5 medium (Gamborg *et al.*, 1968) plus 1.95 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 0.099 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and placed in an orbital agitator set at 100 rpm. After the four weeks of primary culture elapsed, the germinated embryos subcultured, applying the same base medium without any growth regulators.

#### **Protein extraction and α-amylase activity determination**

The seeds were milled until a fine powder was obtained. This powder was defatted by mixing with an equivalent volume of acetone and vigorous agitation. The resulting mixture was centrifuged at 2150 rcf for 5 min. The supernatant was discarded, and the precipitate left to dry in an aluminum tray at room temperature. Once the acetone evaporated, the resulting powder was placed in a microtube and two volumes of 10 mM, pH 7.2 phosphate buffer were added, keeping it 12 hours at 4 °C to achieve the extraction of soluble proteins. The samples were then centrifuged at 16800 rcf for 5 min, and the supernatant was recuperated. This solution was used to quantify the protein present in the seed and analyze for α-amylase activity. Protein concentration was determined as described by Bradford (1976) using bovine serum albumin as the standard. In all extracts α-amylase activity was determined as described by Bandini *et al.* (2009); using 1% (w/v) starch as the substrate. One α-amylase activity unit was defined as the amount of enzyme required to produce a microgram of maltose in 30 min at 35 °C. Maltose was measured by the 3,5-dinitrosalicilic acid (DNS) method Bernfeld (1995). A blank was assayed concurrently with the reaction mixture. All assays were performed in triplicate.

#### **Statistical analysis**

For each cultivar three repeats of 20 seeds each were tested. Seeds were monitored daily, and the experiment was followed for 4 weeks. Germination was considered to have occurred

Ochoa et al. 2015

once the radicle sprouted. To the germination data (as percentage of germination) an analysis of variance (ANOVA) and a comparison of means using Tukey test, with  $p < 0.05$  by means of the software SPSS V2.0.

## RESULTS AND DISCUSSION

Considering that all specimens are domesticated species, the number of seeds in all cultivars (Table 1) was fairly homogenous (averaging 250 per fruit); however, there was a large difference in the number of abortive seeds, from 17 to 75%. Reyes-Agüero *et al.* (2005) reported that the average number of seeds per fruit varies considerably, from 55 in *O. brunneogemma* (F. Ritter) C. Schlindwein to 208 in *O. rastrera* (Weber). These authors suggest that in fruit cultivars in Mexico, with different degrees of domestication and wild types, fruits contain from 16 to 518 seeds. The number of seeds per fruit is a morphological variable that can be used to differentiate between *Opuntia* species, by discrimination analysis, as well as fruit size and pulp color (Chessa, 2010).

The seed inability to germinate under the correct conditions (temperature, moisture and gases concentration) is considered the latency, or dormancy, of the seed. Immersion in 10% phosphoric acid was an effective method to clean the pulp adhered to the seed cover, due to the breakage of the glycosidic links of complex carbohydrates, increasing their solubility and promoting germination. Inert substrate (pumice and sand) and inert plus vermicomposting substrates are commonly used in the nursery due to its characteristic of retaining moisture. The germination rate on these substrates was 33.8% and 16.4% respectively (Figure 2). Therefore, the imbibition water is not sufficient to trigger a uniform germination process.

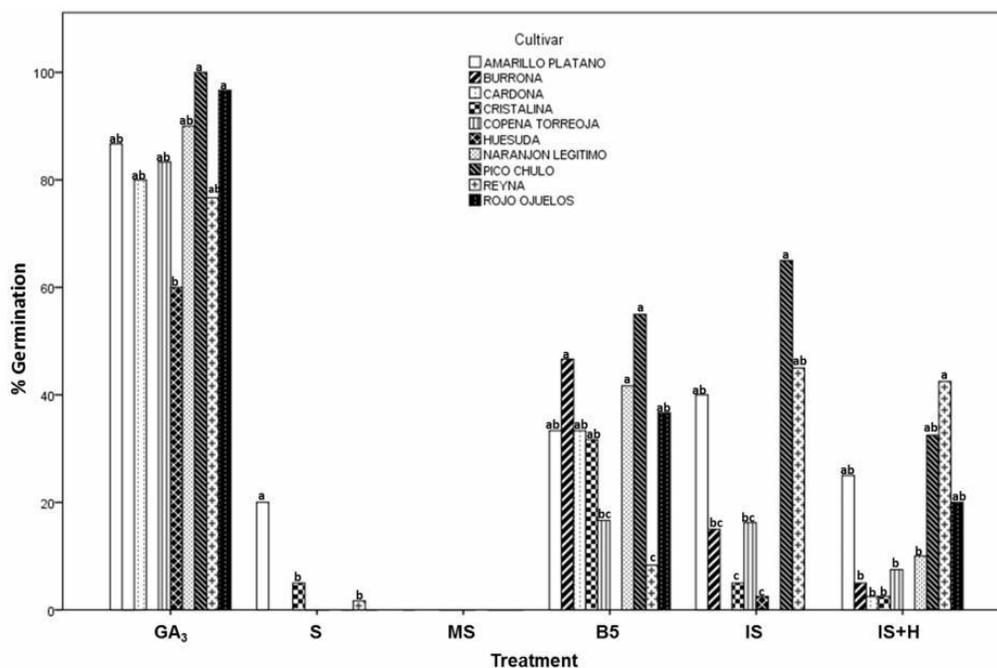
The hard seed cover in the genus *Opuntia* may act as mechanical protection of the embryo, instead of being an impermeable element (Werker, 1997). Our germination data (Figure 2) shows that the dormancy is not caused by a mechanical barrier blocking the radicular protrusion, as no treatment, neither chemical, with  $H_2SO_4$  or  $H_2O_2$ , or mechanical, by performing a cut in the seed cover (Figure 1 H-I), was enough to break the latency, getting only a 4.4% of germination (S).

Sulfuric acid has been used in other *Opuntia* species to increase the germination rate Olvera-Carrillo *et al.* (2009). However, the cover of the embryo does not act only as a mechanical barrier, but may influence the germination indirectly. Altere *et al.* (2006) reported, the use of sulfuric acid influenced germination negatively, as the number of seeds that germinated was lower than the other methods tested.

Another type of dormancy in these species has a physiological origin that has been eliminated in part by two agents: light as a photoperiod treatment and the use of hydrogen peroxide. Forced dormancy is regulated by environmental conditions, such as light, and seeds are ready to germinate immediately after environmental limitations are lifted (Vázquez-Yáñez and Orozco Segovia 1996). Positive photoblastic response is common among *Cacti*, including the *Opuntia* genus (Rojas-Aréchiga and Vázquez-Yáñez, 2000). The hydrogen

Ochoa *et al.* 2015

peroxide solution, acting as an oxidizing agent, regulates the primary, or innate, latency, as demonstrated by Altere *et al.* (2006). This latency, which prevents the germination of the seed inside the mother plant and after a time period after its dispersion, may be caused by the embryo's asphyxia due to the hardness of the teguments. However, our study did not present this behavior, as it was the treatment that resulted.

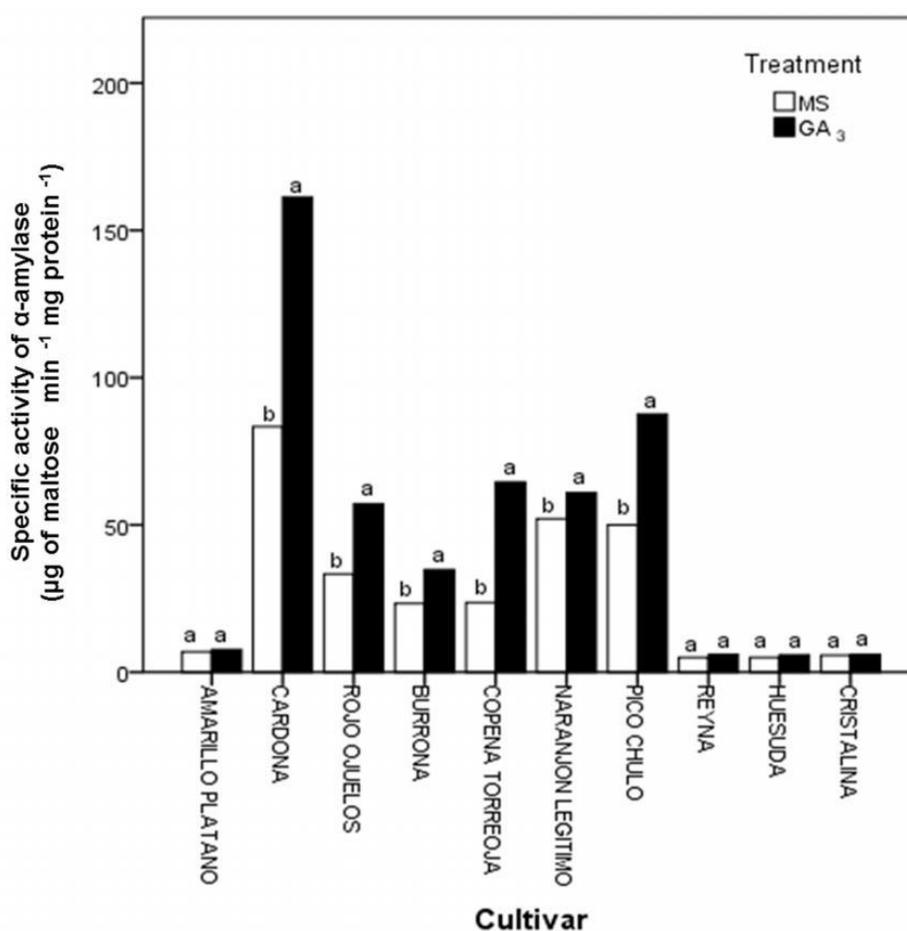


**Fig. 2.** Germination percentage for seeds of ten cultivars of *Opuntia* spp after 28 days. Treatments: (**GA<sub>3</sub>**) MS 25% plus 25 mg L<sup>-1</sup> of gibberellic acid, (**S**) scarification with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (**MS**) Murashige and Skoog basal salts, (**B5**) Gamborg basal salts, plus 1.96 mg L<sup>-1</sup> kinetin and 0.099 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D, (**IS**) pumice: peat moss: sand (**IS+H**) Peat Moss: Pumice: Vermicompost. Different letters between cultivars in treatment are significantly different by Tukey at  $p < 0.05$ .

A photoperiod 16/8 h was required for seeds to germinate in the *in vitro* treatments, and is a shared characteristic with other *Opuntia* species. Monteiro *et al.* (2005) demonstrated the importance of the light treatment in the germination of *O. stricta* and *O. tomentosa* seeds. The best results for *Opuntia* sps germination were obtained in the *in vitro* media GA<sub>3</sub>, reaching 85% germination, and B5 with 33.7% (Figure 2). In general, seed covers are impermeable to water, and when placed in *in vitro* media this may not be an issue as they are very high in moisture; however, water presence alone is not sufficient to induce germination, as evidenced by medium MS, where no germination was observed in the evaluated time. It is known that gibberellic acid can participate in the remobilization of nutrients or germination inhibitors George (2008) and Masuoka (2003) report that gibberellic acid induces the

Ochoa et al. 2015

mobilization of the seed reserves by inducing hydrolytic enzymes such as  $\alpha$ -amylase and proteases, facilitating the mobilization of the endosperm and the rate of germination. This phenomena was observed in our study, where the cultivars that germinated earliest (2 d), such as Cardona, Rojo Ojuelos, Naranjon Legitimo, Pico Chulo and Copena Torreoja, followed by Burrona, show the highest amyolytic activity (Figure 3), whereas in cultivars such as Amarillo Platano, Reyna, Huesuda y Cristalina the radicle did not appear until the third week, both being higher in the treatment with  $GA_3$  compared to the MS medium alone. Thus the speed of germination is influenced by the specific activity of  $\alpha$ -amylase, where the cultivars with the highest germination speed show the highest value of enzymatic activity.



**Figure 3.** Specific activity of  $\alpha$ -amylase in *Opuntia* spp seeds after seven days established on (MS) basal salts of Murashige and Skoog (1962) and (GA<sub>3</sub>) MS at 25% medium plus 25 mg L<sup>-1</sup> of gibberellic acid. Different letters between treatments are significantly different by Tukey at  $p < 0.05$ .

Ochoa et al. 2015

Olvera et al. (2003) has reported that concentrations of 1000 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> in *O. tomentosa* do not promote seed germination, but in *O. joconostle*, at 40 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub>, has a promoter effect previous to the seed coat bursting Sánchez-Venegas (1997). In *O. rastrera*, *O. microdasys* and *O. macrocentra*, the addition of 200 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> does not have a significant effect in the germination of the seeds Mandujano et al., (2007). In our study, the addition of 25 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> to the medium was enough to stimulate the germination in all the tested *Opuntia* cultivars.

### CONCLUSIONS

Both inert substrates showed a similar behavior in the germination of the ten varieties of *Opuntia* tested, averaging 10-55% germination rate. Germination was increased to an average of 40% by mechanical scarification (breaching of the cuticle), while the sulfuric acid treatment had no effect on germination. Under *in vitro* conditions, with a 16/8 h photoperiod, a low percentage of germination in seeds was induced. It was demonstrated that gibberellic acid plays an essential role in the promotion of germination (above 90%) in seeds of *Opuntia* spp., as in the remobilization of the carbohydrate source, by increasing the amylolytic activity in the germinated seeds.

### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish thank to Mr. Fernando Torres from "Las Papas de Arriba" field in Ojuelos, Jalisco by providing plant material for this study.

### REFERENCES

- Altere, M., Trione, S., Guevara J.C. and Cony, M. 2006. Stimulation and promotion of germination in *Opuntia ficus-indica* seeds. Journal of Professional Association for Cactus Development 8, 91-100.
- Avilés, A., Morales, R., Treviño, N., Oranday, C. and Verde, S. 2001. Datos sobre germinación de *Stenocereus gummosus* mediante métodos de escarificación. XV Congreso Mexicano de Botánica.
- Bandani, A.R., Kazzazi, M. and Mehrabadi, M. 2009. Purification and characterization of midgut  $\alpha$ -amylases of *Eurygaster integriceps*. Entomol. Sci. 12, 25–32.
- Bernfeld, P. 1955. Amylase  $\alpha$  and  $\beta$ , In Methods in Enzymology. (Colowick SP, Kaplan NO, ed.), Academic Press Inc, New York 1:149-158.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72, 248–254.
- Chessa, I. 2010. Discriminant analysis of morphological descriptors to differentiate the *Opuntia* genotypes. VIIth International Congress on Cactus Pear and Cochineal October 17-22, Agadir (Morocco).
- Crisóstomo, S. M. 2007. Evaluación de la capacidad morfogénica en explantes longitudinales de *Astrophytum ornatum*. XVIII Congreso Mexicano de Botánica. Zacatecas, Zacatecas. México. Octubre 16-19

## Ochoa et al. 2015

- Deno, N.C. 1994. The critical role of gibberellins in germination and survival of certain cacti. *Cactus and Succulent Journal* 66, 28-30.
- Flores, J. and Jurado, E. 2003. Are nurse-protégé interactions more common among plants from arid environments? *Journal of Vegetation Science* 14, 911-916.
- Flores, J., Arredondo, A. and Jurado E. 2005. Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: An endangered cacti genus. *Natural Areas Journal* 25, 183-187.
- Flores, J., Jurado E. and Arredondo A. 2006. Effect of light on germination of seeds of Cactaceae from the Chihuahuan Desert, México. *Seed Science Research* 16, 149-155.
- Flores, J., Jurado, E. and Jiménez-Bremont, J.F. 2008. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology* 23, 43-46.
- Gamborg, O. L., Miller R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50,151-158.
- George, E. F. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3rd Ed. Springer. 227-248.
- Habibi, Y., Heux, L., Mahrouz, M. and Vignon, M. R. 2008. Morphological and structural study of seed pericarp of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Polymers* 72,102–112.
- Mandujano, M. C., Golubov, J. and Rojas-Aréchiga, M. 2007. Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 52, 46-52.
- Matsuoka, M. 2003. Gibberellins signaling: How do plant cells respond to GA signals? *J. Plant Growth Reg.* 22, 123-125.
- Mondragón-Jacobo, C. and Pimienta-Barrios, E. 1995. Propagation. In Barbera, G., P. Inglese, and E. Pimienta-Barrios (eds.). *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. pp. 64-70.
- Monteiro, A., Cheia, V.M., Vasconcelos, T. and Moreira, I. 2005. Management of the invasive species *Opuntia stricta* in a Botanical Reserve in Portugal. *Weed Research* 45, 193-201.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 437-497.
- Nobel, P.S. 1999. Photosynthetic characteristics of CAM succulents with high productivity. In: G. Garab, ed. *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Vol. V. Kluwer Academic Publishing, Dordrecht. The Netherlands. pp. 3955-3960
- Olvera, Y., Márquez-Guzmán, J. Barradas V.L., Sánchez-Coronado, M.E. and Orozco-Segovia, A. 2003. Germination of the hard seed coated *Opuntia tomentosa* SD., a cacti from the Mexico Valley. *J. Arid. Environ.*55, 29-42.
- Olvera-Carrillo, Y., Méndez, I., Sánchez-Coronado, M.E., Márquez-Guzmán, J., Barradas, V.L., Huante, P. and Orozco-Segovia, A. 2009. Effect of environmental heterogeneity on field germination of *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. *J. Arid. Environ.*73, 421–427.
- Orozco-Segovia, A., Márquez-Guzmán, J., Sánchez-Coronado, M.E., Gamboa De Buen, A., Baskin, J.M. and Baskin, C.C. 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to

Ochoa et al. 2015

- seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Ann. Bot.* 99, 581–592.
- Pimienta, B. E. 1990. El Nopal Tunero. Colección Tiempos de Ciencia. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 246 p.
- Potter, R.L., Petersen, J.L. and Ueckert, D.N. 1984. Germination responses of *Opuntia* spp. to temperature, scarification and other seed treatments. *Weed Science* 32, 106–110.
- Rojas-Aréchiga, M. and Vázquez-Yañes, C. 2000. Cactus seed germination: a review. *Journal of Arid Environments* 44, 85-104.
- Reyes-Agüero, J.A., Aguirre, J.R. and Valiente-Banuet, A. 2005. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *J. Arid. Environ.* 64, 549-585.
- Sánchez-Venegas, G. 1997. Germinación, viabilidad y características distintivas de la semilla de *Opuntia joconostle* Weber, forma cuaresmero. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 42, 16-21.
- Tigabu and Odén 2001. Effect of scarification, gibberellic acid and temperature on seed germination of two multipurpose *Albizia* species from Ethiopia. *Seed Science and Technology* 29, 11-20.
- Vazquez-Yañes, C. and Orozco Segovia A. 1996. Physiological Ecology of Seed. Dormancy and Longevity in the Tropical Rain Forest. pp. 535-554. In: Mulkey, S., R.L. Chazdon, and A.P. Smith (eds). *Physiological Ecology of Tropical Forests*. Chapman & Hall
- Werker, E. 1997. *Seed Anatomy*. Stuttgart; Gebrüder Borntraeger. 424 pp.

