



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

Etiología de un síndrome fungoso y viral en cladodios de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*)

Berenice Alonso Barrera

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

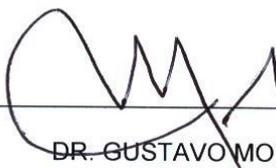
MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2011

La presente tesis titulada “Etiología de un síndrome fungoso y viral en cladodios de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*).” fue realizada por Berenice Alonso Barrera bajo la dirección del consejo Particular abajo indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

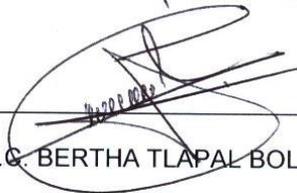
MAESTRA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGIA

CONSEJERO:



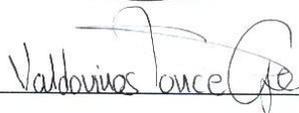
DR. GUSTAVO MORA AGUILERA

ASESORA:



M.C. BERTHA TLAPAL BOLAÑOS

ASESORA:



DRA. GUADALUPE VALDOVINOS PONCE

ASESOR:



DR. ESTEBAN RODRÍGUEZ LEYVA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2011.

DEDECATORIA

A mis **PADRES** por todo el apoyo que siempre me han brindado, paciencia y amor incondicional. Gracias por el ejemplo que me han dado.

A **Luis Alfonso** por ser el mejor amigo que pude haber encontrado, gracias chinito por estar en los momentos más difíciles y más felices de mi maestría, me llevo una amistad incomparable que espero dure para toda la vida.

A **Pakito y Nadia** por darme su amistad, sus regaños y su tiempo para compartir conmigo muchos momentos que no olvidare.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres por el apoyo emocional y económico que siempre me han brindado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**), por haberme apoyado en la realización de mis estudios de Maestría dándome la oportunidad de alcanzar una más de mis metas.

A los integrantes de mi comité: Al Dr. Gustavo Mora Aguilera, MC. Bertha Tlapal Bolaños, Dr. Esteban Rodríguez Leyva, Dra. Guadalupe Valdovinos Ponce, por el esfuerzo, apoyo, dedicación, consejos y tiempo que me brindaron para la conclusión de mi investigación.

Al Dr. Daniel L. Ochoa Martínez por su apoyo una de las fases más importantes de mi tesis.

Al MC. Luis Alfonso Aguilar Pérez y al Dr. Francisco Lara Viveros por todo su apoyo y consejos en mi maestría.

Agradezco a todos y cada uno de los docentes e investigadores del Colegio de Postgraduados por los conocimientos y experiencias que compartieron conmigo dentro y fuera de clases.

Agradezco a todos mis compañeros por los grandes momentos que vivimos de aprendizaje, discusión y distracción.

ÍNDICE

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Indice de cuadros	viii
Indice de figuras	ix
Resumen General	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1.El cultivo del nopal.....	3
1.2.El cultivo del nopal en Tlalnepantla, Morelos	6
1.3. Enfermedades del nopal.....	7
1.4.Principales enfermedades del nopal en Tlalnepantla, Morelos	8
1.5.Detección de infecciones latentes	9
1.6. Virus reportados en cactáceas	11
1.7. HIPOTESIS	12
1.8. OBJETIVOS	13
2. DETECCIÓN DE INFECCIONES LATENTES DE <i>Pseudocercospora opuntiae</i> EN NOPAL VERDURA (<i>Opuntia ficus-indica</i> Miller).....	14
2.1. RESUMEN	14
2.2. INTRODUCCIÓN.....	15
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.3.1. Muestreo en campo	16
2.3.2. Procesamiento en laboratorio	19
2.3.3. Tinción.....	19

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
2.5. CONCLUSIONES.....	23
3. IMPLICACIÓN DE <i>Colletotrichum</i> sp. EN EL SÍNDROME DE LA MANCHA NEGRA (<i>Pseudocercospora opuntiae</i>) EN EL NOPAL VERDURA (<i>Opuntia ficus-indica</i> Miller) .	24
3.1. Resumen.....	24
3.2. INTRODUCCIÓN.....	25
3.3 MATERIALES Y METODOS	27
3.3.1. Procesamiento en laboratorio del hongo <i>Colletotrichum</i>	28
3.3.2. Reactivación del hongo <i>Pseudocercospora</i>	30
3.3.3. Pruebas de patogenicidad	31
3.3.3.1. Cladodios para inoculación.....	31
3.3.3.2. Método de inoculación.....	31
3.3.3.3. Condiciones de incubación de los cladodios.....	33
3.4. RESULTADOS Y DISCUSION	34
3.4.1. Pruebas de patogenicidad	34
3.5. CONCLUSIONES.....	35
4. Capítulo IV ASOCIACIÓN DE UN VIRUS CAUSANTE DE MANCHAS CLORÓTICAS EN <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Miller	36
4.1. Resumen.....	36
4.2. INTRODUCCIÓN.....	37
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
4.3.1. Sitio de estudio Cuauhtepc de Hinojosa, Hidalgo	38
4.3.2. Análisis fitosanitario general	40
4.3.3. Extracción de RNA bicatenario	40