## CAPÍTULO IV

### **Método de selección en explantes *in vitro* de *Opuntia* sps. con resistencia a la mancha negra causada por *Pseudocercospora opuntiae*.**

**María Judith Ochoa<sup>a,b</sup>, Luis Rivera-López<sup>b</sup>, Juan Florencio Gómez-Leyva<sup>b</sup>**

\*Corresponding Author: [mariajudith8a@gmail.com](mailto:mariajudith8a@gmail.com)

En el presente estudio se evaluó la patogenicidad de *P. opuntiae* y sus extractos fúngicos sobre explantes de nopal provenientes de semillas y selección a campo bajo condiciones *in vitro*. Los resultados permitirán establecer un sistema para la obtención de variantes somaclonales resistentes a la mancha negra.

Este capítulo ha sido publicado en la Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo, a continuación se incluye el artículo.



*Universidad Nacional de Cuyo  
Facultad de Ciencias Agrarias*

----- La Directora Científica de la Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cuyo (JCR - ex ISI), Dra. Ing. Agr. María Flavia Filippini deja constancia que: María Judith Ochoa, Luis Rivera-López y Juan Florencio Gómez-Leyva, son autores del artículo "Método de selección en explantes in vitro de *Opuntia* sps con resistencia a la mancha negra causada por *Pseudocercospora opuntiae*", el cual ha sido aprobado para su publicación en esta Revista y se encuentra en etapa de diagramación.-----

-----Se extiende esta constancia para ser presentada ante quien corresponda en Chacras de Coria, Mendoza, Argentina, a los 30 días del mes de setiembre de dos mil quince. -----

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "María Flavia Filippini".

Dra. Ing. Agr. María Flavia Filippini  
Directora Científica  
Rev. de la Facultad de Ciencias Agrarias  
Universidad Nacional de Cuyo

---

Almirante Brown 500

Chacras de Coria - Luján de Cuyo

Mendoza - Argentina

M5528AHB

PBX (54 261) 4135000 Int. 1220

Fax (54 261) 4960469

ccea@fca.uncu.edu.ar

<http://revista.fca.uncu.edu.ar>

**Método de selección en explantes *in vitro* de *Opuntia* sps.  
con resistencia a la mancha negra causada por  
*Pseudocercospora opuntiae***

***In vitro* selection method in explants of *Opuntia* sps. with resistance  
to black spot caused by *Pseudocercospora opuntiae***

María Judith Ochoa<sup>1,2,3</sup>, Luis Rivera-López<sup>3</sup>, Juan Florencio Gómez-Leyva<sup>3</sup>

Originales: *Recepción*: 08/09/2015- *Aceptación*: 30/09/2015

**RESUMEN**

La mancha negra del nopal; provocada por *Pseudocercospora opuntiae* es una enfermedad difundida entre los sistemas productivos de nopal. El proceso de patogénesis, comprende un período de incubación de 90 días y el desarrollo de los síntomas puede ocurrir en 25 días. Sin embargo, aún es limitada la información del patosistema de *P. opuntiae* en *Opuntia* sps. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de productos extracelulares y esporas de *P. opuntiae* sobre plántulas de nopal en condiciones *in vitro*. Se evaluó tres genotipos provenientes de embriones cigóticos y dos genotipos de selección a campo caracterizados como tolerante (T) y resistente (R) a *P. opuntiae*. Se inoculó plántulas de *Opuntia in vitro* con el extracto extracelular y una suspensión de 10<sup>8</sup> conidios ml, se evaluó el daño a los 15, 30, 45 y 60 días posterior a la inoculación (dpi). Después de 60 dpi se presentaron los síntomas en explantes inoculados con el hongo puro, mientras los productos de excreción del hongo en medio líquido mostraron capacidad de provocar síntomas similares al inóculo fúngico. Estos resultados demuestran que *P. opuntiae* infecta explantes de *Opuntia* bajo condiciones de cultivo *in vitro*, lo que podría ser una herramienta importante en la selección de genotipos resistentes de *Opuntia* sps. a la mancha negra.

**Palabras clave**

mancha negra • *Opuntia* • selección *in vitro* • extracto fúngico

- 
- 1 Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Avda. Belgrano (S) 1912 (4200), Santiago del Estero, Argentina. mariajudith8a@gmail.com
  - 2 Departamento de Botánica y Zoología, Universidad de Guadalajara. A. Post. 1-139, Zapopan, Jalisco 45101, México.
  - 3 ITT, Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. 45640. México.

---

M. J. Ochoa, L. Rivera-López, J. F. Gómez-Leyva

---

### ABSTRACT

The black spot cactus is caused by *Pseudocercospora opuntiae* a disease spread among production systems. The process of pathogenesis, comprising an incubation period of 90 d. and the development of symptoms can occur in 25 d.; however, is still limited information pathosystem *P. opuntiae* in *Opuntia* sps. This study aimed to evaluate the effect of extracellular products and spores of *P. opuntiae* on cactus pear under *in vitro* conditions. Three genotypes from zygotic embryos and two genotypes product of field selection which were characterized as tolerant (T) and resistant (R) to *P. opuntiae* were evaluated. *Opuntia in vitro* seedlings were inoculated with the extracellular extract and a suspension of  $10^8$  conidia m/l, the damage at 15, 30, 45 and 60 d. post-inoculation (dpi) were evaluated. After 60 dpi symptoms occurred in explants inoculated with pure fungus, while the excretion products of the fungus in liquid medium showed ability to induce symptoms similar to fungal inoculum. These results demonstrate that *P. opuntiae* infected *Opuntia* explants under *in vitro* culture conditions, which could be an important tool in the selection of resistant genotypes to black spot in *Opuntia* sps.

#### Key words

black spot • *Opuntia* • *in vitro* selection • fungal extract

### INTRODUCCIÓN

La mancha negra del nopal; provocada por *Pseudocercospora opuntiae* (2, 13, 14), es una enfermedad difundida en los sistemas productivos de nopales de México y Argentina (3). La enfermedad ha sido detectada en cladodios de más de seis meses de edad con lesiones color café a negro, las cuales inician con la presencia de puntos pequeños color olivo que aumentan de tamaño y cambian a un color café oscuro (13).

El tiempo desde la aparición de los primeros síntomas hasta que las lesiones se desarrollan varía entre 25 a 40 días dependiendo del grosor y la edad del cladodio (7, 15).

El proceso de patogénesis, de acuerdo con la biología del patógeno indica que el período de incubación toma alrededor de 104 días y el desarrollo de los síntomas ocurre en 25 días en cladodios de 6 meses de edad. Sin embargo, aún es limitada la

información sobre el proceso de patogénesis que se desencadena una vez que existe el reconocimiento entre patógeno y hospedante. Por otro lado no se conoce si *P. opuntiae* tiene la capacidad de infectar tejidos jóvenes (explantes *in vitro*), ya que en condiciones de campo se ha observado que los cladodios jóvenes de menos de 6 meses, cosechables en los sistemas productivos de nopal verdura y forraje, no presentan síntomas de la enfermedad.

Recientemente se ha reportado el proceso de patogénesis en cortes histológicos de cladodios enfermos, donde se informa que el patógeno invade intracelularmente cavidades subestomáticas, el colénquima y clorénquima, causando plasmólisis y desintegración de los cloroplastos (10, 15)

Las estrategias de control de la enfermedad en los últimos años se han basado en la utilización de productos químicos

## Método de selección en explantes *in vitro* de *Opuntia* sps

a base de Oxiclóruo de cobre, Benomil y Mancozeb entre otros (11), los cuales son aplicados por el 68,5% de los productores sin tener en cuenta el ciclo del patógeno por lo que la enfermedad no ha sido controlada.

En el control de la mancha negra, también se ha empleado el quitosano el cual disminuyó el crecimiento *in vitro* de *Collectotrichum gloeosporoides* y *Fusarium lunatum* ambos patógenos asociados con la mancha negra (4).

Ochoa *et al.* (2015) sugieren como estrategia para el control de la enfermedad, el empleo de genotipos resistentes provenientes de selección masal y la utilización de plántulas de semillas, que puedan mostrar resistencia mediante el intercambio genético.

La obtención de genotipos resistentes a *Pseudocercospora* es una prioridad a partir de la aparición de la enfermedad en México. Para ello es necesario evaluar un sistema donde se puedan comprobar los postulados de Koch, empleando tanto el hongo puro como sus extractos extracelulares sobre explantes de *Opuntia* desarrollados a partir de embriones cigóticos bajo condiciones *in vitro*.

El empleo de fitotoxinas de patógenos ya sea de naturaleza proteica o compuestos de bajo peso molecular, como agentes de selección *in vitro* es una de las técnicas que se utiliza para obtener somaclonales resistentes a una enfermedad, teniendo como premisa fundamental que la resistencia debe manifestarse a nivel *in vitro* (6). Para ello generalmente se estudia la respuesta de variedades de comportamiento conocido en cuanto a la resistencia o susceptibilidad a la enfermedad y su posible diferenciación a este nivel. Estudios de este tipo se han realizado con *P. fijiensis* sobre su posible producción de toxinas (5).

Las fitotoxinas tienen dos propiedades importantes: son activas a muy bajas concentraciones y son móviles dentro de la planta y por lo tanto pueden actuar a distancia del sitio de infección (16).

Por otro lado, en la interacción *Pseudocercospora-Opuntia* no se tienen estudios sobre la selección de genotipos resistentes a la enfermedad mediante la utilización de extractos extracelulares del patógeno.

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio se evaluó la patogenicidad de *P. opuntiae* y componentes extracelulares sobre explantes de nopal provenientes de semillas y selección a campo bajo condiciones *in vitro*. Los resultados obtenidos permitirán establecer un sistema para la obtención de somaclonales resistentes a la mancha negra.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Los genotipos utilizados fueron obtenidos de semillas de frutos de nopal colectados en las zonas productoras de Santa Lucía, Zapopan 20°79'12" N, 103°37'30" O y 1420 m s. n. m., Jalisco.

Las semillas fueron sembradas en medio basal MS (12) bajo condiciones asépticas de cultivo y colocadas a 27°C.

A dos semanas de su germinación los embriones fueron separados, los cigóticos de los somáticos de acuerdo con Vélez-Gutierrez *et al.* (1996). Estos explantes de *Opuntia* se establecieron durante 60 días para su endurecimiento en medio MS sin reguladores de crecimiento; fueron denominados como: G<sub>2</sub>, G<sub>6</sub>, G<sub>7</sub> y los genotipos tolerante (T) y resistente (R), elegidos mediante selección a campo y pruebas de patogenicidad a *P. opuntiae* (13).

M. J. Ochoa, L. Rivera-López, J. F. Gómez-Leyva

Los explantes se transfirieron en dos sustratos inertes: arena y perlita, para evitar el desarrollo de *P. opuntiae* en el medio; se establecieron bajo condiciones de 26°C 16h luz/ 8h, durante 60 d. cada 15 d se les agregó 5 ml de medio MS al 25% para su nutrición.

Para los experimentos de infección con *Pseudocercospora* y el extracto fúngico se empleó 3 plantas de cada genotipo por sustrato.

#### Material microbiológico

Para las pruebas de patogenicidad se empleó un aislamiento de *P. opuntiae* tomado de plantaciones comerciales de *Opuntia* (11), la cepa creció en medio (Extracto de Malta MEA 2%) durante 60 d. Se preparó una suspensión conoidal  $1 \times 10^8$  ml.

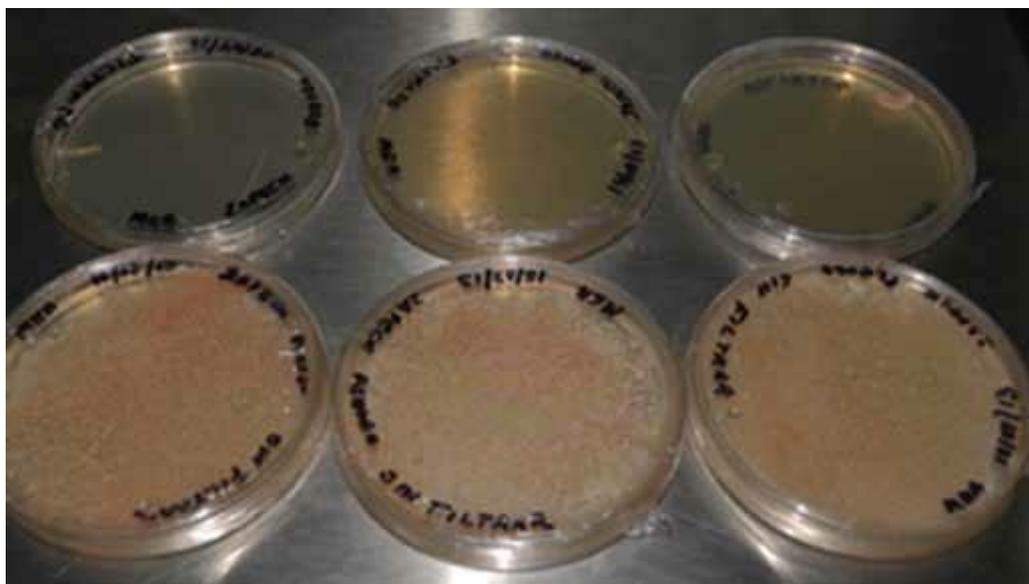
#### Obtención del extracto de *Pseudocercospora opuntiae*

El extracto extracelular de *P. opuntiae* se obtuvo de un cultivo en medio líquido papa dextrosa (PDB) por 60 d en agitación constante a temperatura ambiente.

Al término de este período el micelio del hongo fue eliminado, se centrifugó el medio de cultivo a 12000 rpm durante 15 min en dos ocasiones.

Una vez centrifugado se recuperó el sobrenadante y se filtró con una membrana de 0,2  $\mu$ m.

El extracto obtenido fue incorporado en placas con PDA en proporción de 10 ml.L<sup>-1</sup> para evaluar la presencia del hongo (figura 1).



**Figura 1.** Evaluación de la efectividad del extracto de *P. opuntiae*: arriba filtrado, debajo sin filtrar.

**Figure 1.** Evaluation of effectiveness of *P. opuntiae* extract: up filtered, unfiltered below.

Método de selección en explantes *in vitro* de *Opuntia* sps**Reacción de enzimas del extracto de *Pseudocercospora opuntiae***

Para determinar factores de patogenicidad relacionados con la actividad de enzimas hidrolíticas en el extracto fúngico extracelular, se evaluó las actividades *in vitro* de las enzimas amilasa, proteasa y celulasa. Se preparó en cajas de Petri con los siguientes sustratos (tres por cada reacción).

*Almidón*

(1%): 1g de almidón se disolvió con 100 ml agua destilada fría, se adicionó 1g de agar-agar y 1ml buffer fosfato 1M, se calentó en microondas durante 1 min para disolver el agar- agar y se esterilizó a 121°C, acto seguido se realizó el vaciado en las caja Petri en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar.

Reacción a la solución de Lugol: yodo  $I_2$  5g.l<sup>-1</sup> yoduro de potasio KI, 10g.l<sup>-1</sup>, agua destilada 85 ml, la solución de Lugol se colocó sobre las cajas de Petri y se observó la reacción al cabo de 15 min (22).

*Proteasa*

1g de caseína se disolvió con 10 ml agua destilada. Por separado a 90 ml de agua destilada se le adicionó 1 gota de ClCa 1M y 1g de agar, se calentó en microondas durante 1 min para disolver el agar y se esterilizó a 121°C y 1,1 kg cm por 15 min. Cuando la solución está a 40°C se adicionó la solución de caseína agitando manualmente y finalmente se realizó el vaciado en cajas Petri en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar.

Reacción al azul de Comassie (20).

*Celulosa*

(1%), 1g de celulosa (Sigma®) se disolvió en 100 ml agua destilada con 1g

de agar y 1 gota de CaCl<sub>2</sub> 1M, se calentó en microondas durante 1 min para disolver el agar y se esterilizó a 121°C y 1.1 kg cm por 15 min. Luego, se realizó el vaciado en cajas Petri en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar. Reacción en UV (Entela 8W Model UVLms-38), se sometió a la luz UV - 365 nm con Calco Fluor Stain (Sigma-Aldrich) (21).

Se colocó papeles de filtro estériles en las cajas de Petri preparadas para cada reacción y se agregó en la campana de flujo laminar 20, 50 y 100 µl respectivamente del extracto de *P. opuntiae*.

Posteriormente, en cada reacción enzimática, se midió el halo formado alrededor del papel de filtro con las diferentes concentraciones del extracto fúngico.

**Inoculación de explantes *in vitro***

Se realizó dos experimentos por separado en los cuales se evaluó la patogenicidad del hongo puro y su extracto en los explantes de los genotipos G<sub>2</sub>, G<sub>6</sub> y G<sub>7</sub> (provenientes de semilla), R y T (seleccionados a partir de pruebas de patogenicidad. Los mismos se establecieron en dos sustratos inertes 1: arena, 2: perlita. Los explantes fueron inoculados con 50µl del extracto fúngico y 50µl de suspensión conoidal 1x10<sup>-8</sup> ml; la inoculación se realizó en la parte media de cada explante utilizando una aguja hipodérmica, las plantas control se inocularon con agua destilada estéril.

La patogenicidad del hongo y del extracto se evaluó a los 15, 30, 45 y 60 d, mediante el seguimiento de una escala arbitraria de severidad de la enfermedad (figura 2, pág. XXX).

Se utilizó un diseño completamente al azar.

M. J. Ochoa, L. Rivera-López, J. F. Gómez-Leyva

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó pruebas de análisis multifactorial para estimar las mejores condiciones de infección en relación con los sustratos e inóculos probados; también se realizó un análisis de varianza para evaluar la severidad de los síntomas provocados por ambos inóculos, utilizando el programa estadístico STATGRAPHICS. 5.1.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Reacción de enzimas del extracto de *P. opuntiae*

Referente a la actividad enzimática del extracto extracelular de *P. opuntiae* obtenido a partir del medio PDB, se observó la degradación *in vitro* de los sustratos preparados, por las enzimas amilasa, celulasa y proteinasa en todas las concentraciones probadas (20, 50, 100 µl) (figura 3, pág. XXX).

La degradación del sustrato se observa con la formación de un halo concéntrico alrededor del disco de papel filtro que contenía el extracto del hongo. Estos resultados sugieren que el hongo secreta estas enzimas de forma extracelular en el medio de cultivo, posiblemente para degradar y asimilar algunos de sus componentes. Asimismo estos compuestos podrían relacionarse en mayor o menor grado con el proceso de patogénesis y la manifestación de los síntomas de la enfermedad en *Opuntia* junto con la producción de toxinas.

Estudios de este tipo se han realizado con *P. fijiensis* sobre su posible producción de toxinas (5).

Se sabe que estas enzimas (amilasa, celulasa y proteinasa) además de otras fitotoxinas pueden actuar sobre los componentes estructurales de la pared celular de los vegetales (17).

La producción *in vitro* de fitotoxinas en medios de cultivos ha sido reportada para diferentes especies de hongos (9, 18) y la importancia de los extractos fúngicos de sus cultivos está siendo ampliamente estudiada, ya que se ha demostrado que en estos se encuentran diferentes compuestos que producen síntomas en las plantas (8).

Arango *et al.* (2010) demostraron que la variación en las condiciones de luz, el tiempo de fermentación y el aislamiento, se relaciona con la fitotoxicidad de los extractos; por lo que estudios posteriores podrán describir los componentes del extracto extracelular de *P. opuntiae*.

### Inoculación de explantes *in vitro*

Los genotipos estudiados mostraron diferencias después de 60 d en cuanto a la severidad de la infección (tabla 1).

**Tabla 1.** Análisis estadístico multifactorial de sustratos, inóculos y genotipos. T: Tolerante, R: Resistente, G<sub>2,6,7</sub>: Genotipos cigóticos.

**Table 1.** Multifactorial statistical analysis of substrates, inoculum and genotypes. T: Tolerant, R: Resistent, G<sub>2,6,7</sub>: zygotic genotypes.

Factor	Severidad de la infección
Sustrato	
Arena	1,15 <sup>a</sup>
Perlita	1,35 <sup>a</sup>
Inóculo	
Extracto fúngico	0,8 <sup>b</sup>
Hongo puro	1,7 <sup>a</sup>
Genotipo	
G <sub>2</sub>	1,87 <sup>b</sup>
G <sub>6</sub>	0,75 <sup>c</sup>
G <sub>7</sub>	2,62 <sup>a</sup>
T	0,87 <sup>c</sup>
R	0,12 <sup>c</sup>

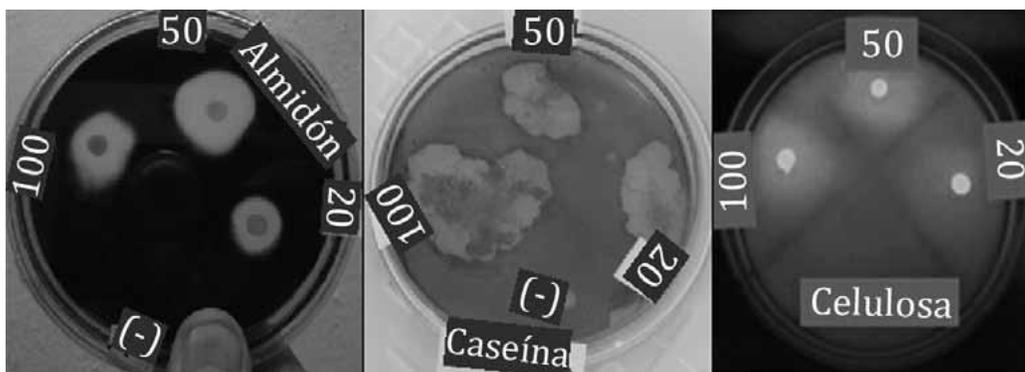
\* Letras diferentes, muestran diferencias estadísticas entre los tratamientos. Tukey HSD  $p \leq 0,05\%$ .

\* Different letters show statistical differences between treatments Tukey HSD  $p \leq 0,05\%$ .

Método de selección en explantes *in vitro* de *Opuntia* sps

**Figura 2.** Evolución de síntomas en explantes: A: explante sano, B: necrosis en el punto de inoculación, C: tejido acuoso sin avance, D: explante necrosado, muerto.

**Figure 2.** Symptoms evolution in explants: A: explant healthy, B: necrosis in the inoculation, C: aqueous tissue progression, D: necrotic dead explant.



**Figura 3.** Actividad enzimática de *P. opuntiae* a) almidón, b) caseína, c) celulosa.

**Figure 3.** Enzymatic activity *P. opuntiae* a) starch, b) casein, c) cellulose.

Respecto de las condiciones de infección, extracto y hongo puro, relacionadas con el origen del sustrato (arena y perlita), no existen diferencias significativas en la severidad de los síntomas, el sustrato no influye en la interacción planta-patógeno.

Probar sustratos inertes en la infección con *Pseudocercospora* se realizó con el objetivo de que el hongo no tuviera un sustrato rico para desarrollarse, esto lo obligó a crecer directamente sobre el explante, con

ello se aceleraría el proceso de infección, lo cual descarta cualquier posibilidad de enmascaramiento de los resultados provocado por los componentes del medio de cultivo.

Después de 60 d de la inoculación la severidad de la infección fue mayor y se presentó en un menor tiempo en explantes inoculados con el hongo puro. Estos resultados demuestran que *P. opuntiae* tiene la capacidad de infectar explantes de *Opuntia* bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

M. J. Ochoa, L. Rivera-López, J. F. Gómez-Leyva

Sin embargo, en condiciones de campo no se observa infección en cladodios de menos de 6 meses de edad, lo cual pudiera estar relacionado con el largo período de incubación del hongo 120 d (13), por lo que no presentan síntomas de la enfermedad. Estos son los utilizados como nopal verdura o forraje y representaría una estrategia de "convivencia" con la enfermedad en los sistemas productivos que utilizan cladodios de esta edad.

Por otra parte, se observa que el extracto fúngico tiene la capacidad de generar patogenicidad en explantes de *Opuntia* (figura 3, pág. XXX), lo cual concuerda con otros estudios sobre la patogenicidad de extractos de hongos fitopatógenos (18).

Su efecto provoca una menor severidad en el desarrollo de los síntomas, los cuales tardan más tiempo en aparecer en comparación con el hongo puro, dicha patogenicidad pudiera estar relacionada con la producción de enzimas hidrolíticas (celulasa, amilasa, y proteasa) en combinación con fitotoxinas, estudios sobre el perfil proteico de extractos de *P. opuntiae* en los medios PDB, Czapeck, V8 mostraron diferencias en el contenido de las proteínas secretadas en cada medio de cultivo (datos no mostrados).

Estudios similares se han reportado para extractos de *Colletotrichum*, donde se demostró que en los mismos se encuentran metabolitos fitotóxicos generados por el hongo, los cuales inducen en las plantas hospederas síntomas similares a los producidos por los hongos; Theerthagiri *et al.* (2008) y Yoshida *et al.* (2000) demostraron la presencia de toxinas no específicas en los extractos del hongo *C. dematium* que provoca lesiones necróticas en hojas de diferentes plantas como mora (*Morus* sp.), rábano (*Raphanus* sp.), durazno (*Prunus* sp.) entre otros.

Respecto de los genotipos evaluados, los denominados como R, T y G<sub>6</sub> después de 60 días después de la inoculación (ddi) mostraron el menor índice de severidad de la enfermedad tanto con el inoculo proveniente del extracto, como con el hongo puro. Por lo cual son genotipos seleccionados para su propagación como resistentes a *P. opuntiae*.

Los genotipos G<sub>2</sub> y G<sub>7</sub> mostraron los índices más altos en la severidad de la enfermedad por los que se consideran genotipos susceptibles a *P. opuntiae* (figura 4, pág. XXX).

Específicamente en estos genotipos se observó un efecto del extracto sobre el desarrollo de síntomas, se concluye que los extractos de *P. opuntiae* obtenidos mediante el método propuesto en este estudio pueden ser utilizados para la selección de explantes resistentes a *P. opuntiae* en condiciones *in vitro*.

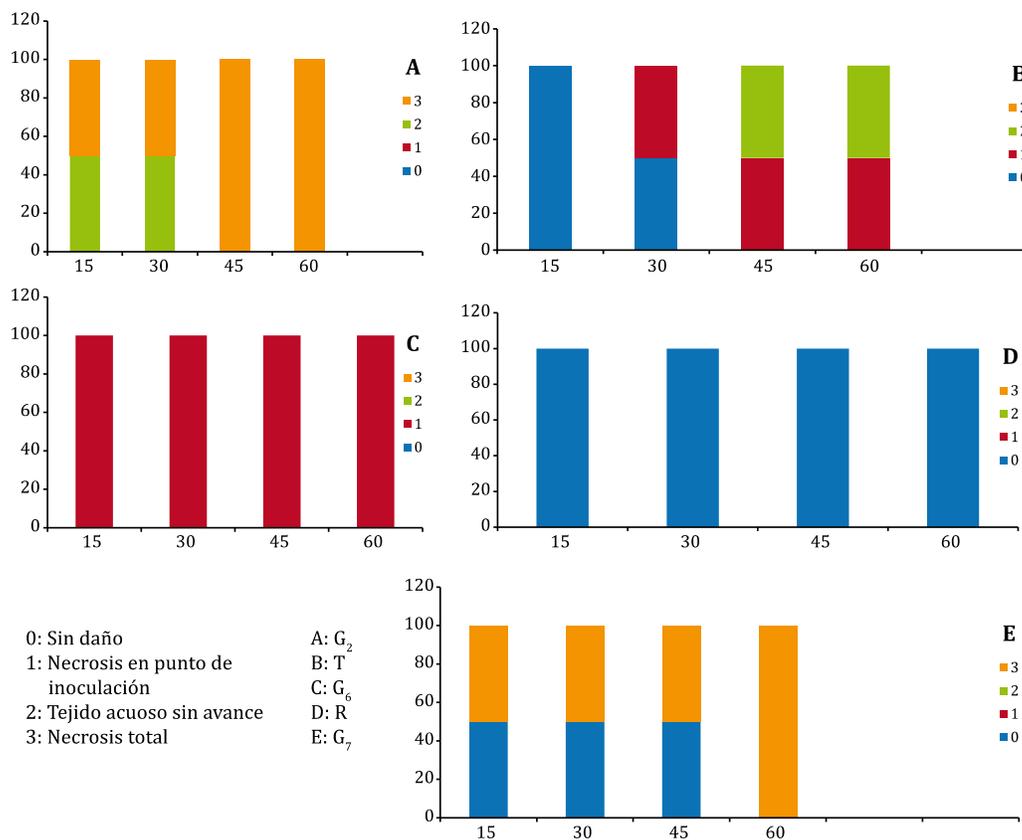
Respecto de la evolución de la severidad de la enfermedad en el tiempo se observó que el genotipo G<sub>2</sub> a los 15 ddi, el 50% de las plantas infectadas presentaban tejido acuoso sin translocación (síntoma 2), el 50% restante presentó necrosis total (síntoma 3). Estos síntomas se mantuvieron los primeros 30 d. A partir de los 45 d todas las plantas presentaron necrosis total (figura 4 A, pág. XXX).

El genotipo G<sub>6</sub> desde los primeros 15 ddi, el 100% de las plantas infectadas presentó tejido necrosado en el punto de inoculación, este síntoma se mantuvo hasta los 60 d (figura 4 C, pág. XXX).

El genotipo G<sub>7</sub> a los 15 ddi no presentó síntomas de enfermedad en el 50% de las plantas infectadas, mientras que el restante 50% presentó necrosis total (síntoma 3). A los 60 ddi todas las plantas presentaron necrosis total (figura 4 E, pág. XXX).

En el genotipo tolerante (T) los síntomas se presentaron más lentamente en los primeros 15 ddi, todos los explantes inoculados estaban sanos.

Método de selección en explantes *in vitro* de *Opuntia* sps



**Figura 4.** Evolución de los síntomas respecto al tiempo 15, 30, 45 y 60 días después de la inoculación de cada uno de los genotipos evaluados A: G<sub>2</sub>, B: T (tolerante), C: G<sub>6</sub>, D: R (Resistente), E: G<sub>7</sub>.

**Figure 4.** Symptoms evolution over time 15, 30, 45 and 60 days after inoculation of each of genotypes A: G<sub>2</sub>, B: T (tolerance), C: G<sub>6</sub>, D: R (resistant) E: G<sub>7</sub>.

A los 30 ddi el 50% de las plantas siguieron sanas, mientras que el 50% restante presentó necrosis en el punto de inoculación (síntoma 1).

Finalmente a los 45 ddi el 50% siguieron presentando síntoma 1 y el 50% restante síntoma 2. Estos síntomas se mantuvieron hasta los 60 ddi.

Por otra parte, en el genotipo resistente, ninguna de las plantas inoculadas presentó síntomas de daño por el hongo (figura 4, pág. XXX).

**CONCLUSIONES**

Se obtuvo un extracto del cultivo de *P. opuntiae*, el cual tiene actividades enzimáticas de amilasa, celulasa y proteasa, enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal.

Referente a las condiciones de infección, se observó que el sustrato (arena y perlita) no influyen en la interacción planta-patógeno.

M. J. Ochoa, L. Rivera-López, J. F. Gómez-Leyva

Después de 60 ddi la severidad de la infección fue mayor y se presentó en menor tiempo en explantes inoculados con el hongo puro por lo cual se demuestra que *P. opuntiae* tiene la capacidad de infectar explantes de *Opuntia* bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

Asimismo, se comprueba que el extracto del cultivo de *P. opuntia* tiene la capacidad de generar patogenicidad en explantes jóvenes de *Opuntia* y síntomas similares a los producidos por el hongo

puro, su efecto provoca una menor severidad en el desarrollo de los síntomas, los cuales tardan más tiempo en aparecer en comparación con el hongo.

Respecto de los genotipos evaluados, los denominados R, T y G<sub>6</sub> después de 60 ddi, mostraron menor índice de severidad de la enfermedad tanto con el inóculo proveniente de extracto, como con el hongo puro, por lo que sugiere tienen resistencia frente a *P. opuntiae*.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Arango S.; Hoyos R.; Afandor L. 2010. Actividad fitotóxica del filtrado crudo de *Colletotrichum gloeosporioides* en cardamomo (*Elettaria cardamomum*). *Tecnológicas*. 24: 41-57.
2. Ayala-Escobar, V.; Yañez-Morales M. J.; Braun U.; Groenewald J. Z.; Crous P. W. 2006. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov. the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. *Fungal Diversity*. 21: 1-9.
3. Chiotta, M. L.; Chulze, S.; Barros, G. 2015. Fuentes de inóculo de especies de *Fusarium* potenciales productoras de micotoxinas en el agroecosistema soja. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina*. 47(2): 171-184.
4. Flores Flores, R. 2012. Identificación de hongos asociados a la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) y su sensibilidad al quitosano. Tesis de Maestría, Instituto Politécnico Nacional, México.
5. Frison, E.; Orjeda, G.; Sharrock S (eds.) 1997. Proceedings of meeting held in Gosier, Guadalupe. International network for the improvement of banana and plantain. INIBAP. Montpellier.
6. García L.; Herrera, L.; Clavero, J.; Bermúdez, I.; Veitia, N.; Acosta, M. 2004. Efecto del filtrado de cultivo de *Pseudocercospora fijensis* Morelet sobre yemas adventicias de cultivares de *Musa* spp. *Bioteología vegetal*. 1: 21-25.
7. Grünwaldt, J. M.; Guevara, J. C.; Grünwaldt, E. G.; Martínez Carretero, E. 2015. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina*. 47(1): 263-282.
8. Jayasankar, S.; Litz, R. E.; Gray, D. J.; Moon, P. A. 1999. Responses of Embryogenic mango cultures and seedling bioassays to a partially purified phytotoxin produced by a mango leaf of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, *In Vitro Cell Developmental Biology Plant*. 475-479.
9. Mathew, A.; Wolf-Rainer, A.; Robert, A.; Peter, H.; Gerhard, W.; Step, H. 2009. Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological Research*. 113(1): 130-140.
10. Monda E. O.; Sanders F. E.; Hick, A. 2001. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. *Plant Pathology*. 50: 103-110.
11. Morales, L. J.; Hernández, L. 2002. Efecto de fungicidas en el control de la mancha foliar del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlaneplanta, Morelos. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo. Estado de México.
12. Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*. 15: 473-497.

Método de selección en explantes *in vitro* de *Opuntia* sps

13. Ochoa M. J.; L. Á. Rivera, R. I. Arteaga-Garibay, M. D. Martínez Peña, J. I.; Portillo, L. 2015. Black spot caused by *Pseudocercospora opuntiae* in cactus pear productive systems of Jalisco, Mexico. JPACD. 17: 1-12 p.
14. Quezada-Salinas, J.; Sandoval Islas, S.; Alvarado Rosales, D.; Cárdenas Soriano, E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) en Tlanepantla, Morelos, México. Agrociencia. 40: 641-653.
15. Quezada-Salinas, J.; Sandoval Islas, S.; Alvarado, R. D.; Moreno, M. 2013. Histopatología y patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal. Revista Mexicana de Micología. 38: 9-18.
16. Svabova, L.; Lebeda, A. 2005; In Vitro Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens, J Phytopathology. 153: 52-64.
17. Theerthagiri, A.; Ramanujam, B.; Thiruvengadam, R.; Gandhi, K.; Manikam, R.; Govindasamy, S. 2008. Production of cell wall degrading enzymes and toxins by *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata* causing fruit rot of chillies, Journal of plant protection research. 48: (4).
18. Van den Bulk, R. W. 1991. Application of cell and tissue culture and in vitro selection for disease resistance breeding a review, Euphytica. 56: 269-285.
19. Vélez-Gutiérrez, C. B.; Rodríguez-Garay, B. 1996. Microscopic Analysis of Polyembryony in *Opuntia ficus-indica*. JPACD. Vol 1: 40-48.
20. Vijayaraghavan, P.; Prakash Vincent, S. G. 2013. A simple method for the detection of protease activity on agar plates using bromocresolgreen dye J Biochem Tech. 4(3): 628-630.
21. Wolger, E.; Wallace, L.; Liu, A.; Kaper, T.; Kelemen, B. 2010. Determination of Product Inhibition of CBH1, CBH2, and EG1 Using a Novel Cellulase Activity Assay Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 161, Issue 1, p 313-317.
22. Xiao, Z.; Storms, R.; Tsang, A. 2015. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities Analytical Biochemistry.
23. Yoshida, S.; Hiradate, S.; Fujii, Y.; Shirata, A. 2000. *Colletotrichum dematium* produces phytotoxins in anthracnose lesions of mulberry leaves, Phytopathology. 90: 285-291.