4.3.4. Determinación del rango de hospedantes.....	41
4.3.5. Purificación parcial	41
4.3.6. Microscopía electrónica	42
4.3.7. Pruebas de patogenicidad	43
4.3.8. Extracción de ARN	43
4.3.9. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR)....	44
4.3.9.1 Distribución espacial de incidencia y severidad.	46
4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	47
4.4.1. Sitio de estudio.	47
4.4.2. RNA bicatenario.	47
4.4.3. Rango de hospedantes.....	48
4.4.4. Microscopía electrónica	51
4.4.5. Pruebas de patogenicidad	51
4.4.6. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR)....	53
4.4.7. Distribución espacial de incidencia y severidad.	54
4.5. CONCLUSIONES.....	57
5 V. CONCLUSIONES GENERALES.....	58
6 VI. LITERATURA CITADA.....	59
7. Anexo 1	66

INDICÉ DE FIGURAS

- Figura 1.** Superficie sembrada y producción de nopal verdura en la república mexicana.. 5
- Figura 2.** Síntomas de “mancha negra” en nopal verdura..... 18
- Figura 3.** Síntomas relacionados con *pseudocercospora*.....26
- Figura 4.** Tipos de micelio obtenidos de *colletotrichum* a partir de síntomas de mapa de coloración rojiza colectados en campo.....29
- Figura 5.** Síntomas diversos ocasionados por virus en nopal verdura en cuautepec de hinojosa hidalgo..... 39
- Figura 6.** (a) bandas de rna bicatenario obtenidas a partir de plantas de nopal verdura. Carril 1: marcador molecular de 1kb. Carril 2: cladodios asintomáticos; carril 3: cladodios con manchas anulares cloróticas alrededor de las aereolas. (b) partículas virales obtenidas a partir del purificado parcial hecho de cladodios de nopal verdura (c1) lesiones locales necróticas en *nicotiana tabacum* var. *Xanthi*. (c2) lesiones locales cloróticas en *ch. Quinoa*. (c3) lesiones locales cloróticas en *n. Benthamiana* l..... 48
- Figura 7.** (a) electroforesis de rt-pcr obtenidos con primers específicos para potexvirus. Carril 1) marcador molecular de 1kb. Carriles 2-6 y 8-12: cladodios de nopal verdura con manchas anulares cloróticas: carril 13) tejido foliar de orquídea infectada con un potexvirus; carril 14) testigo negativo. Carril 7) vacío. (b) manchas anulares cloróticas en brotes de cladodios inoculados con savia infectiva a los 7 (b1), 14 (b2) y 25 (b3) días después de la inoculación..... 53
- Figura 8.** Datos obtenidos en el programa surfer 8 para obtener mapas de dispersión espacial de incidencia y severidad de los síntomas atribuibles a virus.....56

INDICÉ DE CUADROS

Cuadro 1. Principales variedades de nopal verdura	5
Cuadro 2. Municipios productores de nopal verdura en el estado morelos.	6
Cuadro 3. Microorganismos asociados al nopal verdura (<i>opuntia ficus-indica</i> (l) miller en tres altitudes de Tlalnepantla, Morelos.....	8
Cuadro 4. Cambios histológicos en cladodios sanos y con síntomas de <i>Pseudocercospora opuntiae</i>	10
Cuadro 5. Virus reportados en cactáceas.....	11
Cuadro 6. Números de cortes histológicos realizados en cladodios de nopal verdura sintomáticos y asintomáticos a la infección de <i>P. opuntiae</i>	21
Cuadro 7. Características de los aislamientos obtenidos de cladodios de nopal verdura colectados en Tlalnepantla, Morelos.	22
Cuadro 8. Tipo de colonias obtenidas de cladodios de <i>Opuntia ficus-indica</i> Miller, con síntomas de <i>Colletotrichum</i> en Tlalnepantla, Morelos.	30
Cuadro 9. Cepas de <i>Colletotrichum</i> empleadas para la inoculación	32
Cuadro 10. Combinaciones utilizadas para la inoculación de hongos.....	33
Cuadro 11. Síntomas en plantas indicadoras de los virus reportados en cactáceas y el virus encontrado en Cuauhtepic de Hinojosa, Hidalgo.	50