## CAPITULO V

### **Análisis de la variación genética mediante marcadores moleculares ISSR de genotipos de *Opuntia* sps. con resistencia a *Pseudocercospora opuntiae***

#### **Introducción**

En México, el nopal *Opuntia* sps. tiene la mayor diversidad genética a nivel inter e intraespecífico y ha sido reconocido como el centro de origen y dispersión de éste género (Bravo-Hollis, 1978). Esta riqueza genética debe ser considerada como parte del mejoramiento y uso. La caracterización del germoplasma se ha basado tradicionalmente en caracteres fenotípicos. El conocimiento de las descripciones detalladas son necesarias en la utilización del germoplasma, debido a que en dicho material puede haber genes valiosos para los programas de mejoramiento. En el caso de nopal existen descripciones de los cultivares comerciales (Mondragón y Pérez, 1996). Erre y Chessa (2013) han estudiado la capacidad discriminantes de las variables descriptoras para proporcionar los rasgos morfológicos más importantes que deberían ser considerados como prioritarios en las colecciones. También se han utilizado descripciones parciales para algunas selecciones sobresalientes (Valdés y col., 1997), para genotipos tolerantes a heladas (Parish y Felker, 1997). Pero, el problema estriba en que la morfología puede variar debido a los efectos del ambiente y son comunes los errores de apreciación en los descriptores, sobre todo en relación a los caracteres cualitativos. Respecto a la caracterización molecular y proteica de genotipos en *Opuntia* se han realizado diferentes trabajos, Chessa y col. (1997) reportaron la descripción de nopales italianos por medio de isoenzimas. Solamente las enzimas malato deshidrogenasa y fosfoglucoisomerasa en preparaciones de polen fueron importantes para la discriminación de los grupos. Los patrones de bandas obtenidos permitieron la definición de varios grupos asociados con el origen geográfico de las colectas, pero únicamente los biotipos de Cerdeña fueron discriminados por el color de fruto. Mediante el uso de electroforesis utilizado por Uzun (1997) en Turquía, se probaron siete sistemas enzimáticos, no se encontró variación. El germoplasma de Turquía probablemente sea de una base genética más limitado que el italiano. Ambos habrían sido originados de las plantas introducidas de México después del siglo XVI (Barbera, 1995).

La identificación de cultivares puede ser realizada con las huellas de ADN, especialmente en genotipos con alta variación genética entre cultivares y muy poca dentro del cultivar. Esto también aplica para el caso de isoenzimas. Tales ejemplos son encontrados en plantas de propagación vegetativa derivados de especies de polinización cruzada como la mayoría de los frutales (Nelson y col., 1994).

El nopal, tiene dentro de sus problemas fitosanitarios la “mancha negra” ocasionada por el hongo *Pseudocercospora opuntiae* que ha devastado en algunos lugares del país las plantaciones (Quesada-Salinas y col., 2006). Trabajos recientes han reportado la selección de plantas de *Opuntia* con resistencia a la mancha negra, cuyas diferencias moleculares entre los genotipos susceptibles y resistentes no han sido identificadas (Ochoa y col., 2015); por lo que la utilización de marcadores genéticos podría ser una herramienta útil para detectar dichas diferencias en la población de estudio.

Los marcadores genéticos revelan polimorfismos a nivel del ADN, que con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), han desarrollado una gran cantidad de marcadores moleculares, con lo que se ha revolucionado ampliamente la apreciación de la genética vegetal en la última década. Estudios relacionados con la diversidad genética del género *Opuntia* se han llevado a cabo, utilizando SSR (Secuencias Simples Repetidas) (Chessa y col., 2013), AFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados) (Labra y col., 2003), ITS (Espaciador Interno Transcripto) (Griffith, 2004), RAPD (Polimorfismo del ADN Amplificado al Azar) (Mondragón-Jacobo, 2003; Zoghalami y col., 2007), microsatélites (Caruso y col., 2010) e ISSR (Secuencia Repetida Inter Simple) (Valadez-Moctezuma y col., 2014). Los ISSR, son marcadores genéticos que nos permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsatélites que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples (CT)<sub>n</sub> o (CA)<sub>m</sub>, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucariota. Los ISSR tienen ventajas sobre otros marcadores, tales como a) amplifican con temperaturas de alineación astringentes (Wolfe y Liston 1998), b) son altamente sensibles y reproducibles, c) segregan de manera mendeliana y d) su costo es bajo (Nagaoka y Ogihara 1997). El objetivo del presente trabajo fue encontrar diferencias genéticas entre los genotipos de *Opuntia* sps. seleccionados como resistentes y susceptible

a la enfermedad “mancha negra” (*Pseudocercospora opuntiae*) a través de los marcadores ISSR.

### **Materiales y métodos**

El material vegetal utilizado fue obtenido de semillas de los cultivares que se identificaron como “Amarillo Platano” (AP), “Reyna” (Ry) y G<sub>2</sub> también se utilizaron cladodios seleccionados a partir de pruebas de patogenicidad en invernadero y a campo denominados como resistente (R), tolerante (T) y susceptible (S) a *P. opuntiae*. Los genotipos evaluados pertenecen al género *Opuntia* sps. asimismo se utilizó material vegetal del subgénero *Nopalea*, como control positivo en la amplificación de los ISSR.

Los materiales utilizados fueron multiplicados *in vitro* por proliferación de yemas. Se utilizaron cuatro individuos por cultivar.

### **Extracción de ácido desoxiribonucleico (ADN).**

La obtención y purificación de ADN fue de acuerdo a los métodos propuestos por Taylor y Lee (1990) (Anexo 6). Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico de Tlajomulco.

### **Electroforesis en geles de agarosa.**

La integridad del ADN se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa Invitrogen® Cat. n° 16500-500 al 1 %. La carga del gel se realizó con 5 µL de ADN. Se corrieron a 100 V en cámara de electroforesis (BIO-RAD®) durante 60 min. El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg·mL y se visualizó en un transiluminador.

### **Amplificación de ADN con marcadores moleculares ISSR.**

El ADN extraído de las muestras se analizó con base en ISSR, las condiciones de amplificación se llevaron a cabo en termocicladores Select Bio Products® modelos PCR Select Cycler 2400 y 9700, con un volumen final de 12.5 µL, se utilizaron 3 µL (20 ng) de ADN, 1 µL de cada ISSR, 1.25 µL de solución amortiguadora PCR 10X, 1 µL (25 mM) de MgCl, 0.25 µL de dNTPs y 0.25 µL de Taq polimerasa (Promega®). El programa de amplificación en PCR consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 4 min, seguida

de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 50-55 °C (dependiendo del oligonucleótido) por 50 S, 72 °C por 2 min, luego 72 °C por 5 min y ciclo final de 4 °C.

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los ISSR fueron los siguientes: (AG)<sub>8</sub>YC, G(AG)<sub>7</sub>AC, (GA)<sub>8</sub>T.

**Electroforesis en geles de agarosa.** Cada una de las muestras de los productos de PCR–ISSR fueron analizadas en un carril del gel de agarosa al 1.2 % a 100 V durante 90 min en cámara de electroforesis BioRad®. Se utilizó un marcador de 3000 pb y otro de 700 pb. El gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg.mL y se visualizó en un transiluminador.

### **Análisis estadístico**

Con el objeto de interpretar los patrones de bandas en el gel de agarosa generados por los fragmentos amplificados en PCR, éste se digitalizó para facilitar la lectura de las bandas. La presencia de una banda en una línea en particular, se consideró con el número 1 y la ausencia con el número 0. De esta forma se estructuró una matriz en código binario, cuyos datos se usaron para formar dendrogramas, luego fueron evaluados mediante análisis multivariados con agrupamiento promedio (UPGMA). Se utilizó el índice de Jaccard, ya que de acuerdo a Reif y col., (2005), éste coeficiente de similaridad, es el que mejor permite definir las propiedades genéticas en interacción con el modelo matemático de dichos coeficientes, con lo que se extrae la máxima cantidad de información de los datos genéticos. El programa usado para analizar la matriz fue NTSYS 2.11 (NTsys Software Development & IT Management, Ltd.), así como el paquete Statgraphics Plus 4.0 (Statistical Graphics Corp.) que se utilizó para ejecutar parte de los análisis estadísticos.

### **Resultados y discusión**

#### **Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)**

Las extracciones de algunas muestras se realizaron tres veces, ya que la cantidad y calidad del ADN no fue suficiente para llevar a cabo los análisis con marcadores moleculares, esta deficiencia se detectó al momento de realizar las lecturas en espectrofotómetro a longitud de onda del cociente 260/280 nm obteniéndose un valor de 3, mientras que el rango de 1.8-2.0 se considera un ADN puro. Esto coincide con lo reportado por Mondragón-Jacobo

(2000) y Arnholdt-Schmitt y col., (2001), debido a la cantidad de carbohidratos presentes en *Opuntia*, el cual provoca la gelificación de la muestra dificultando la centrifugación y la separación de la pastilla de ADN.

### Análisis de ADN con marcadores moleculares.

Todos los materiales estudiados con la técnica del marcador de ISSR produjeron suficientes bandas polimórficas, pero no con todas las combinaciones de oligonucleótidos, lo cual es común en los trabajos de análisis con marcadores moleculares, ya que los oligonucleótidos ubican secuencias distintas de ADN (Luna-Paez y col., 2007).

La figura uno, muestra el comportamiento encontrado con dos oligonucleótidos:  $(AG)_8 YC$  y  $G (AG)_7 AC$  de los 22 diferentes oligonucleótidos ISSR utilizados, éstos tuvieron el mejor desempeño para producir un alto número de bandas en *Opuntia*. El número de fragmentos generados con los oligonucleótidos seleccionados fué de una amplitud de 5 a 25 loci. El tamaño de las bandas varió entre 200 y 2500 pares de bases (Pb).

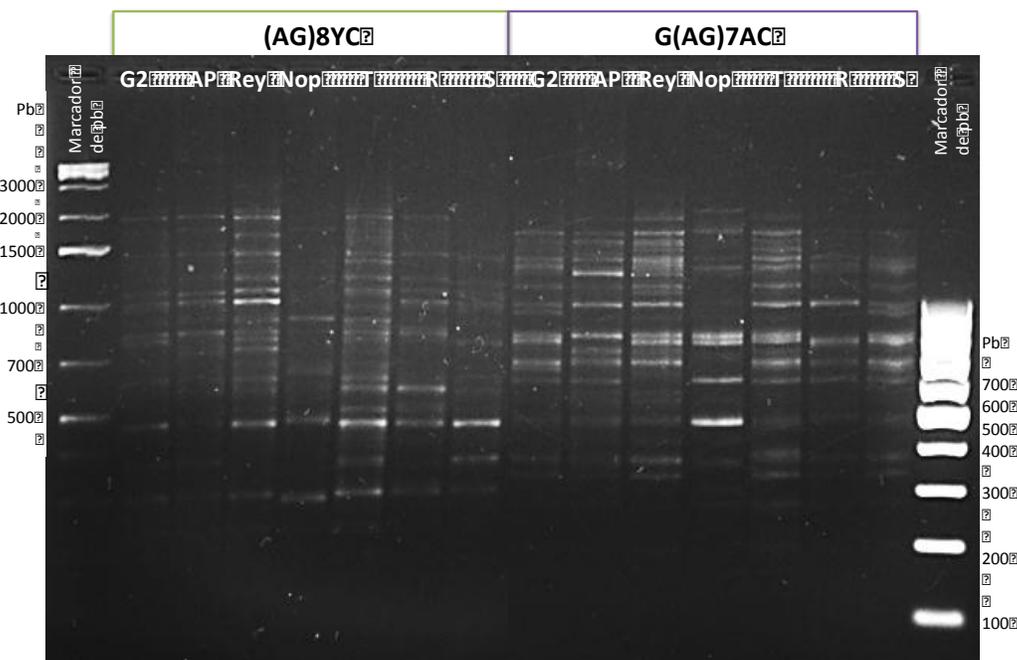


Figura 1 Productos de amplificación con los oligonucleotidos  $(AG)_8 YC$  y  $G (AG)_7 AC$  en gel de agarosa al 1,2 % : genotipo 2 G<sub>2</sub>, Amarillo Plátano (AP), Reyna (Ry), *Nopalea* (Nop), tolerante (T), resistente (R) y susceptible (S).

### Análisis genético

Se obtuvo un dendrograma con la técnica de agrupación de la media aritmética no ponderada (UPGMA) para poder observar las diferencias existentes entre la distancia  $\chi^2$  y las otras distancias. El dendrograma muestra la distancia taxonómica media en la cual se puede observar una bifurcación inicial de por lo menos cuatro agrupaciones (Figura 2).

Al no contar con una prueba de partición para obtener una altura de corte más estricta, no se tiene certidumbre de dónde cortar, por lo que el criterio del investigador es fijarlo arbitrariamente, por lo que se decidió hacerlo a 0.67 (línea punteada) para formar los cuatro grupos, que coinciden perfectamente con el análisis de componentes principales ACP (Figura 3) lo que confirma la correcta formación de grupos. El primer grupo formado por los genotipos T (identificado como tolerante) y Ry proveniente de semilla (Figura 2). El segundo grupo se conforma por cuatro genotipos AP, G<sub>2</sub>, S y R que a su vez se subdivide en dos subgrupos en el primero se encuentran los genotipos AP, G<sub>2</sub> provenientes de semillas y el segundo conformado por los genotipos S y R seleccionados a partir de pruebas de patogenicidad, en un tercer grupo se encuentra el subgénero *Nopalea*.

El comportamiento genómico que mostraron los genotipos evaluados con ISSR sugiere que los genotipos evaluados comparten ciertos rasgos fenotípicos comunes (Luna-Paez y col., 2007). En relación a los genotipos provenientes de semilla, se podrían considerar en el comportamiento de estos cultivares, es la posibilidad de recombinación genética.

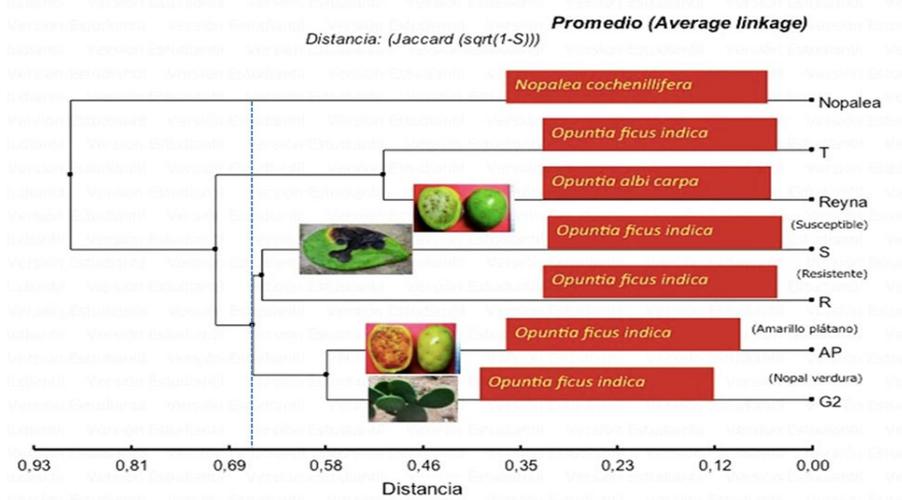


Figura 2 Dendrograma generado con los oligonucleótidos (AG)<sub>8</sub> YC y G (AG)<sub>7</sub> AC ISSR para los genotipos T (tolerante), Ry, R (resistente), AP, G<sub>2</sub>, S (susceptible) y *Nopalea* evaluados.

A partir de la matriz de distancias genéticas de Jaccard se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para determinar las principales tendencias de variación de las poblaciones. En el análisis de los componentes principales mostró divergencias entre los materiales de *O. ficus-indica* (L.) Miller, evaluados (Figura 3); la variación observada fue del 63% de acuerdo con los parámetros del CP1 y CP2. Los resultados obtenidos son similares a los encontrados en el dendrograma; también en éste análisis se presenta la agrupación de los genotipos evaluados. De acuerdo con el dendrograma, existe una mínima variación genética entre los genotipos susceptibles (S) y resistentes (R) a *P. opuntiae*, ambos genotipos se ubican en un mismos grupo.

Una realidad tangible en el cultivo de opuntias, es que en la práctica los productores han reducido la propagación sexual que puede darse en las especies cultivadas, debido al tiempo que demanda llegar a su madurez, sin embargo en éste estudio el empleo de genotipos provenientes de semilla muestra diferencias genéticas respecto a los genotipos de reproducción vegetativa, Chessa (2010) reportó que *O. ficus-indica* es uno de los cultivos con más bajo nivel de polimorfismo (mediante marcadores moleculares RAPD), ya que encontró 39 plantas isogénicas en una muestra de 40. Sin embargo, se pueden presentar algunas contradicciones, lo que indica que los diferentes marcadores moleculares cubren diferentes regiones del genoma de la especie, variando en el tamaño y número de bandas (Infante y col., 2006).

Las muestras de *Opuntia* presentan un patrón de bandeo similar, debido al sistema de reproducción asexual reflejando una alta homogeneidad genética (Figura 1).

Los marcadores ISSR resultaron de utilidad discreta para diferenciar poblaciones de *Opuntia* estrechamente relacionadas por lo que demuestran ser una herramienta molecular mas para el estudio de diversidad genética en poblaciones cultivadas de *Opuntia* cuyas diferencias se relacionan con caracteres morfológicos.

El subgénero *Nopalea* se ubicó en el análisis de las componentes principales, muy distante de *Opuntia*, así como Tolerante (T) y Reyna (Ry), que se separan del resto de los genotipos especialmente del susceptible (S) a mancha negra éstos resultados preliminares sugieren tener en cuenta estos genotipos para una posterior selección (Figura 3). El análisis de componentes principales es un método para la extracción del espacio factorial. A partir de

la representación de los “n” individuos como “n” puntos en un espacio p-dimensional, se extraerá un nuevo espacio p-dimensional.

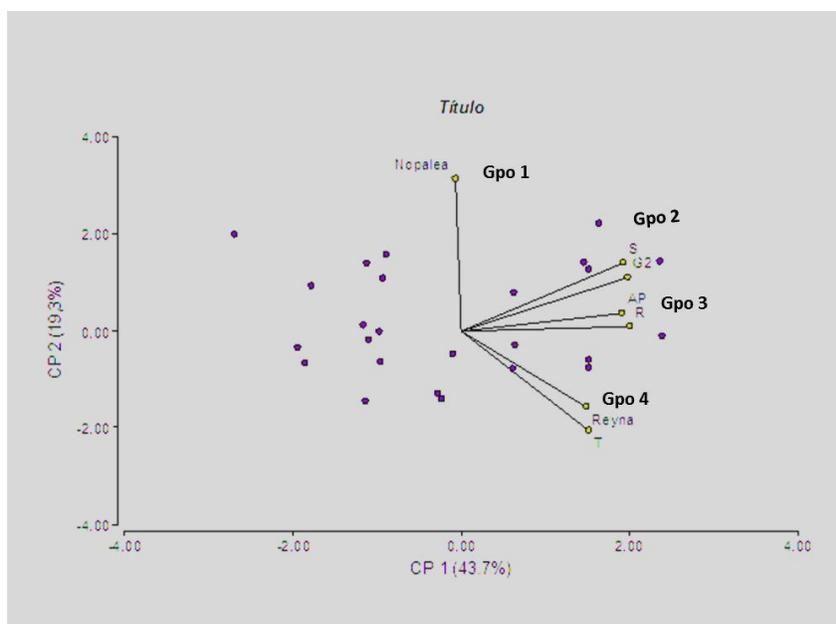


Figura 3 Análisis de los componentes principales derivado de los productos amplificados con los oligonucleótidos  $(AG)_8$  YC y  $G(AG)_7$  AC ISSR para los genotipos: T (tolerante), Ry, R (resistente), AP,  $G_2$ , S (susceptible) y *Nopalea*.