Resumen General

Etiología de un síndrome fungoso y viral en cladodios de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*)”

Berenice Alonso Barrera

Colegio de Postgraduados, 2011

El cultivo de nopal (*Opuntia ficus-indica*) presenta diversas enfermedades de importancia económica asociadas a hongos y virus. Los objetivos de esta investigación fueron: a) detectar la ocurrencia de infecciones latentes del agente causal de la mancha negra, *Pseudocercospora opuntiae* (Po), mediante estudios histológicos y evaluar la implicación sinérgica de *Colletotrichum* sp. (C) en la infección de *P.opuntiae*, y b) demostrar la naturaleza etiológica viral asociada a manchas cloróticas anulares en nopal. Con respecto al primer objetivo se evaluaron 31200 cortes histológicos provenientes de 78 cladodios sintomáticos colectados en siete fechas de muestreo comprendido en el periodo, junio-agosto, caracterizado por alta incidencia de mancha negra. Adicionalmente, en septiembre se efectuaron dos muestreos seleccionando cladodios con síntomas de mancha negra y lesiones de coloración rojiza atribuible a *Colletotrichum* sp. Los hongos de interés se aislaron y se emplearon en pruebas de patogenicidad en 24 cladodios sanos mediante la aspersión de 6×10^4 y 2×10^5 de *P.opuntiae* y *Colletotrichum* sp., respectivamente, en los tratamientos Po+C, Po y C. En los cortes histológicos realizados no fue posible encontrar hifas, micelio o estructuras reproductivas del hongo. Tampoco se detectaron alteraciones de los tejidos estructurales y vasculares de la planta, lo sugiere que el hongo no genera infecciones latentes. Por otro lado, en las pruebas de patogenicidad a 150 días después de inoculación (ddi) los cladodios no presentaron síntomas en ninguno de los tratamientos de Po+C, Po y C, lo cual indica que el estudio sinérgico fue inconcluso.

En relación al segundo objetivo se seleccionaron 50 cladodios con síntomas de halos cloróticos alrededor de areolas provenientes de Cuautepec de Hinojosa, Hidalgo. A partir del tejido sintomático se realizó la purificación parcial del putativo agente viral, microscopia electrónica, inoculación de plantas indicadoras, transmisión mecánica y rt-PCR. Adicionalmente, se evaluó la distribución espacial de incidencia y severidad en condiciones de campo para determinar el nivel de ocurrencia de la enfermedad. El purificado parcial demostró la presencia de un agente de tipo viral, este se transmitió mecánicamente a 11 plantas indicadoras. En *Quenopodium quinoa* causó limitada infección sistémica en nervaduras y manchas amarillas en el área internerval. El virus se transmitió exitosamente a 43% de cladodios inoculados reproduciendo halos cloróticos 7ddi y manchas cloróticas e irregulares a los 25 ddi. El análisis electroforético mostró que el virus aislado de plantas de nopal tuvo un genoma de ARN de cadena simple, mientras que al microscopio electrónico se observó un alto número de partículas virales en forma de varilla flexible. El ensayo de rt-PCR confirmó que el virus es una especie del género *Potexvirus*. Las características biológicas de este virus sugieren que es una variante relacionada con la especie *Cactus virus X*. En campo, este virus causó una incidencia de 47-60% y severidad de 51-79% con una distribución espacial claramente agregada con fuerte direccionalidad en sentido de los surcos. Este es el primer reporte de un *Potexvirus* en nopal verdura en México.

Palabras clave. *Pseudocercospora*, *Colletotrichum*, Virus, Infección latente, Sinergismo.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. El cultivo del nopal

Los nopales pertenecen al género *Opuntia*. Estas plantas fueron utilizadas desde épocas prehispánicas, siendo un elemento de desarrollo exclusivo al pueblo y cultura de México desde tiempos inmemoriales. Por ejemplo, el nombre Tenochtitlán, significa fruta de piedra (Tetl, que es piedra, y de Nochtli, fruta); los aztecas, que fueron los que más emplearon esta planta, le dieron el nombre de "Nochtli" o "Nopalli" a la fruta ahora conocida como tuna. El árbol (cardo), que lleva esta fruta o Nochtli, se llamó entre los indígenas mexicanos nopal, se ha utilizado como sustrato para cultivar un insecto del género *Dactylopius* spp o "Cochinilla de nopal" o "Grana", del cual extraían un tinte para teñir textiles (Ramos y Quintana, 2004).