De acuerdo a Felker (com. pers.) mientras se estudian cultivares o variedades con enormes diferencias entre ellos, o con sus progenies, los marcadores funcionan bien, sin embargo dentro de la categoría cultivares no se pueden distinguir las diferencias, aunque se pueden ver algunas correlaciones morfológicas (Erre y Chessa, 2013). Esto corrobora lo propuesto por Chessa (2010) que desde hace muchos años se hicieron selecciones sobre estos cultivares y algunos caracteres son producto de dicha selección llevada a cabo por los productores (Pimienta y Urias, 1995), como los cladodios sin espinas o los colores de fruto.

### Conclusiones

Los perfiles de ADN detectados con los marcadores ISSR permitieron diferenciar los genotipos evaluados.

El análisis de agrupamiento (dendrograma) y de componentes principales (ACP) con los marcadores ISSR permitieron determinar la variabilidad genética, mostraron que existe un agrupamiento entre el genotipo S y R.

Se demuestra que los marcadores ISSR son útiles para diferenciar cultivares de especies diferentes en apoyo a los aspectos taxonómicos.

No existe una relación directa entre los grupos y la relación taxonómica, ya que se emplearon regiones microsátélites que en este caso permitió determinar la variabilidad genética entre los diferentes individuos de *O. ficus-indica* (L.) Miller.

### Literatura citada

- Arnholdt-Schmitt B., L. Coe Girão, R. M. Llamoca-Zárate, y F. A. P. Campos. 2001. Genome Characterization of *Opuntia ficus-indica*: a simple and efficient micromethod Journal of the Professional Association for Cactus Development. 4: 57- 65.
- Barbera, G. 1995. Historia. In: Agroecología, Cultivo y Usos del Nopal. Barbera G. Inglese P. y Pimienta Barrios E. (eds.). Estudio FAO Producción y Protección Vegetal 132. Roma.
- Bravo-Hollis, H. 1978. Las cactáceas de México. Universidad Autónoma de México. México, D.F. 743.
- Caruso, M., S. Currò, G. Las Casas, S. La Malfa, y A. Gentile. 2010. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus-indica* cultivated genotypes and their relation with related species. Plant System Evolution. 290: 85- 97.
- Chessa, I., G. Nieddu, P. Serra, P. Inglese, y T. La Mantia 1997. Isozyme characterization of *Opuntia* species and varieties from Italian germplasm. Acta Horticulturae. 438: 45- 52.
- Chessa, I. 2010. Cactus pear genetic resources conservation, evaluation and uses. FAO CACTUSNET Newsletter, Special issue. 12: 45- 53.
- Chessa, I., P. Erre, M. Barbato, J. Ochoa, G. Nieddu. 2013. Polymorphic microsatellite DNA markers in *Opuntia* spp. collections. Acta Horticulturae. 995: 35- 42.
- Erre P. e I. Chessa. 2013. Discriminant analysis of morphological descriptors to differentiate the *Opuntia* genotypes. Acta Horticulturae. 995: 45- 50
- Griffith, M. P. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. American Journal of Botany. 91: 1915-1921.

- Labra, M., F. Grassi, M. Bardini, S. Imazio, A. Guiggi, S. Citterio, E. Banfi y S. Sgorbati. 2003. Genetic relationships in *Opuntia* Mill. genus (Cactaceae) detected by molecular marker. *Plant Science*. 165: 1129- 1136.
- Lee, S. B. y J. W. Taylor. 1990. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* (M. A. Innis D. H. Gelfand, J. J. Sinisky and T. J. White, eds: 282-287. Academic Press, San Diego.
- Luna-Paez, A., E. Valadez-Moctezuma, A. F. Barrientos-Priego y C. Gallegos-Vázquez. 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*. 43- 59.
- Mondragón-Jacobo, C. y S. Pérez González. 1996. Native cultivars of cactus pear in México. 446-450. In: *Progress in New Crops*. Janick J. (ed.) ASHS Press. Arlinton, V. A. USA.
- Mondragón-Jacobo, C., N. Doudareva y B. Bordelon. 2000. DNA extraction from several cacti. *Hort Science*. 6: 1121- 1126.
- Mondragón-Jacobo, C. 2003. Molecular characterization using RAPDs of a cactus (*Opuntia* spp. Cactaceae) collection from central México as a basis for plant breeding. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 1: 97- 114.
- Nagaoka, T. y Y. Ogihara. 1997. Applicability of inter simple sequence repeat polymorphism in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 94: 597- 602.
- Nelson, R. J., M. R. Baraoidan, C. C. M. Vera, I. V. Yap, J. E. Leach, T. W. Mew y H. Nyboon. 1994. Relationship between phylogeny and pathotype for the bacterial blight pathogen of rice. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 3275-3283.
- Parish, J. y P. Felker. 1998. Fruit quality and production of cactus pear (*Opuntia* spp.) fruit clones selected for increased frost hardiness. *Journal of Arid Environments*. 37: 123- 143.
- Pimienta Barrios, E. y A. Muñoz-Urias. 1995. Domesticacion de opuntias y variedades cultivadas, pp. 61-67. In: *Agroecología Cultivo y Usos del Nopal*. Estudio Producción y Protección Vegetal 132. Barbera G., Inglese P. y Pimienta Barrios E. (eds.). FAO. Rome.
- Quezada-Salinas, J., S. Sandoval Islas, D. Alvarado Rosales, y E. Cardenas Soriano. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) en Tlanepantla, Morelos, México. *Agrociencia*. 40: 641- 653.

- Reif, J. C.; A. E. Melchinger y M. Frisch. 2005. Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Science*. 1: 1- 7.
- Valadez-Moctezuma, E., S. Samah y A. Luna-Paez. 2014. Genetic diversity of *Opuntia* spp. varieties assessed by classical marker tools (RAPD and ISSR). *Plant System Evolution*. 1- 11.
- Valdés C., R. D., C. Gallegos y M. F. Blanco. 1997. Análisis multivariado de once variedades de nopal tunero. Atributos de crecimiento. Memorias del VII Congreso Nacional y V Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del nopal. Monterrey, México. 120- 12.
- Uzun, I. 1977. Fruit and cladode isozymes in cactus pear. *Acta Horticulturae*. 438: 45-53.
- Wolfe, A. D. y A. Liston. 1998. Contribution of PCR based methods to plant systematic and evolutionay biology en D. E. Soltis, P.S. Soltis, y J.J. Doyle (eds.), *Molecular systematics of plants*. Kluwer Academic Publishers, EUA. 43- 86.
- Zoghlami, N., I. Chrita, B. Bouamama, M. Gargouri, H. Zemni, A. Ghorbel y A. Mliki. 2007. Molecular based assessment of genetic diversity within Barbary fig (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill.) in Tunisia. *Scientia Horticulturae*. 113: 134-141.

## CAPITULO VI

### **Resistencia en nopal (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) contra *Pseudocercospora opuntiae* mediada por la actividad de la $\beta$ -1,3- glucanasa y compuestos polifenólicos en cladodios**

Se demuestra por primera vez la acción combinada de los polifenoles y la  $\beta$ -1,3-glucanasa en cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller que contribuyen a la resistencia contra *Pseudocercospora opuntiae*. La actividad de ésta enzima y el perfil fitoquímico pueden utilizarse como un criterio para predecir y detectar en el germoplasma de nopal con resistencia a la mancha negra.

Este capítulo será enviado a *Scientia Horticulturae*, a continuación se incluye el artículo.

**Resistance of cactus pear *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller against *Pseudocercospora opuntiae* through  $\beta$ -1,3 glucanase activity and polyphenolic compounds in cladodes**

Ochoa M. J.<sup>a,b,c</sup>, Rivera-López L.A.<sup>b</sup>, González-Flores L. M.<sup>b</sup>, Cruz-Rubio J. M.<sup>b</sup> Rodríguez, S.<sup>d</sup>, Nazareno M. A.<sup>d</sup>, Gómez-Leyva J F.<sup>b\*</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Agronomía y Agroindustrias, Universidad Nacional de Santiago del Estero, Avda. Belgrano (S) 1912 (4200), Santiago del Estero, Argentina.

<sup>b</sup>Instituto Tecnológico de Tlajomulco, Km 10 Carretera a San Miguel Cuyutlán, Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco. 45640. México.

<sup>c</sup>Universidad de Guadalajara, Km 15.5 Carretera Guadalajara-Nogales, Zapopan, Jalisco 45101, México.

<sup>d</sup>CITSE-CONICET-UNSE, RN 9 Km 1125, Santiago del Estero, Argentina.

Corresponding Autor: [jfgleyva@hotmail.com](mailto:jfgleyva@hotmail.com)

**Abstract**

The "black spot" disease, caused by the fungus *Pseudocercospora opuntiae*, is one of the main phytosanitary problems of cactus, *Opuntia* sps. Through mass selection one cultivar of *O. ficus-indica* (L.) Miller resistant to colonization by *P. opuntiae* was identified. The ethanolic extract of resistant cladodes showed higher levels of total condensed tannins, flavonoids and polyphenols than those of the susceptible ones, generating 93 % inhibition of *P. opuntiae* conidial germination *in vitro*. The total protein profile by SDS-PAGE showed differentially expressed proteins in the range of 20 to 45 kDa in the resistant genotype with an activity of  $\beta$ -1, 3-glucanase 300 % greater than the susceptible genotype. This increased activity was able to inhibit 90 % the germination of conidia, similar effect to that of the fungicide Captan® (N-trichloromethylthio-4-cyclohexene-1, 2-dicarboximide). It was shown, for the first time, that the combined action of *Opuntia* polyphenols and  $\beta$ -1, 3-glucanase contribute significantly to the resistance against *P. opuntiae*. The activity of this enzyme and the phytochemical profile can be used as a criterion to predict and detect *Opuntia* germplasm with resistance to black spot.

**Keywords:** Pathogenesis-related-proteins (PR),  $\beta$ -1, 3-glucanase, protein extract, cactus pear, phenolic compounds, *Opuntia* sps.

## Introduction

In the 1990's a new disease was detected in Mexican cactus pear fields. It was named "black spot", and its causing agent was found to be *Pseudocercospora opuntiae* (Ayala-Escobar *et al.*, Quezada-Salinas *et al.*, 2006, Ochoa *et al.*, 2015). The severity and epidemiology of this disease is on the rise, as the cactus pear is asexually reproduced, causing a loss in genetic diversity (Méndez-Gallegos *et al.*, 2008). Of the different diseases affecting cactus pear, the black spot is amongst one of the greatest concern, reducing vegetative growth and yield in all production systems and causing large economic losses (Quezada-Salinas *et al.*, 2006).

Up-to-date, the most effective forms of control of this disease are the use of resistant varieties of *Opuntia*, as well as the application of preventive measures (i.e. removing the infected cladodes from the plantation fields). *P. opuntiae* resistant genotypes have been found by sampling in several commercial plantations in Jalisco state, Mexico; however, the cause of this resistance is yet unknown (Ochoa *et al.*, 2015).

*Pseudocercospora* genus invades the intracellular spaces, and in leaves, the infection advance through the stomata (Monda *et al.*, 2001). It is known that this pathogen releases a diffusible product (most likely a toxin) that damages the chloroplast and plasmatic membranes causing both chlorosis and necrosis. This damage grants the fungus access to the host's nutrients. The formation of stomata after the destruction of the host's cells allows for the survival of the fungus, remaining inactive until favorable conditions for sporulation occur (Monda *et al.*, 2001).

Recent studies report that *P. opuntiae* develops in the epidermis of the collenchyma and chlorenchyma. After 111 d of infection, the hyphae extend to the storage parenchyma, vascular bundles and medullary parenchyma. After 122 d, plasmolysis in the collenchyma and chlorenchyma occurs, as well as destruction of the chloroplasts in the substomatal cavity and the formation of stomata begins (Quezada-Salinas *et al.*, 2013).

The resistance of plants to disease is often resulting from the interaction of specific resistance genes in the plant with the corresponding avirulence genes in the pathogen (García and Lozoya 2004). This resistance genes code for different groups of proteins related to the defense against pathogens. Among these are the pathogenesis-related proteins (PR), which degrade the cell wall of the invading pathogen. These enzymes include  $\beta$ -1, 3-

endoglucanases and chitinases, which are promoted in infectious processes (van Loon *et al.*, 2006). These enzymes are induced by different kinds of pathogens and abiotic stresses. There is little information available regarding the resistance to biotic factors in *Opuntia*. In *Cactacea*, Treviño *et al.* (2012) reported the antifungal activity of methanolic extracts of *Stenocereus pruinosus* and *Echenocereus stramineus* on dermatophyte fungi. In *Opuntia*, Sharavana *et al.* (2013) reported the antibacterial and antifungal activity of methanolic extracts of *O. dillenii* against *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, *Monilia fruticola*, *Auricularia polytricha*, *Chaetomella raphigera* and *Athorobotrys olibospora*. Bergauoi *et al.* (2007) found that the chemical composition of extracts of flowers, fruits and especially the cladodes of *O. macrorhiza* have an effect against *Alternaria solani*. In a similar study, Silva-Hughes *et al.* (2015) reported the antifungal activity of endophyte fungi extracts associated with *O. humifusa*, in which the presence of fatty acids is responsible for the antifungal activity.

Recently, the activities of chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase and lignin content in mango (*Mangifera indica* L.) leaves were related to the resistance to flower malformation. Ebrahim *et al.*, (2011) revealed that the chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase activities in leaves correlated to disease resistance. Therefore, the chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities are very likely to contribute to disease resistance, and as such, their presence can be used as criteria to predict and detect resistant germplasm.

$\beta$ -1,3-glucanases have also been related to resistance to *Pseudocercospora*. *Arachis hypogaea* plants were transformed with a gene for  $\beta$ -1,3-glucanase, coding for a 38 amino acid protein (38.8 kDa), and showed resistance to *Cercospora personata* (Sunderesha *et al.*, 2010; Qiao *et al.*, 2014). In *Beta vulgaris* inoculated with chitosan in order to induce defense mechanism,  $\beta$ -1,3-glucanase accumulated, and with it, the damage caused by *Cercospora beticola* diminished (Felipini and Di Piero, 2013).

It is well known that plants synthesize a variety of secondary metabolites, biological active compounds, in their tissues. Some have antifungal properties that stop or inhibit the mycelia growth and/or inhibit the germination, or reduce the sporulation of pathogenic fungi. Each metabolite group has different action mechanisms; for example, the toxicity of polyphenols to microorganisms is attributed to enzymatic inhibition by oxidation mechanisms. The main function of polyphenols is related to the defense of plants against

pathogen attack. The resistance can come from the bactericide or antifungal properties of the polyphenol itself, or by the generation of oxidation products of these (quinones and melamines), with marked antimicrobial characteristics (Mesa *et al.*, 2004; Osorio *et al.*, 2010).

Pectins, carotenes, betalains, ascorbic acid and quercetin and its derivatives have been found in the fruit of *O. ficus-indica*. The antioxidant effects and its benefits to human health of these compounds have been extensively studied (Coria-Cayupán *et al.*, 2011). However, they have not been related to benefits to the plants itself or against its pathogens. Quezada-Salinas *et al.* (2013) observed the presence of polyphenols in response to the invasion of *Pseudocercospora*.

With this background, we studied the antifungal properties of resistant (R) and susceptible (S) genotypes of *O. ficus-indica* to *P. opuntiae* by the determination of the  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase activity and total content of phenolic compounds, flavonoids and tannins in the cladodes of cactus pear.

## **Materials and Methods**

### **Chemical materials**

The 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH•) was purchased from Aldrich ®. All other reagents (potassium persulphate, borate sodium, methanol, acetic acid, hydrochloric acid and chloroform). Folin- Ciocalteu's phenol reagent was obtained from Sigma ®.

### **Biological material**

*Pseudocercospora opuntiae* was obtained from commercial plantations in Jalisco state, Mexico (Ochoa *et al.*, 2015). The inoculum used was prepared from colonies grown in 2 % malt extract medium (MEA) after 60 d of growth. The conidial solution was standardized to  $1 \times 10^6$  conidia/mL.

### **Ethanollic extract preparation**

Cladodes of *O. ficus-indica* (L.) Miller were chosen by field selection and based in previous pathogenicity studies (twice inoculated with the pathogen). They were categorized as resistant (R) or susceptible (S) according to the method of Daub *et al.*, (1986). The cladodes

were superficially disinfected and dried at  $40\pm 2$  °C (Fisher Scientific Termostato de a  $40\pm 2$  °C). Once dried, they were ground to a fine powder. 10 g of dry matter were mixed with ethanol 70 % v/v in a 1:10 relation (w/v) and kept in constant agitation for 48 h. The mixture was filtered and the filtrate was concentrated by evaporation of the ethanol in a rotary evaporator at 40 °C (Rotary evaporator Büchi R-210). The aqueous concentrate was filtered (0.25 µm) millipore and lyophilized.

### **Determination of bioactive substance contents**

#### **Extract Preparation**

Amounts of 200 mg of the lyophilized cactus cladode samples were extracted with 10 mL of methanol as solvent using a tissue homogenizer. The plant extract was placed in an ultrasound bath for 10 min; afterwards it was centrifuged at 10,000 rfc for 10 min. The supernatant was separated and the residue was extracted again repeating the procedure. Both methanolic extracts were combined and taken to a final volume of 20 mL.

#### **Determination of total phenolic content**

Total phenolic compound content was determined by the Folin Ciocalteu (FC) method (Singleton and Rossi, 1965). This method is based on a spectrophotometric determination after a colorimetric redox reaction. The Folin's reagent consists in a mixture of phosphotungstic and phosphomolybdic acid, which is reduced by reaction with phenolic compounds. An aliquot of 0.1 mL of extract was placed in a test tube and mixed with 0.65 mL of Folin-Ciocalteu reagent, and 3.15 mL of 20 % sodium carbonate solution. Final volume was adjusted to 5 mL with distilled water. Reaction tubes were heated at 50 °C for 10 min. The absorbance was recorded at 725 nm. Gallic acid (GA) was used as reference compound for calibration purposes. Results were expressed as gallic acid equivalents in mg/g of dried plant sample.