El nopal no sólo tiene importancia en los aspectos socioeconómicos, sino también agroecológicos, ya que como cerca viva y como cultivo permite la conservación del suelo, pues protege la capa fértil contra la erosión. Así mismo, los cladodios retienen partículas orgánicas que mueve el aire, las cuales resbalan por su superficie hasta el suelo o bien se quedan en los entrenudos a partir del cual la lluvia las arrastra al suelo (Granados y Castañeda, 1997).

Un aspecto importante de la producción del nopal es que en general las plantaciones, tanto para producir tuna como nopalito, se encuentran localizadas en áreas marginales caracterizadas por suelos pobres y/o climas áridos o semiáridos. Por esta razón, el nopal verdura es adecuado para soportar escasa y errática precipitación pluvial (Gallegos, 2003).

La rusticidad del nopal, su bajos requerimientos de humedad y nutrientes, lo califican como un cultivo altamente adecuado para ser considerado en programas alternativos de reconversión productiva (Valdez *et al.*, 1995).

En la actualidad, México es el primer productor de nopal verdura. En el 2005 el país contaba con 10 mil 900 ha sembradas en comparación de otros países, como E.U.A, que en el 2003 solo sembraba 200 ha (SIAP-SAGARPA, 2010); sin embargo, Brasil es el país que tiene mayor superficie con 600,000 ha, no obstante el propósito es como forraje (Torres, 2010). Los principales estados productores de nopal verdura son: Morelos, Edo. México, Tamaulipas, San Luis Potosí, Baja California, Zacatecas, Michoacán, Aguascalientes, Guanajuato y Puebla entre otros (SIAP-SAGARPA, 2010). El Distrito Federal es el principal productor con la mayor superficie sembrada (Figura 1) (SIAP-SAGARPA, 2010). Los principales cultivares que existen en la República Mexicana los menciona Valdez *et al.* (1995) (Cuadro 1).

La zona productora de nopal verdura en el municipio de Tlalnepantla involucra una superficie aproximada de 100km², con relieve accidentado y diferencia en altitud de la parte alta con respecto a la parte más baja de aproximadamente 800m lo que repercute en componentes del clima como temperatura y humedad relativa (Hernández, 2008a).

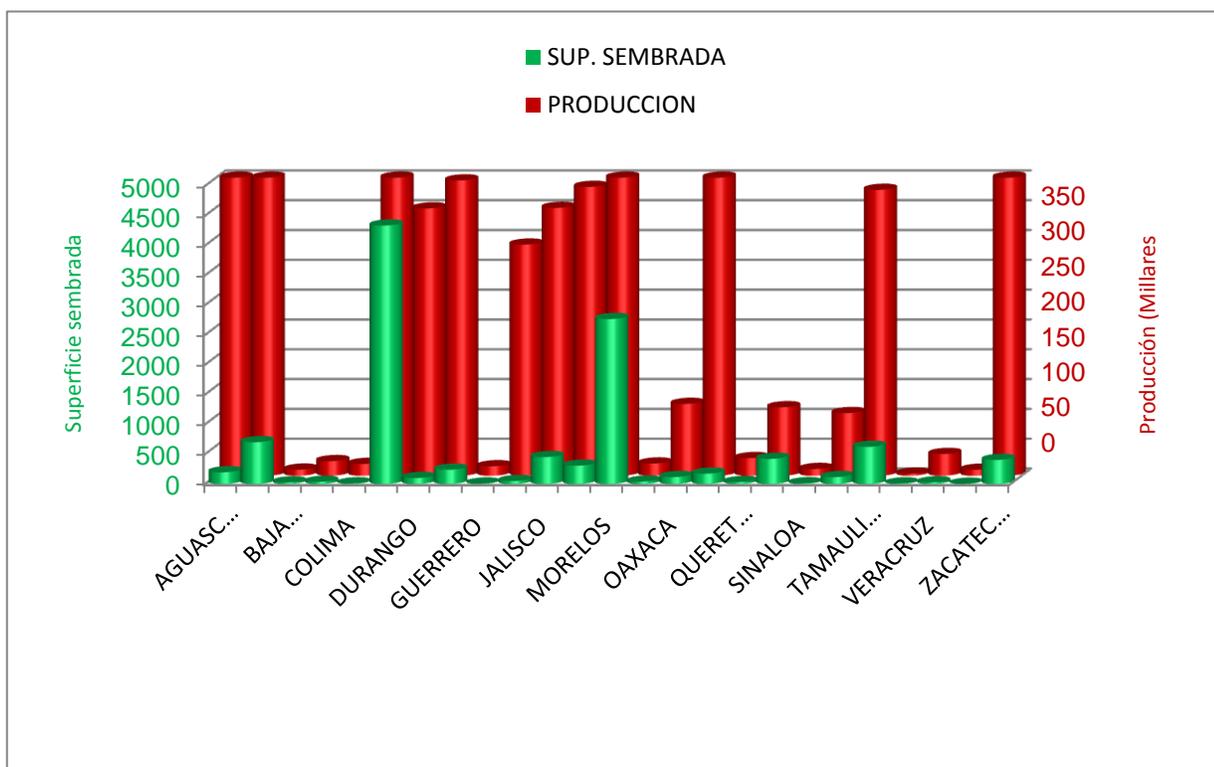


Figura 1. Superficie sembrada y producción de nopal verdura en la República Mexicana.

Fuente: SIAP-SAGARPA, 2010.

Cuadro 1. Principales variedades de nopal verdura (Valdez *et al.*, 1995).

Cultivares	Entidad de Producción	Especie
Milpa Alta	Distrito Federal, Morelos	<i>Opuntia ficus indica</i>
Atlixco	Puebla, Edo de México	
Copena V1	Edo de México, Baja California, San Luís Potosí, Sonora, Hidalgo	
Copena F1	Edo de México, Sonora, Baja California	<i>Nopalea cochinifera</i>
Moradilla	Edo de México	
Blanco	Michoacán	
Negro	Michoacán, Guanajuato	
Polotitlan	Edo de México	
Tamazunchale	San Luís Potosí, Hidalgo	
Tapón	Sn Luís Potosí, Guanajuato, Zacatecas, Durango, Aguascalientes, Jalisco, Querétaro	<i>Opuntia, robusta</i>

1.2. El cultivo del nopal en Tlalnepantla, Morelos

En el estado de Morelos, el municipio de Tlalnepantla tiene la mayor superficie sembrada de nopal verdura (Cuadro 2) (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2007). Esta región posee 90% de la superficie establecida en todo el estado. El sistema de producción de nopal se realiza con tecnología regional generada durante 25 años por los productores. (Gijón *et al.*, 2007). Esta actividad es rentable y está en constante crecimiento (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2007).

Cuadro 2. Municipios productores de nopal verdura en el estado Morelos.

Municipio	Superficie Ha	No. de Predios	No. de Productores
Tlalnepantla	389.326	697	373
Tlayacapan	89.029	169	109
Totolapan	40.79	69	46
Tepoztlan	21.366	54	37
Total	541.046	990	565

Entre las organizaciones de nopaleros se encuentra el Consejo Municipal de Nopaleros de Tlalnepantla (COMUNOTLA) el cual aglutina el 80% de los productores. La capacidad de producción del COMUNOTLA, es de 6 mil toneladas mensuales, restringiendo su producción a seis meses del año debido a la reducción en el precio de comercialización y restricción de mercados (GIIN, 2005).

En esta localidad el 90% de la población tiene al nopal como cultivo primario porque genera un alto nivel de ingresos, principalmente en otoño e invierno, cuando escasea en otras entidades productoras (Ramos, 2004). El impacto socioeconómico regional del nopal se

evidencia en una baja migración laboral hacia centros urbanos u otros países (Gijón *et al.*, 2007).

1.3. Enfermedades del nopal

El nopal, tiene diversos problemas fitosanitarios, enfermedades y plagas en el sistema de raíz cladodios y frutos.

En diversas evaluaciones y diagnósticos llevados a cabo en diferentes regiones de nuestro país los resultados señalan, que la incidencia y severidad de algunas enfermedades puede llegar hasta un 90% lo cual causa una drástica reducción de la productividad, si no son manejadas adecuadamente. Por esta razón el método más apropiado y económico para evitar este nivel de daño, es prevenir la infección de plantas (Méndez *et al.*, 2008; Gijón *et al.*, 2007; GIIN, 2005)

Ayala *et al.*, 2006; Quezada *et al.*, 2005 mencionan que una de las enfermedades más importantes en el nopal es la mancha negra causada por el hongo *Pseudocercospora opuntiae*, la cual fue detectada en 1990 en Tlalnepantla, Morelos y es la principal causa de la baja productividad y de pérdida total en algunas huertas. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de mancha negra circular y en forma de mapa.