#### **Total flavonoid content**

Total flavonoid contents in the samples were determined by using the aluminum chloride colorimetric method (Mabry *et al.*, 1970). It is based on the complex formation between flavonoids and the aluminum ions intensifying absorbance at 425- 428 nm. An aliquot of 1

mL of the extract was mixed with 1 mL of 2 %  $\text{AlCl}_3$  solution in (95:5) methanol-acetic acid and taken to a final volume of 25 mL with ethyl acetate–acetic acid and methanol (40:3:57) mixture. After 30 min, absorbance was measured at 428 nm. Results were expressed as mg of flavonoids/g of sample using quercetin as reference compound.

#### **Determination of total condensed tannins**

Condensed tannins can be degraded in butanol in acidic conditions producing colored anthocyanin type compounds. In a test tube, 200 mg of plant material were placed and 10 mL of a butanol-HCl (95:5) mixture was added and homogenized using a tissue disrupter. The solution was heated 95 °C for 60 min. Then let cool to room temperature, transferred to a flask and brought to final volume of 10 mL with butanol. Determinations were performed by measuring the absorbance at 550 nm using cyanidin-3-glucoside as a reference compound whose ( $\epsilon = 26,900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) at this wavelength (Kuskoski *et al.*, 2005).

#### **DPPH• scavenging activity**

The ability of lyophilized opuntia extract to scavenge DPPH radical was determined according to Brand-Williams *et al.* (1995). Typical procedure consisted of adding an aliquot of the sample to a cuvette containing 3 mL of c.a. 85  $\mu\text{M}$  (absorbance at 515 nm equal to 1.00) DPPH• methanolic solution. Reaction progress was monitored by UV–Vis spectrophotometry by measuring the absorbance at 515 nm in 30 s cycles for 10 min. Radical consumption was expressed as percentage of antiradical activity (ARA) as proposed by Burda and Oleszek (2001) and calculated according to the following Eq. 1:  $\text{ARA} = 100 \times (1 - A_{ss}/A_0)$  (1) where  $A_0$  is the absorbance of the DPPH• solution before adding the antioxidant and  $A_{ss}$  is the absorbance at the steady state estimated by mathematical fitting of the kinetic curves. Percentages of radical consumption for different antioxidant concentrations were measured. IC50 values correspond to the antioxidant concentration that scavenges the 50 % of the radicals. They were determined from at least five concentration points of the sample.

#### **Extraction and fraction of protein**

Cladodes were washed with distilled water. The material was diced and placed in a food processor with extraction buffer at 4 °C (sodium phosphate 40 mM, pH 6.2 + PMSF 1mM

+ EDTA 7.5 mM + 0.25 % ascorbic acid and 0.025 % NaN<sub>3</sub>) in a 1:4 w/v relation. The mixture was processed for 10 min, and then left at 4 °C for 4 h with occasional stirring. The solution was filtered and centrifuged for at 16,400 rfc for 40 min and 4 °C. The supernatant was precipitated in three fractions: 0-100 %, 0-40 % and 40-70 % with ammonium sulfate (Bonner, 2007). After 12 h, the solution was centrifuged and the precipitate was suspended in 20 mL of phosphate buffer (10 mM pH 6.6) and dialyzed against distilled water. The membrane used had a MWCO of 6-8000 kDA (Spectra). Protein concentration was found by Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

### **Identification of proteins in SDS-PAGE**

SDS-PAGE was performed according to the method of Laemmli (1970) using a gel plate unit II Bio-Rad Mini-protean. Gel 4 to 12 % (0.75 mm thick), was used as the stacking and separating gels, respectively. The samples were diluted in Laemmli buffer with 2- $\beta$ -mercaptoethanol and heated at 95 °C before charging. The gels were run at 100 V for 90 min at room temperature. Low molecular weight standard mass proteins were used to determine the molecular mass. The gel was stained with silver nitrate. The digitized image of the gel was analyzed using imaging software Gel Electrophoresis Analyzer (2010).

### **Activity of $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase**

The enzyme activity was determined for each of the protein fractions precipitated with ammonium sulfate at 0-100 %, 0-40 % and 40-70 % of saturation in the resistant and susceptible genotypes of *O. ficus-indica* (L.) Miller. Activity of  $\beta$ -1,3-glucanase (EC 3.2.1.39) was determined according to the procedure given by Ozgonen *et al.*, (2009). The amount of glucose released from laminarin by the enzyme present in the protein fractions was determined spectrophotometrically at 515 nm employed the 3,5-Dinitrosalicilic acid (DNS). The activity of  $\beta$ -1,3-glucanase was expressed in U/mg of protein per gram of dry weight. An enzymatic unit (1 U) was defined as the amount of enzyme that catalyzes the release of reducing sugar groups equivalent to 1 mmol of glucose per min.

Chitinase activity (EC 3.2.1.14) was determined spectrophotometrically at 585 nm, according to the procedure provided by Molano *et al.*, (1977) using the reagent 4-Dimetilamino benzaldehído (4-DMABA) Chitinase activity was expressed expressed in

U/mg of protein per gram of dry weight. An enzymatic unit (1 U) was defined as the amount of enzyme that catalyzes the release 1mmol N-acetylglucosamine per min. The measurements were taken in five replicates.

### **Evaluation of fungicidal activity**

A first experiment was performed to evaluate the antifungal activity of the methanol extract on the development of *P. opuntiae*. With extracts of five R and S selected plants a test was performed on a cell culture plate. Treatments were R genotype extract at concentrations of 5, 10, 15, 20 mg.mL and extract of susceptible genotype to the above concentrations and, as a control, Captan<sup>®</sup> (N-trichloromethylthio-4-cyclohexene-1, 2-dicarboximide) at 0.2 g.mL<sup>-1</sup>. The treatments were added 50  $\mu$ L *P. opuntiae* inoculum at a concentration  $1 \times 10^{-6}$  conidia/mL in malt extract medium with 0.1 % Triton X-100, reaching a final volume of 350  $\mu$ L. The trial was conducted under 26 °C and 16/8 h light- dark conditions for 30 d. The antifungal activity was evaluated in a 10 d period, measuring the absorbance at 600 nm using a plate reader (Multiskan GO, Thermo Scientific<sup>®</sup> Cat. # 51119200).

### **Protein extracts on germination inhibition of *P. opuntiae***

In a second experiment it was tested the effectiveness in vitro of protein fractions of *Opuntia*, precipitated with ammonium sulfate at 0-100 %, 0-40 % and 40-70 % saturation, on conidia and hyphae germination of *P. opuntiae*. For this experiment 0.2 mL tubes were used. In each tube the protein extract with different fractions were added at 25 and 50 mg.mL<sup>-1</sup>, and 25  $\mu$ L of a conidial suspension of the pathogen  $11.6 \times 10^{-6}$  conidia/mL. As a positive control Captan 0.2 g/ mL, and as negative control MEA 2 % were used. The tubes were placed at 26 °C for 72 h. after this incubation period counting of germinated conidia in each of the treatments was performed in Neubauer chamber. Images of the morphology of hyphae and conidia in each of the treatments were obtained.

To assess the antifungal activity of ethanolic extract of *Opuntia*, spectrophotometric measurements at an optical density of 595 nm (Broekaert *et al.*, 1990) were performed. Readings were taken 10 d after inoculation of the pathogen (Figure 2).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Phytochemical profile of *O. ficus-indica* (L.) Miller cladodes

In all analyzed metabolites (condensed tannins, total phenolic compounds, flavonoids, antiradical activity against DPPH) there were differences between the resistant genotype (R) and susceptible one (S) (Table 1). Condensed tannins, flavonoids and total phenolic compounds concentration ( $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ) were higher in the resistant genotype.

Tannins was 3.5 times higher in resistant genotypes to *P. opuntiae*, while total phenols and flavonoids was 7 and 3.5 times more respectively, whereas the antioxidant activity increased by 50 % in the resistant extract. The inhibitory activity of the conidia germination of *P. opuntiae* in the resistant genotype was 93 % compared with 14 % in the susceptible genotype, this inhibition value was similar to the antifungal compound Captan<sup>®</sup>.

**Table 1** Phenolic compounds content in cladodes ethanol extract of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller genotypes susceptible and resistant and inhibitory activity on the germination of conidia of *Pseudocercospora opuntiae*.

Genotypes <i>O. ficus-indica</i>	Condensed tannin mg Eq de cinidin-3-G/g d.w	Total phenols mg Eq ac. Gálico/g d.w.	Flavonoids mg Eq Quercetin/g d.w	IC <sub>50</sub> of Antiradical activity DPPH mg/mL	Inhibition of germination (%)
Resistente	1.56±0.23	168±9	55±9	0.52±0.02	93.34±1.2
Susceptible	0.48±0.09	23±3	15±4	1.04±0.04	14.20±2.6

d.w. =Dry weight

Sharavana *et al.*, (2013) reported antifungal activity associated with flavonoids from ethanol extract of *O. dillenii*.

They have reported that the accumulated phenols pass to the cell wall by the action of peroxidases that were part of the lignin, cutin and suberin and act as mechanical support and barriers against microbial invasion (Strack, 1997).

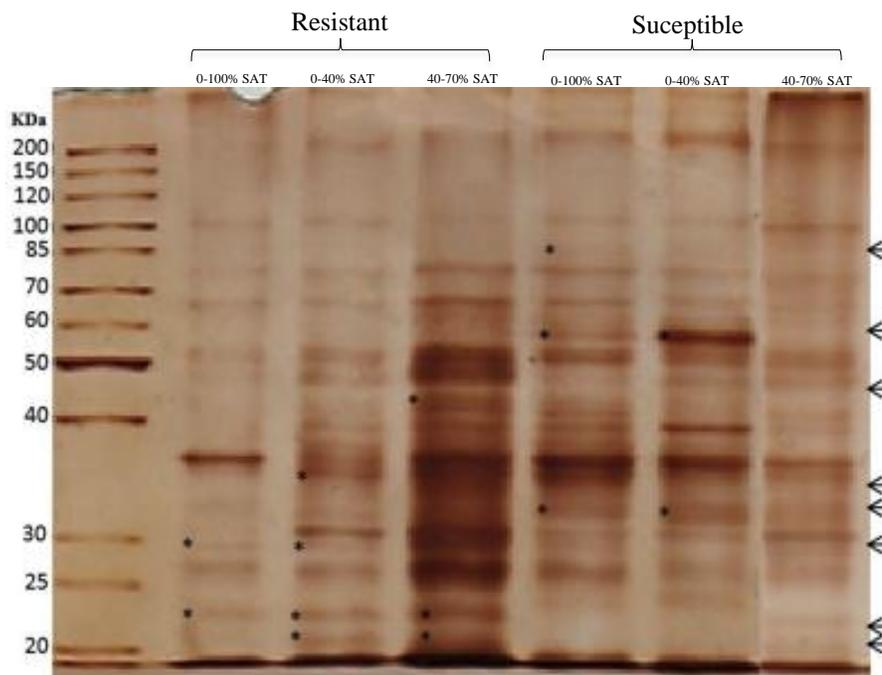
In the case of black spot, Quesada-Salinas *et al.*, (2013) observed an increase of polyphenols in *Opuntia* as response to invading mycelium of *Pseudocercospora*, 129 days after inoculation, causing a black color tissues. These results are related to a resistance response to the necrotrofa stage of the pathogen.

Two phenolic compounds, piscidic and eucomic acid in ethanol extracts of *O. ficus-indica* and 16 flavonoids like glycosides of quercetin, kaempferol and isorhamnetin were identified by (Ginestra *et al.*, 2009). These same flavonoids present in *Asparagus officinalis* extracts showed antifungal activity against *Fusarium oxysporum* (Rosado-Alvarez *et al.*, 2014).

Based on the above, it can be considered that the resistance of R genotype may be related to the increased production of phenolics and flavonoids preformed; ie production could be higher in developing tissues of this genotype (Lattanzio *et al.*, 2006)

### Identification of proteins SDS-PAGE

The R and S genotypes showed differences in molecular weights (kDa) compounds, which is considered as the presence of different proteins. Figure 1 shows the proteins present in the resistant genotype (R), which are not in the susceptible one (S), that correspond to molecular weights 20, 23, 28, 35 and 45 kDa.



**Figure 1:** Protein fractions profile acrylamide gel 10 % of R (resistant) and S (susceptible) genotypes.

According to Shyamala *et al.*, (2011) glucanases and its isoforms have molecular weights ranging from 36-66 kDa in *O. vulgaris*, which showed similarity with the present study in

both genotypes, R and S, by what it could be assumed that resistance is related to some kind of glucanase and its isoforms.

### Enzymatic activity of $\beta$ -1, 3 glucanases and chitinases

There were differences in the activity of glucanases in each of the fractions of R and S genotypes (Tuckey  $p < 0.05$ ). There was no reading of chitinases activity in both genotypes (data not shown). Higher glucanases activity was registered in cladodes of genotype R compared with S (10.3 and 4.95 UA/mg protein respectively (Table 2). These results suggest that opuntia pads of this genotype have constitutively glucanases, which could be related to the discriminating environment in which they develop. It is suggested that these plants could activate more efficiently early defense mechanisms against *Pseudocercospora opuntiae*.

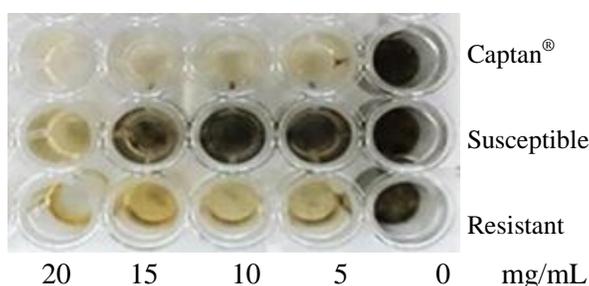
**Table 2** Glucanases determination and inhibition of germination of conidia in resistant R and susceptible S genotypes of *Pseudocercospora opuntiae*.

Genotype <i>O. ficus-indica</i>	Saturation $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ (%)	$\beta$ -1,3-glucanase (UA/mg protein)	Inhibition of germination (%)
R	0-40	8.53±0.09 <sup>bc</sup>	72.9±0.13 <sup>b</sup>
R	40-70	12.80±0.95 <sup>a</sup>	89.6±0.69 <sup>a</sup>
R	0-100	9.58±0.56 <sup>b</sup>	84.0±0.49 <sup>ab</sup>
S	0-40	3.99±0.23 <sup>c</sup>	23.3±0.67 <sup>de</sup>
S	40-70	5.90±0.28 <sup>d</sup>	28.5±0.12 <sup>d</sup>
S	0-100	3.90±0.49 <sup>c</sup>	38.2±0.83 <sup>c</sup>

Means followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ) using Tukey test.

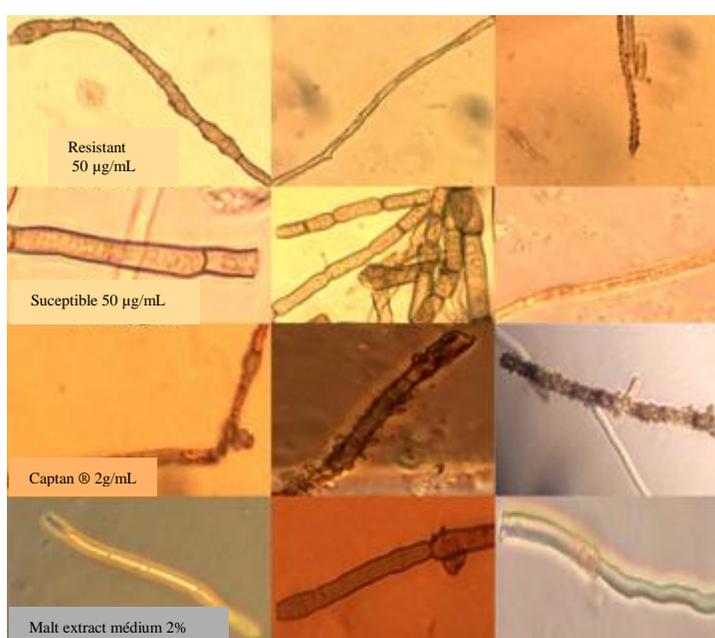
Previous studies have shown that the production of glucanases has been linked to the selection of resistant plants to *Pseudocercospora* and *Cercospora* (Sunderesha *et al.*, 2010, Felipini and Di Piero, 2013, Qiao *et al.*, 2014)

### Evaluation of the antifungal activity of *Opuntia* extracts



**Figure 2** Evaluation of antifungal activity of *Opuntia* ethanol extracts

After 10 d of growth of the pathogen with extracts of *Opuntia*, it was observed a development inhibition of it in the extract from genotype R. This treatment showed similar optical density to the treatment with the fungicide. Captan® inhibits the activity of sulphydric enzymes, releasing thiophosgene in the process, which is toxic to the fungus. It also interferes with the respiration and electron transport chain. Meanwhile, the susceptible genotype has had a high optical density similar to that found when the pathogen grows in medium MEA 2 %. This result shows that the methanolic extract obtained from genotype R has a fungicidal effect, inhibiting the growth of *P. opuntiae* (Figure 3).



**Figure 3** Effect of the protein extracts of *Opuntia* on germination and morphology *P. opuntiae*

In previous studies of ethanol extracts of *Opuntia*, higher levels of phenols and tannins were observed compared to extracts obtained in other solvents. This extract presented antibacterial and antifungal activity against *Candida albicans* and *Aspergillus niger* (Sharavana *et al.*, 2013). These results are consistent with the effect of the extract obtained from genotype R.

### **Protein extracts on inhibiting germination of *P. opuntiae***

The *in vitro* study of the effectiveness of protein fractions of *Opuntia* on the inhibition of germination of conidia of *P. opuntiae*, showed greater inhibition values of R genotype protein fractions, compared with those of genotype S (Table 2).

The inhibition level of R genotype was close to 90 %, value surpassed only by inhibition generated by fungicide Captan®.

Evidence suggests that plant extracts can be used against microorganisms that cause diseases in plants. High percentages of *C. circinans* conidia inhibition have been reached applying extracts of resistant potato varieties, rich in phenolic compounds.

The higher production of phenols and glucanases of genotype R may be related to its inhibition capacity of conidial germination.

The effects on conidial germination inhibition of genotype R, is related to structural damage of conidial morphology (Figure 3). Conidia that were in contact with the R genotype extract showed detachment of the cell wall, accumulation of lipid compounds and dehydration; none of the conidia exposed under these conditions shows the formation of the germ tube. These damages are also observed in conidia in contact with Captan®.

### **CONCLUSIONS**

The phytochemical profile of *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller cladodes showed that the production of condensed tannins, flavonoids and total phenolic compounds was greater in genotype R compared with genotype S. The presence of different proteins in both genotypes was observed by SDS-PAGE, visualizing on genotype R proteins with molecular weights of 20, 23, 28, 35 and 45 kDa, which are absent in genotype S; so these proteins might be related with glucanases and its isoforms. R genotype also showed the higher activity in the production of glucanases. No presence of chitinase activity was detected in both genotypes. When antifungal activity of ethanolic extracts and protein fractions of the R and S genotypes was evaluated, it was observed that genotype R has a 93.24 % of growth inhibition of *P. opuntiae* conidia after 72 h of growth. Inhibition of conidial germination is related to structural damage of conidial morphology and not germ tube formation. Based on the obtained results it is suggested that genotype R has presented constitutively early defense mechanisms against *P. opuntiae*, and could be selected as a resistant genotype

based on these mechanisms. Further studies of these mechanisms in the interaction *P. opuntiae* - genotype R, could allow to check environmental effects as well as to advance with molecular markers associated with them.

## References

- Ayala-Escobar, V., Yañez-Morales, M. J., Braun, U., Groenewald, J. Z. and Crous P.W. 2006. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. *Fungal Diversity*. 21: 1- 9.
- Bergaoui, A., Boughalleb, N., Ben Jannet, H., Harzallah-Shiric, F., El Mahoub, M., and Mighri Z. 2007. Chemical composition and antifungal activity of volatiles from three *Opuntia* species growing in Tunisia. *Pakistan Journal Biological Sciences*. 15: 2485-9.
- Bonner, P. L. 2007. Protocol 2.8 the total and fractional precipitation of protein by ammonium sulfate. En P. L. Boner, *Protein purification Taylor & Francis*. 75- 76.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248- 254.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C. 1995. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (LWT)*. 28- 25.
- Burda, S.; Oleszek, W. 2001 Antioxidant and antiradical activities of flavonoids *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 2774.
- Coria Cayupán, Y. S., Ochoa, M. J. and Nazareno, M. A. 2011. Health-Promoting Substances and Antioxidant Properties of *Opuntia* sp. Fruits. Changes in bioactive-compound contents during ripening process *Food Chemistry*. 126: 514-519.
- Daub M. E. 1986. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 24: 159- 186.
- Ebrahim, S., Usha K., and Singh B. 2011. Pathogenesis-related (PR)-proteins: Chitinase and  $\beta$ -1, 3-glucanase in defense mechanism against malformation in mango (*Mangifera indica* L.) *Scientia Horticulturae*. 130: 847- 852.
- Felipini R. B. and Di Piero R. M. 2013. PR-protein activities in table beet against *Cercospora beticola* after spraying chitosan or acibenzolar-S-methyl. *Tropical plant pathology*. 6: 534- 538.

- García E. and Lozoya, E. G. 2004. Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 3: 414- 422.
- Ginestra, G., Parker, M. L., Bennett, R. N., Robertson, J., Mandalari, G., Narbad, A., Lo Curto, R. B., Bisignano, G., Faulds C. B., and Waldron K. W. 2009. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-Indica* (L.) Mill.]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 10323-10330.
- Kuskoski, E., Asuero, A., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J. and Fett, R. 2005. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas*. 25: 726- 732.
- Laemmli, U.K., 1970. Nature, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. 4: 227- 680.
- Mabry T., K.R., Markham, and M.B. Thomas. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer Science & Business Media. 346.
- Méndez, G. J. S.; Talavera, M. D. and Gracia, H. J. E. 2008. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. VI Taller de Producción y aprovechamiento del nopal en el noreste de México, Memorias, Mina, N.L., México. 24 y 25 de octubre. 14.
- Mesa A. C., Bueno J. G., and Betancur L. A. 2004. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev Esp Quim Puros Science, S.A. Soc Esp de Quimioterapia*. 4: 325-331.
- Molano J. A, Durán A and Cabib E. 1977. A rapid and sensitive assay for chitinase using tritiated/chitin. *Analytical Biochemistry*. 83: 648- 656.
- Monda E. O., Sanders F. E. and Hick A. 2001. Infection and colonization of bean leaf by *Phaeoisariopsis griseola*. *Plant Pathology*. 50: 103- 110.
- Ochoa M. J., Rivera L. A., Arteaga-Garibay R. I., Martínez Peña M. D., Ireta J. and Portillo L. 2015. Black spot caused by *Pseudocercospora opuntiae* in cactus pear productive systems of Jalisco, Mexico. *Journal of Professional Association for Cactus Development*. 17: 1- 12.
- Osorio E., Flores M., Hernández D., Ventura J., Rodríguez R., and Aguilar C. 2010. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crop and Products*. 1: 153-157.
- Ozgonen H. Y. and Culal-Kilic H. 2009. Induction of phenolic compounds and Pathogenesis-Related Proteins by mycorrhizal fungal inoculations against

- Phytophthora capsici* Leonian in pepper. Journal of Biological Sciences. 17 :1181-1187.
- Qiao L. X., Ding X., Wang H. C., Sui J. M., and Wang J. S. 2014. Characterization of the  $\beta$ -1,3-glucanase gene in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by cloning and genetic transformation. Genetics and Molecular Research. 13: 1893- 1904.
- Quezada-Salinas, J., Sandoval Islas S., Alvarado Rosales D., and Cardenas Soriano E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) en Tlanepantla, Morelos, México. Agrociencia. 40: 641- 653.
- Quezada-Salinas, J., Sandobal Islas S., Alvarado Rosales D., and Moreno M. 2013. Histopatología y patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal. Revista Mexicana de Micología. 38: 9- 18.
- Rosado-Álvarez C., Molinero-Ruiz L., Rodríguez-Arcos R. and Basallote-Ureba M. J. 2014. Antifungal activity of asparagus extracts against phytopathogenic *Fusarium oxysporum*. Scientia Horticulturae. 171: 51- 57.
- Silva-Hughes A. F., Wedge D. E., Cantrell C. L., Carvalho C. R., Zhiqiang P., Moraes R. M., Madox V. L., and Rosa L. H. 2015. Diversity and activity of endophytic fungi associated with the native medicinal cactus *Opuntia humifusa* (Cactaceae) from United States. Microbiological Research <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.007>.
- Sharavana Kumar A. P., Vanitha J., Venkateshwaran K., Srikanth Reddy K., and Karthikeyan D., 2013. Antibacterial and Antifungal Activity of *Opuntia dillenii* (Cactaceae) Fruit Extract, Journal of Environmental Nanotechnology. 1: 16- 19.
- Shyamala S, Ravikumar S, Vikramathithan J, and Srikumar K. 2011. Isolation, purification, and characterization of two thermostable endo-1, 4- $\beta$ -D-glucanase forms from *Opuntia vulgaris*. Applied Biochemistry Biotechnology. 7: 597- 610. doi: 10.1007/s12010-011-9380-2.
- Singleton V. L. and Rossi J. A. jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 144- 156.
- Strack D. 1997. Chapter 10. Phenolic Metabolism. En Dey, P. M., J. B. Harbone (eds.). Plant Biochemistry. London UK. Academic Press.
- Sunderesha S. Manoj Kumar A. Rohini S. and Math S. 2010. Enhanced protection against two major fungal pathogens of groundnut *Cercospora arachidicola* and *Aspergillus flavus* in transgenic groundnut over expressing a tobacco  $\beta$  1,3 glucanase European Journal Plant Pathology. 126: 497- 508.

Treviño N. J. F., Rodríguez R. G., Verde M. J, Morales M. E., Garza R. A. and Rivas C. 2012 Actividad Antifúngica de *Stenocereus pruinosus* y *Echinocereus stramineus* Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 1: 42- 48.

Van Loon, L. C., Rep, M., and Pieterse, C. M. J. 2006. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44: 135- 162.

## CONCLUSIONES GENERALES

En esta investigación se identificó morfológica y molecularmente el hongo implicado con síntomas de mancha negra en sistemas productivos de nopal (*Opuntia* sps.) para fruta y vegetales en México occidental (Ojuelos y Zapopan, Jalisco). El estudio es el primero de verificación del agente causal de Jalisco.

Se comprobó que el hongo aislado de los sistemas productivos de Jalisco es el mismo que el reportado en la zona centro del país.

La patogenicidad del hongo se demostró en cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller pre-cortados, plantas de campo e invernadero, en explantes *in vitro* y en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

*Pseudocercospora opuntiae* aislada de lesiones de cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller tiene la capacidad de infectar otras especies de importancia económica, lo que demuestra que *P. opuntiae* no tiene un huésped específico.

En la proliferación de yemas axilares se demostró que en el período de estimulación el genotipo resistente R mostró un mayor número de brotes que el genotipo T en todas las dosis de BA. En medio basal (MS) el genotipo T mostró un mayor número de brotes.

La dosis intermedia de BA ( $2.2 \text{ mg.L}^{-1}$ ) mostró el mayor número de brotes en el período de estimulación para ambos genotipos sin diferenciarse significativamente de las otras dos concentraciones.

En la obtención de callos el Picloram mostró un desempeño destacable aunque no se pudo obtener regeneración.

No fue posible identificar genotipos con capacidad embriogénica, a pesar de haber repetido el experimento en cuatro ocasiones.

La propagación por trozos de cladodios resultó óptima para incrementar genotipos seleccionados. Los genotipos evaluados mostraron una respuesta diferencial en cuanto

a su capacidad de brotación, número y longitud de brotes bajo las mismas condiciones ambientales (sombreado) y edad del cladodio.

Se estableció un protocolo de germinación en semillas de diez cultivares de *Opuntia in vitro* y *ex vitro*. La germinación se incrementó en un 40 % por escarificación mecánica. Se demostró que el ácido giberélico juega un papel esencial en la promoción de la germinación (por encima de 90 %), como en la removilización de la fuente de hidratos de carbono, mediante el aumento de la actividad amilolítica en las semillas germinadas.

Se obtuvo un extracto del cultivo de *P. opuntiae*, el cual tiene actividades enzimáticas de amilasa, celulasa y proteasa, enzimas relacionadas con la degradación de la pared celular vegetal.

Se comprobó que el extracto del cultivo de *P. opuntiae* tiene la capacidad de generar patogenicidad en explantes jóvenes de *Opuntia* generando síntomas similares a los producidos por el hongo puro, su efecto provoca una menor severidad en el desarrollo de los síntomas, los cuales tardan más tiempo en aparecer en comparación con el hongo puro.

Los perfiles de ADN detectados con ISSR permitieron diferenciar los genotipos evaluados. El análisis de agrupamiento (dendrograma) y de componentes principales (ACP) con los marcadores ISSR permitieron determinar la variabilidad genética, mostraron que existe un agrupamiento entre el genotipo S y R. Se demuestra que los marcadores ISSR son útiles para diferenciar cultivares de especies diferentes en apoyo a los aspectos taxonómicos. No existe relación directa entre los grupos y la relación taxonómica, ya que se emplearon regiones microsátélites que en este caso permitieron determinar la variabilidad genética entre los diferentes individuos de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller.

El perfil fitoquímico en cladodios de *O. ficus-indica* (L.) Miller en los metabolitos analizados (taninos condensados, compuestos fenólicos totales, flavonoides, mostró diferencias entre el genotipo resistente (R) y susceptible (S).

La identificación de proteínas, permitió distinguir todas las proteínas presentes, observándose en los genotipos R y S diferencias en los pesos moleculares (KDa) los cuales se considerarían como la presencia de diferentes proteínas entre dichos genotipos.

La evaluación de las actividades enzimáticas de glucanasas permitió observar diferencias en el contenido de estas enzimas en cada una de las fracciones proteicas de genotipos R y S. Estos datos muestran que existe una mayor actividad específica de glucanasa en el genotipo resistente en comparación con el susceptible.

La actividad antifúngica de extractos etanólicos de *Opuntia* después de 10 d de crecimiento con *P. opuntiae*, mostraron una inhibición de su desarrollo en el extracto proveniente del genotipo R. Éste tratamiento mostró una densidad óptica similar a la presentada por el fungicida Captan®. Por otra parte el genotipo susceptible tiene una alta densidad óptica, similar a la encontrada cuando el patógeno crece en medio MEA 2 %. Este resultado muestra que el genotipo R tiene un efecto fungicida sobre *P. opuntiae* en donde inhibe su crecimiento.

### **Contribuciones al conocimiento**

Se identificó morfológica y molecularmente al hongo fitopatógeno *Pseudocercospora opuntiae*. El estudio es el primero de verificación de la enfermedad en Jalisco, México.

Se comprobó que el hongo aislado de los sistemas productivos de nopal en Jalisco es el mismo al reportado en la zona centro del país.

Se demostró que *Pseudocercospora opuntiae* aislada de lesiones de cladodios de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller tiene la capacidad de infectar a *Phaseolus vulgaris*.

Se comprobó que el extracto del cultivo de *Pseudocercospora opuntiae* tiene la capacidad de generar patogenicidad en explantes jóvenes así como el hongo puro.

Se determinó el perfil fitoquímico en cladodios de *O. ficus-indica* (L.) Miller en los genotipos resistente (R) y susceptible (S) encontrando valores mayores de taninos condensados, compuestos fenólicos totales y flavonoides en el primero de ellos.

Se comprobó una mayor actividad específica de glucanasa en el genotipo resistente (R) en comparación con el susceptible.

La actividad antifúngica de extractos etanólicos del genotipo R, después de 10 d de crecimiento con *P. opuntiae*, inhibió su desarrollo con resultados similares a los obtenidos con el fungicida Captan®.

Adicionalmente en la metodología:

Se estableció un protocolo de estimulación de la germinación *in vitro* y *ex vitro*, donde la escarificación mecánica y la adición de ácido giberélico incrementaron significativamente la germinación de las *Opuntias*.

## LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN SURGIDAS

- ✓ Varios puntos de interés quedan pendientes para ser atendidos en futuros trabajos de investigación, entre ellos, determinar los principales mecanismos de penetración, patogenicidad y virulencia de *Pseudocercospora opuntiae*.
- ✓ Profundizar en los factores que afectan la organogénesis y la embriogénesis somática en *Opuntia* sps., tales como la correlación entre cantidad de callo y factores que inducen la embriogénesis. Así como probar genotipos con diferentes fuentes de nitrógeno para la obtención de ES.
- ✓ Obtener extractos extracelulares de *P. opuntiae* a partir de diferentes medios, para identificar los posibles factores de virulencia.
- ✓ Evaluar los mecanismos de defensa de *Opuntia* a diferentes tiempos de inoculación de *P. opuntiae* y relacionar estos mecanismos con la expresión diferencial de genes de defensa.
- ✓ Establecer un protocolo que permita detectar molecularmente la presencia de *P. opuntiae* en cladodios de *Opuntia* con aparente sanidad.
- ✓ Dada la capacidad de infectar otras especies de importancia económica, como *Phaseolus vulgaris*; *P. opuntiae* no tiene un huésped específico. Éste hecho tiene implicaciones en la epidemiología de la enfermedad y necesita ser estudiada.
- ✓ Comprobar en plantaciones comerciales el comportamiento de los genotipos seleccionados, frente a los factores bióticos del entorno, así como su productividad.
- ✓ Estudiar una potencial asociación entre las cochinillas y la dispersión de la enfermedad como un factor adicional a considerar.

**LITERATURA CITADA (Introducción)**

- Ayala-Escobar, V., M. J. Yañez-Morales, U. Braun, J. Z. Groenewald y P.W. Crous. 2006. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov, the causal organism of cactus leaf spot in México. *Fungal Diversity*. 21: 1- 9.
- Caruso M., S. Curro, G. Las Casas, S. La Malfa y A. Gentile 2010. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus-indica* cultivated genotypes and their relation with related species. *Plant System Evolution* 290: 85- 97.
- Chessa, I. 2010. Cactus pear genetic resources conservation, evaluation and uses *CACTUSNET Newsletter, Special Issue 12*: 43- 53.
- Flores-Valdez, C. 2003. Importancia del nopal. *In*: C. A. Flores Valdez, ed. Nopalitos y tunas, producción, comercialización, poscosecha e industrialización. 1ª Ed. Universidad Autónoma Chapingo, CIESTAAM. México. 1- 18.
- Fucikovsky L. 2002. Diseases of some tropical and subtropical plants caused by bacteria, Phytoplasmas and Spiroplasmas. Universidad de Guadalajara. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Colegio de Postgraduados. 103- 107.
- García de Cortázar, V. y P. S. Nobel. 1992. Biomass and fruit production for the prickly pear cactus, *Opuntia ficus-indica*. *Journal American Society for Horticultural Science* 117: 558- 562.
- Granata G. y A. Sidoti. 1997. Appearance of alternaria golden spot on cactus pear in Italy. *Acta Horticulturae*. 438: 129- 130.
- Inglese, P. 2010. Cactus pear, *Opuntia ficus-indica* L. (Mill.) for fruit production: An overview. *Cactusnet Newsletter*. 12: 82- 92.
- Kiesling, R. 1998. Orígen, Domesticación y Distribución de *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 3: 50- 59.
- Méndez, G. J. S., M. D. Talavera, H. J. E. Gracia. 2008. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. VI Sinposium “Taller de Producción y aprovechamiento del nopal en el noreste de México” Memorias, Mina, N.L., México. 24 y 25 de octubre de 2008. 14.
- Mondragón Jacobo, C. 2001. Cactus pear breeding and domestication. *Plant Breeding Reviews*. 20: 135- 166.
- Mondragón-Jacobo, C. 2004. Mejoramiento genético del nopal: Avances al 2003 y perspectivas. *In*: El Nopal: Tópicos de Actualidad. Esparza-Frausto, G.; Valdez-Cepeda, R. D.; Méndez-Gallegos, S. J. (eds.). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 49- 71.

- Morales L., J. y L. Y. Hernández. 2002. Efecto de biofungicidas en el control de la mancha foliar del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos. Departamento de Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 65.
- Nobel, P. S., E. Garcia-Moya y E. Quero. 1992. High annual productivity of certain Agaves and cacti under cultivation. *Plant Cell Environmental*. 15: 329- 335.
- Nobel, P. S., 2011. Sabiduría del Desierto, agaves y cactus: CO<sub>2</sub>, agua, cambio climático. Colegio de Posgraduados, Mundi Prensa, México. 160.
- Ochoa, M. J., 2013. Black spot: an important disease for fodder, fruit, nopalitos cactus plantation. *Cactusnet Newsletter*. 13: 63- 72.
- Ochoa M. J., Luis Angel Rivera, Ramón Ignacio Arteaga-Garibay, Marcos Daniel Martínez Peña, Javier Ireta, Liberato Portillo. 2015. Black spot caused by *Pseudocercospora opuntiae* in cactus pear productive systems of Jalisco, Mexico. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 17: 1- 12.
- Osada, K. S. y R. A. Cárcamo. 1991. Etiología de la mancha negra del nopal. *In: Congreso Nacional de Fitopatología. Memorias de Resúmenes. Sociedad Mexicana de Fitopatología. México. 28.*
- Osorio, A. F. y A. Soto E. 1994. Enfermedades del nopal tunero. *In: Memorias sobre Aportaciones Técnicas y Experiencias de la Producción de Tuna en el Estado de Zacatecas. Esparza F.,G y S. de J. Méndez G. (eds.). CECCAM, Morelos, Zacatecas. 46- 48.*
- Pimienta, B. E. 1990. El Nopal Tunero. Colección Tiempos de Ciencia. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México. 246.
- Pimienta-Barrios, E. y A. Muñoz-Urías. 1995. Domestication of Opuntias and cultivated varieties, pp. 58-61. *In: Barbera, G.; Inlgese, P.; Pimienta-Barrios, E. (eds.). Agroecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear. International Technical Cooperation Network on Cactus Pear. FAO publications. Rome, Italy.*
- Quezada-Salinas, J., S. Sandoval Islas, D. Alvarado Rosales y E. Cardenas Soriano. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) en Tlalnepantla, Morelos, México. *Agrociencia*. 40: 641- 653.
- Saénz, C., H. Berger, J. Corrales-García, L. Galletti, V. Garcia del Cortazar, I. Higuera, C. Mondragon, A. Rodríguez-Feliz, E. Sepulveda y M. T. Varnero. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Roma, Italia. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO*. 162. 182.