1.4. Principales enfermedades del nopal en Tlalnepantla, Morelos

En Tlalnepantla, Morelos se han encontrado diversos problemas sanitarios en el nopal, ocasionados principalmente por hongos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Microorganismos asociados al nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Miller) en tres altitudes de Tlalnepantla, Morelos (GIIN, 2005).

Patógeno	Nombre común	Síntoma	% de Incidencia		
			Zona Alta >2200msnm	Zona Media 1900-2200msnm	Zona Baja 1600-1900 msnm
<i>Pseudocercospora opuntiae.</i>	Mancha Negra	Mancha circular acuosa, en su etapa avanzada ocasiona desprendimiento del tejido dejando orificios que atraviesan la penca	52.3	48.10	26.7
<i>Phoma</i> sp. ¹	Mancha hundida	Manchas hundidas y oscuras en su estado avanzado se agrandan y ennegrecen y a la vez forman ampollas.	30.82	45.61	13.1
<i>Alternaria</i> sp. ¹	Mancha de oro	Costras de color amarillento.	24.29	12.23	10.3
<i>Macrophomina.</i> ¹	Pudrición negra	Podredumbre semi-acuosa de color negro.	13.00	18.65	4.17
<i>Erwinia.</i> ¹	Necrosis bacteriana	Pudrición suave	4.92	1.43	1.76
<i>Colletotrichum</i> sp.	Antracnosis	Manchas circulares color café con tonalidades rojizas.	No localizada		

¹Todos los organismos se encontraron asociados. No hubo pruebas de patogenicidad comprobatorias en el trabajo del GIIN.

1.5. Detección de infecciones latentes

Uno de los aspectos que se debe tomar en cuenta de una enfermedad es la producción de infecciones latentes, debido a que las bacterias, virus u hongos pueden permanecer vivos sin multiplicarse y sin dar manifestación de enfermedad (Alcala, 1995). Actualmente no existen estudios que muestren que la mancha negra causada por el hongo *P. opuntiae* genere infecciones latentes. Este hongo es el principal problema fitosanitario en la zona de Tlalnepantla Morelos (Hernández, 2008b; Ayala *et al.*, 2006; Quezada *et al.*, 2006). Este patógeno tiene un periodo de incubación relativamente largo que es de 90 a 104 días en condiciones artificiales (Quezada *et al.*, 2006; Ayala *et al.*, 2006). Debido a esto es necesaria la detección oportuna de las infecciones latentes a fin de establecer una eficaz estrategia de control como lo demostró Zarco *et al.* (2007) en un estudio realizado en plantaciones de olivo.

En el caso específico de *P. opuntiae*, en Tlalnepantla, Morelos esta enfermedad presenta una baja incidencia en verano, mientras que en otoño y principios de invierno la incidencia es alta. En este sentido el invierno es el periodo más adecuado para detectar la posible presencia de infecciones latentes (Hernández, 2008b).

Se han reportado técnicas diferentes para la detección de infecciones latentes; por ejemplo, Cerkauskas y Sinclair (1980), citan que el uso de Paraquat aplicado directamente al 11.64% en los tejidos de la soja estimuló la aparición de micelio e indujo la formación de lesiones y estructuras de fructificación de al menos cuatro agentes patógenos de la soja. En contraste, Klingelfuss (2001) al realizar un estudio de infecciones latentes de *Colletotrichum truncatum* y

Cercospora kikuchii en soya también con el mismo método no obtuvo resultados favorables. Esto quizá se debió a temperaturas elevadas y sequía en el momento de la prueba pudo haber afectado el desarrollo de la enfermedad.

En otro estudio se identificaron latentes en olivo mediante la utilización de hidróxido sódico (NaOH) con este producto se ocasiono la oxidación de los compuestos fenólicos los cuales se acumulan en las zonas afectadas con síntomas de manchas oscuras, de esta forma se permito la expresión de infecciones latentes mediante la producción de micelio del hongo *Spilocaea oleagina* (Zarco *et al.*, 2007).

Otra técnica para detectar infecciones latentes son los cambios histopatológicos que presenta el hospedante (Quezada, 2005) (Cuadro 4). En otros estudios histológicos Gassó *et al.*, (2010) determinaron la importancia que tiene el realizar cortes histológicos para visualizar el hongo en las diferentes estructuras de la planta.

Cuadro 4. Cambios histológicos en cladodios sanos y con síntomas de *P. opuntiae*.