Salinas A., J. Islas, D. Rosales y E. Soriano. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) en Tlalnepantla, Morelos, México. *Agrociencia*. 40: 641- 653.

SIAP. 2013. Servicio de Información Agroalimentario y Pesquero. Available at: [www.siap.gob.mx](http://www.siap.gob.mx). Accessed on December 12, 2013.

## GLOSARIO

**Ácido desoxirribonucleico:** Componente básico de los genes que contienen la información o código genético para la manifestación de los caracteres cualitativos y cuantitativos de los organismos.

**Asexual:** Reproducción vegetativa en la que obviamente no intervienen los gametos, por lo mismo la descendencia tiende a contener el mismo genotipo de la planta madre.

**Callo:** Masas desorganizadas de células hasta antes de la diferenciación morfológica y fisiológica.

**Embriogénico:** Células de callo o de tejidos con capacidad de producir estructuras similares a embriones.

**Embrioides:** Estructura parecida a un embrión. Otros sinónimos son embrión somático, embrión asexual y embrión adventicio.

**Fenoles:** Sustancias que poseen uno o más sustituyentes hidroxilo unido a un anillo aromático.

**Genotipo:** Dotación combinada y determinada de genes nucleares y citoplasmáticos de un individuo, con capacidad de expresión particular por interacción con el ambiente.

## ANEXOS

### 1. *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller

De acuerdo a Kiesling (com. pers.), sobre la base de informes históricos, pruebas citológicas, referencias bibliográficas, y pruebas taxonómicas de los especímenes de herbario y en el campo, la planta de tuna común, *Opuntia*, es una planta hortícola cuya domesticación comenzó hace 9.000 años por los antiguos mexicanos, y se la ha dividido erróneamente en varias especies. Durante la domesticación de la especie silvestre (2X), *O. ficus-indica* adquirió un mayor nivel de ploidía (6X y 8X) a través de la hibridación natural. Las actuales plantas silvestres de México se han descrito como *O. streptacantha*, *O. megacantha* y *amyclaea*. Después del descubrimiento de América, *O. ficus-indica* (L.) Miller se introdujo en España y, más tarde, a lo largo de la cuenca del Mediterráneo por los marineros que lo utilizaron para prevenir el escorbuto. En los nuevos lugares, ejemplares con espinas y sin espinas se desarrollaron a partir de plántulas que mostraron rasgos de los padres del viejo mundo. En los nuevos países, los botánicos los describen como nueva especie. Esta evidencia sugiere que los especímenes con y sin espinas son sólo formas de *O. ficus-indica* (L.) Miller, y por lo tanto, por razones de nomenclatura, el nombre de *O. ficus-indica* f. *amyclaea* (Tenore) Schelle debe ser utilizado para las plantas con espinas.

De esta manera la nomenclatura *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller se emplea como única para todas los especímenes sin espinas en el presente documento de tesis. De acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura de Plantas y Hongos, para las diferentes especies de opuntia se denominará *Opuntia* sps. "International Code of Nomenclature" (2009) (Code of Melbourne).

### 2. Proceso de desinfección

Inmersión en alcohol 96° con agitación por 10 s

Inmersión en hipoclorito de sodio al 3 % adicionado de dos gotas de detergente líquido

Agitar durante 10 min

Lavados tres veces con abundante agua desionizada estéril por 30 s c/u

### 3. Condiciones de cultivo *in vitro*

La incubación se realizó a una temperatura de  $27 \pm 2$  °C con un fotoperíodo de 16 h de luz fluorescente a 1,500 lux ( $25 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ).

### 4. Elaboración de medios

#### *MS (Murashige y Skoog, 1962)*

Sales de MS

3 % de sacarosa

7 g·L<sup>-1</sup> de Agar<sup>®</sup>

### 5. Composición del medio Gamborg *et al.* 1968

0.134 g/L (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>

2.528 g/L KNO<sub>3</sub>

0.246 g/L MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

0.150 g/L CaCl<sub>2</sub>

0.150 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0.75 mg/L KI

3.0 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

10 mg/L MnSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O

2 mg/L ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

0.25 mg/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O

0.025 mg/L CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O

0.025 mg/L CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O

37.3 mg/L Na<sub>2</sub> EDTA

27.8 mg/L FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O

### 6. Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN)

Se realizó de acuerdo al protocolo Taylor and Lee (1990) con algunas modificaciones, como sigue: 0.05 g de material vegetal liofilizado se trituró en un mortero con 1 mL de buffer de lisis (Tris-HCl 50mM pH7.2, EDTA 50mM, SDS 3%, β-mercaptoetanol 1%) recuperándolo en un tubo eppendorf de 2mL estéril, se incubó a 60°C durante una hora, se añadió 500 μL de fenol y 500 μL de cloroformo, se agitó manualmente y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min, la fase acuosa fue recuperada en un nuevo tubo eppendorf estéril de 1.5 mL seguido de la adición de 500 μL de isopropanol frío se mantuvo a -20°C durante 30 min, se centrifugó a 10000 rpm por 5 min se eliminó el isopropanol y la pastilla se lavó con etanol al 70% frío, nuevamente se centrifugó a 10000 rpm por 5 min se eliminó el etanol

y la pastilla e DNA se concentró en un concentrador de DNA labconco® finalmente se resuspendió en 200 TE µL (Tris-HCl 10mM pH8.0, EDTA 0).

## 7. Capítulo I Secuencias parcial del gen 18S ribosomal de *Pseudocercospora opuntiae*

Secuencia parcial del gen 18S ribosomal; secuencia completa del espacio interno transcrito 1 y del gen 5.8S ribosomal; y secuencia parcial del espacio interno transcrito 2

KF975410.1 *Pseudocercospora opuntiae* strain BSJ1

CTCCGTAGGTGAACCTGCGGAGGGATCATTACTGAGTGAGGGCGAAAGCCCGACCTCC  
AACCCCTTTGTGA

ACCAACTCTGTTGCTTCGGGGGCGACCCCGCCGTTTCGGCGACGGCGCCCCCGGAGGT  
CGTCAAACACTG

CATCTCTGCGTCGGAGTCTTAAAGTAAATTTGAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTT  
GGTTCTGGCAT

CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA  
TCGAATCTTTGA

ACGCACATTGCGCCCCGTGGTATTCCGCGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTACCA  
TTCAAGCCTAG

CTTGGTATTGGGCGTCGTGGTTCCGCGCGCCTTAAAGTCTCCGGCTAAGCAGTTCGTCT  
CTAAGCGTTGT

GGCATACATTTTTCGCTGAAGAGTTCGGACGGCTTTTGGCCGTTAAATCTTC

GenBank flat file:

LOCUS KF975410 472 bp DNA linear PLN 29-OCT-2014

*Pseudocercospora opuntiae* strain BSJ1 18S ribosomal RNA gene,  
Partial sequence; internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal  
RNA gene, complete sequence; and internal transcribed spacer 2,  
Partial sequence.

ACCESSION KF975410

VERSION KF975410

KEYWORDS

SOURCE *Pseudocercospora opuntiae*

ORGANISM *Pseudocercospora opuntiae*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;  
Dothideomycetes; Dothideomycetidae; Capnodiales;  
Mycosphaerellaceae; Pseudocercospora.

REFERENCE 1 (bases 1 to 472)

TITLE 'Black spot' caused by *Pseudocercospora opuntiae* in cactus pear productive system of Jalisco, Mexico

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 472)

AUTHORS María Judith Ochoa, Luis Angel Rivera, Ramon Ignacio Arteaga-Garibay Marcos Daniel Martinez-Peña, Javier Ireta, Liberato Portillo.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (13-DEC-2013) Microbial Genetics Resources Laboratory, National Center of Genetics Resources of INIFAP, 400 Boulevard la Biodiversidad, Las Cruces, Tepatitlan de Morelos, Jalisco 47600, Mexico.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1.472 /organism="Pseudocercospora opuntiae"/mol\_type="genomic DNA"  
/strain="BSJ1"/host="Opuntia sp. (nopal)/db\_xref="taxon:705918 /country="Mexico: Jalisco"

rRNA <1..3 /product="18S ribosomal RNA" misc\_RNA 31.17 /product="internal transcribed spacer 1" rRNA 177..334 /product="5.8S ribosomal RNA" misc\_RNA 335..>47 /product="internal transcribed spacer 2"

#### ORIGIN

```

1 ctcgtaggt gaacctgagg agggatcatt actgagtgag ggcgaaagcc cgacctccaa
61 ccccttgta accaactctg ttgctcggg ggcgaccccg ccgttcggc gacggcgccc
121 ccggaggteg tcaaacactg catctctgcg tcggagtctt aaagtaaatt tgaacaaaac
181 ttcaacaac ggatctcttg gttctggcat cgatgaagaa cgcagcgaac tgcgataagt
241 aatgtgaatt gcgaattca gtgaatcgc gaactcttga acgcacattg cgccccgtgg
301 tattccgagg ggcgatgctg ttcgagcgtc attcaccat tcaagcctag cttggattg
361 ggcgctgtgg ttccgcgccg cttaaagtct ccggtaagc agttcgtctc taagcgttg
421 ggcatacatt ttccgctgaa gaggtcggac ggcttttggc cgtaaatct tc //

```

## 8. Capítulo II

Análisis de varianza del número de brotes generados por diferentes genotipos y concentraciones de BA durante el período de estimulación.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F	Valor P
Efectos principales					
A: CONCENTRACION BA	10.1111	2	5.05556	3.79	0.0529
B: GENOTIPO	50.0	1	50.0	37.50	0.0001
Interacción A X B	2.33333	2	1.16667	0.87	0.4418
RESIDUAL	16.0	12	1.33333		
TOTAL	78.4444	17			

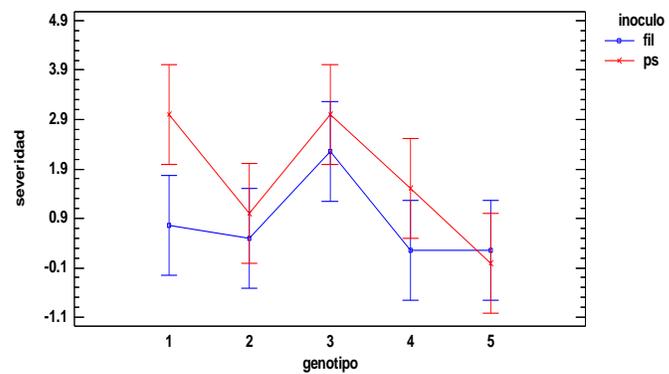
Análisis de varianza del número de brotes generados durante el período en MS por diferentes genotipos y concentraciones de BA aplicadas durante el período de estimulación.

Fuente	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado medio	F	Valor P
Efectos principales					
A: CONCENTRACION DE BA	14.1136	2	7.05682	0.33	0.7264
B: GENOTIPO	409.043	1	409.043	18.99	0.0008
Interacción A X B	169.568	2	84.7841	3.94	0.0461
RESIDUAL	280.0	13	21.5385		
TOTAL	852.105	18			

## 9. Capítulo IV

La gráfica muestra una interacción significativa entre el genotipo y tipo de inóculo ya que la severidad de la enfermedad se incrementó en mayor medida con el inóculo hongo puro (ps) que con el filtrado del patógeno en los genotipos 1 (G<sub>2</sub>) y 5 (R) comparados con el 2 (G<sub>6</sub>), 3 (G<sub>7</sub>) y 4 (T).

Por lo que se demuestra que el filtrado y el hongo puro tienen la capacidad de generar patogenicidad siempre y cuando el genotipo muestre susceptibilidad hacia el patógeno.



## Publicaciones y difusiones generadas durante el desarrollo de la presente tesis de investigación

- Rivera-López L.A., Javier Ireta-Moreno y **M. J. Ochoa**. 2012 Determinación del agente causal de la “mancha negra” del nopal (*Opuntia* spp) en el estado en Jalisco. Identification of “Mancha negra” from Nopal (*Opuntia* spp) in Jalisco State XIV Congreso Internacional/XXXIX Congreso Nacional de Fitopatología, Nuevo Vallarta, Nayarit.
- Nazareno M., **M. J. Ochoa** and J.C Dubeaux 2012 Editora Newsletter n° 13 Proceedings of the Second Meeting for the Integral Use of Cactus Pear and Other Cacti and 1st South American Meeting of the FAO-ICARDA CACTUSNET Termas de Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina September 17- 19.
- Ochoa M. J.** 2013 Black Spot “*Pseudocercospora opuntia*”: An important disease in cactus pear crops for fruit, forraje and nopalitos. Proceedings of the Second Meeting for the Integral Use of Cactus Pear and Other Cacti and 1st South American Meeting of the FAO-ICARDA CACTUSNET Termas de Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina September 17- 19, 2012
- Ochoa M. J.** 2013 Abstract Cactus pear fruit production development in South America: Argentina First International Seminar of Cactus in Argelia, Africa. 21- 26 April 2013.
- Ochoa M. J.** “*Pseudocercospora opuntiae*, mancha negra del nopal”, Sociedad Jalisciense de Cactología, Nakari, Conferencia, 24 de mayo 2013.
- Ochoa M. J.**, Enrique Lobos. 2013. La Fitosanidad como factor critic en los distintos sistemas productivos de nopal. II Reunión Internacional de Aprovechamiento Integral de la Tuna. Termas de Río Hondo, Santiago del Estero, Argentina. Conferencia. 17- 19 Sep 2013.
- Ochoa M. J.**, Luis Ángel Rivera, Liberato Portillo, 2013 Mancha negra: Una grave enfermedad en los sistemas productivos de nopal (*Opuntia* spp) de Jalisco; México. XVII Simposio Nacional de Parasitología Forestal Durango, México. Poster.
- Ochoa M. J.** Conferencia e informe sobre “Avances en el conocimiento de la mancha negra de la tuna (*Pseudocercospora* sp.)” Primer encuentro internacional de la tuna para Forraje como una medida de adaptación al cambio climático en Cochabamba, Bolivia, Mayo 2014.
- Ochoa M. J.** Consultoría Internacional Asesoramiento Especializado en el Manejo Técnico del Cultivo Tuna, (Manejo fitosanitario de los tunales) Agencia Sueca Internacional para el desarrollo. Bolivia Abril-Mayo 2014.
- Ochoa, M. J.**, E. Lobos, L. Portillo and A. L. Vigueras. 2015. Importance of biotic factors and impact on cactus pear production systems. Acta Hort. 1067: 327- 333.
- González-Flores L. M., **Ochoa M. J.**, Gómez-Leyva J. F. 2015 Caracterización molecular de *Opuntia* spp. con resistencia a *Pseudocercospora opuntiae* mediante PCR-ISSR X Congreso de Biotecnología Chiapas, Mexico. Presentación oral.
- Ochoa M. J.**, Luis Ángel Rivera-López, Liberato Portillo-Martínez Determinación de la

patogenicidad de *Pseudocercospora opuntiae* en explantes de *Opuntia* sps.; XVII Congreso Internacional/XLII Congreso Nacional de Fitopatología Julio 2015. Trabajo seleccionado para presentación oral. Trabajo distinguido por originalidad.

**Ochoa M. J.**, Luis Angel Rivera, Ramón Ignacio Arteaga-Garibay, Marcos Daniel Martínez Peña, Javier Ireta, Liberato Portillo. 2015. Black spot caused by *Pseudocercospora opuntiae* in cactus pear productive systems of Jalisco, Mexico. JPACD. 17: 1- 12.

**Ochoa M. J.**, González-Flores L. M., Cruz-Rubio J. M., Portillo L., Gómez-Leyva J. F. 2015 Effect of substrate and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) on seed germination in ten cultivars of *Opuntia* sps. JPACD. 17: 50- 60.

**Ochoa M. J.** 2015. Editor Good Agricultural Practice Manual FAO-ICARDA, en proceso.

Coolaboración en Capítulo Disease control and management by Giovanni Granata. Segunda Edición FAO: **Agroecology, cultivation and uses of cactus pear (*Opuntia* sps.)** en proceso.

**Ochoa M. J.**, Luis Rivera-López, Juan Florencio Gómez-Leyva. 2016 Método de selección en explantes *in vitro* de *Opuntia* sps con resistencia a la mancha negra causada por *Pseudocercospora opuntiae*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. ISSN impreso 0370-4661. ISSN (en línea) 1853-8665.

**Ochoa M. J.**, Rivera-López L.A, González-Flores L. M., Cruz-Rubio J. M. Rodríguez, S., Nazareno M. A., Gómez-Leyva J F. Resistance of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill) against *Pseudocercospora opuntiae* through  $\beta$ -1,3-glucanase activity and polyphenolic compounds present in cladodes. En proceso

Elaboración de un triptico para productores:

**Mecánico**

Desinfección y/o limpieza del equipo y herramientas utilizadas en cada labor de cultivo, en especial durante la cosecha se debe evitar pasar de lugares con plantas enfermas a zonas con plantas sanas.

Lo cual se puede hacer con un litro de agua aplicando una cucharada de cloro comercial.

**Organización entre Productores.**

Debido a la forma en que se presenta la enfermedad y a las características del agente causal es muy importante que todos los productores que trabajen en parcelas cercanas traten de seguir en conjunto las medidas preventivas.

Ya que deben considerar que cada una de sus parcelas pertenece a un solo sistema, por tal motivo hay que trabajar en conjunto y bajo coordinación.

**ZAPOPAN UNIDO**

Más información: M. Sc. Judith Ochoa, Biol. Luis Rivera y Dr. Liberato Portillo, Departamento de Botánica y Zoología, CUCBA, Universidad de Guadalajara, judith@unsa.edu.mx, luis\_rastuan@hotmail.com, portil@ucvzila.udg.mx

Dirección de Desarrollo Agropecuario con la Ing. Patricia Ortiz Silva en el Tel. 388-2200 Ext. 3240 y 3242 portil@zapopan.gob.mx

**MANEJO DEL HONGO PATÓGENO DEL NOPAL**  
(*Pseudocercospora Opuntiae*)

www.zapopan.gob.mx