Estructuras	Sano	Enfermo
Poros estomáticos	Micelio (-)	Micelio (+)
Células de la epidermis	Micelio (-)	Micelio (+)
Cavidades subestomáticas	Micelio (-)	Micelio (+)
Colénquima	Micelio (-)	Micelio (+)
Clorénquima	Micelio (-)	Micelio (+)
Parénquima	Micelio (-)	Micelio (+)
Pared celular	Plasmólisis(-)	Plasmólisis (+)
Membrana	Plasmólisis (-)	Plasmólisis (+)
Sistema vascular	Micelio(-)	Micelio (+)
Floema	Micelio (-)	Micelio (+)
Xilema	Micelio (-)	Micelio (+)
Parénquima medular	Degradación y presencia de micelio (-)	Degradación y presencia de micelio (+)

1.6. Virus reportados en cactáceas

Se han encontrado varios virus que afectan a las plantas de nopal tanto silvestre como cultivadas. Las características morfológicas así como pruebas moleculares han servido de base para su identificación y diagnóstico (Cuadro 5).

Cuadro 5. Virus reportados en cactáceas.

Nombre del virus	Genero del virus	Forma de la partícula viral	Longitud	Hospedante	Transmisión
Hidalgo	<i>Potexvirus</i>	Flexible	112 x 24nm	Nopal verdura	Mecanicamente
<i>Opuntia Sammons' virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	Varilla rígida	300-350 nm	Nopal tunero <i>Opuntia amyclaea</i>	Mecanicamente
<i>Cactus Virus X</i>	<i>Potexvirus</i>	Flexible	520nm	Tuna forrajera <i>Nopalea cochenilifera</i>	Mecanicamente
<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	Varilla rígida	302± 5nm	<i>Opuntia basilaris</i>	Mecanicamente
<i>Cactus virus 2</i>	<i>Carlavirus</i>	Filamentosa	650nm	Cacataceas	Mecanicamente
<i>Zygocactus virus</i>	<i>Potexvirus</i>	Flexible	519nm	<i>Zygocactus truncatus</i>	Mecanicamente
<i>Saguaro cactus virus</i>	<i>Carmovirus</i>	Isocaedrica	32nm	<i>Carnegiea gigantea.</i>	Mecanicamente
<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>	<i>Toposvirus</i>	Helicoidal	80-120 nm	Cacataceas	Insecto/Antropodo

1.7. HIPÓTESIS

Hipótesis 1:

El micelio de *P. opuntiae* permanece viable en los cladodios de nopal verdura como infección latente a partir del cual se inicia el proceso de patogénesis en condiciones de temperatura y humedad relativa adecuadas causando la enfermedad conocida como mancha negra.

La patogénesis de *P. opuntiae* puede favorecer por el efecto sinérgico de *Colletotrichum* sp induciendo un síndrome conocido como mancha mapa de amplia cobertura en el cladodio.

Hipótesis 2:

Las manchas anulares alrededor de las areolas o entre ellas que se manifiestan de un color amarillo claro en cladodios pequeños y amarillo intenso en cladodios maduros, y en algunos casos cubrían todo el cladodio fueron encontradas en cladodios de nopal verdura en Cuatepec de Hinojosa, Hidalgo y son ocasionados por un virus tipo RNA efectivo en transmisión mecánica.

1.8. OBJETIVOS

- Realizar estudios histológicos para la detección de infecciones latentes del agente causal de la mancha negra (*Pseudocercospora opuntiae*) en nopal (*Opuntia ficus-indica* Miller) y evaluar la implicación de *Colletotrichum* sp. en el síndrome de la mancha negra en el nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Miller).
- Demostrar la naturaleza etiológica viral asociada a manchas cloróticas anulares en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Miller) en Cuatepec de Hinojosa, Hidalgo.

CAPÍTULO II

DETECCIÓN DE INFECCIONES LATENTES DE *Pseudocercospora opuntiae* EN NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* Miller)

2.1. RESUMEN

La mancha negra, causada por *P. opuntiae*, es la principal enfermedad fungosa del nopal verdura en Tlalnepantla, Morelos. Un aspecto fundamental en el manejo de la enfermedad constituye el conocimiento de infecciones e/o inóculo latente en la planta, por el carácter perenne del tejido infectado y la intensa remoción de tejido vía podas que permanece en el suelo. Por ello el objetivo de este trabajo fue realizar estudios histológicos para la detección de infecciones latentes del agente causal de la mancha negra en nopal. Se realizaron muestreos de campo en forma dirigida a cladodios con lesiones nuevas junto a lesiones viejas del hongo en estudio. De estas muestras se realizaron cortes de forma radial de 1cm² que incluía tejido de las lesiones viejas hasta llegar a las lesiones nuevas para posteriormente realizar una tinción. Se realizaron 6240 laminillas, estas contenían cuatro a cinco cortes y se observaron cinco campos visuales de cada corte. En los resultados que se obtuvieron no fue posible encontrar micelio o hifas del hongo, esto sugiere que la fuente de inóculo no es el micelio que permanece de forma latente si no la esporulación proveniente de cladodios con lesiones viejas con crecimiento activo o a partir de cladodios eliminados mediante poda.

Palabras clave: inóculo, histología, micelio.

2.2. INTRODUCCIÓN

En 1990 se registró en Tlalnepantla, Morelos la enfermedad denominada “Mancha negra”, causada por *P. opuntiae* (Quezada *et al.*, 2006; Ayala *et al.*, 2006). Este hongo daña los cladodios del nopal verdura (*O. ficus-indica*) causando inicialmente una mancha circular acuosa y en etapas avanzadas de la infección ocasiona desprendimiento del tejido dejando orificios que atraviesan la penca, lo cual ocasiona problemas productivos. La incidencia de esta enfermedad se ha incrementado con el tiempo (GIIN 2005; Osada y Carcamo, 1991) por lo que diversos trabajos etiológicos y epidemiológicos se han realizado en esta región (Hernández, 2008b; Quezada *et al.*, 2006; Ayala *et al.*, 2006; GIIN 2005; Gijón, 1996).

Como consecuencia de la infección de *P. opuntiae* a nivel histológico se reportan alteraciones del tejido vegetal asociadas a diferentes síntomas (Quezada, 2005). En general, el micelio se observó en parénquima de almacenamiento, en las células del haz vascular y en la parénquima medular además la cantidad de micelio se incrementó de acuerdo a la severidad del síntoma. En manchas oscuras se encontró micelio en estomas, parénquima de almacenamiento y parénquima medular (Quezada, 2005).

En estudios histológicos de otras especies del mismo género, se ha detectado solo el desarrollo de micelio. Mendoza *et al.*, (2005) observaron la penetración de hifas a través de los estomas y el desarrollo de microlesiones asociadas con el avance de *Pseudocercospora fijiensis* en banano. Se comprobó la existencia de micelio epifítico en la superficie de la hoja en cultivares susceptibles antes del proceso de penetración.

En un estudio epidemiológico de la mancha negra en nopal verdura en Tlalnepantla Morelos, Hernández (2008b) observó en 12 plantas un máximo acumulado de 187 manchas a 40 días de duración de la epidemia, lo que sugirió una baja eficiencia de inóculo y/o reducida densidad del mismo en el aire. En este mismo trabajo se estableció la posibilidad de que las infecciones latentes podrían estar involucradas en el proceso de infección para iniciar el progreso de la epidemia en el siguiente ciclo productivo.

Con el propósito de contribuir al desarrollo de estrategias de control químico con un sustento biológico en este capítulo se planteo estudiar la implicación de infecciones latentes de *P. opuntiae* en nopal verdura en el desarrollo epidémico a través de estudios histológicos con el propósito de contribuir al desarrollo de estrategias de control químico con un sustento biológico.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1. Muestreo en campo

Los muestreos se realizaron en dos lotes comerciales de nopal verdura en Tlalnepantla, Morelos.

Siete salidas al campo, las muestras se realizaron semanalmente en los meses de junio, julio y agosto ya que este se había sugerido como inductivo de infecciones latentes en ese periodo de tiempo (Hernández, 2008b).

El muestreo en dos parcelas en Tlalnepantla Morelos (Parcela 1 y Parcela 2) con plantas de entre cinco y 10 años de edad. Se hicieron siete muestreos en forma dirigida a cladodios con síntomas, en cada uno se colectaron entre cinco y 15 cladodios que presentaran los siguientes síntomas:

Lesiones nuevas las cuales se caracterizan por ser una mancha clorótica aproximadamente 1 cm de diámetro junto a lesiones viejas identificadas por manchas irregulares negras y secas las cuales pueden desprenderse dejando huecos en el cladodio (Figura 2A). Lesiones de apariencia corchosa, son lesiones viejas con el tejido hundido y seco (Figura 2B). Lesiones viejas (Figura 2C) todas las muestras obtenidas se procesaron en el laboratorio de histopatología vegetal del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, México.

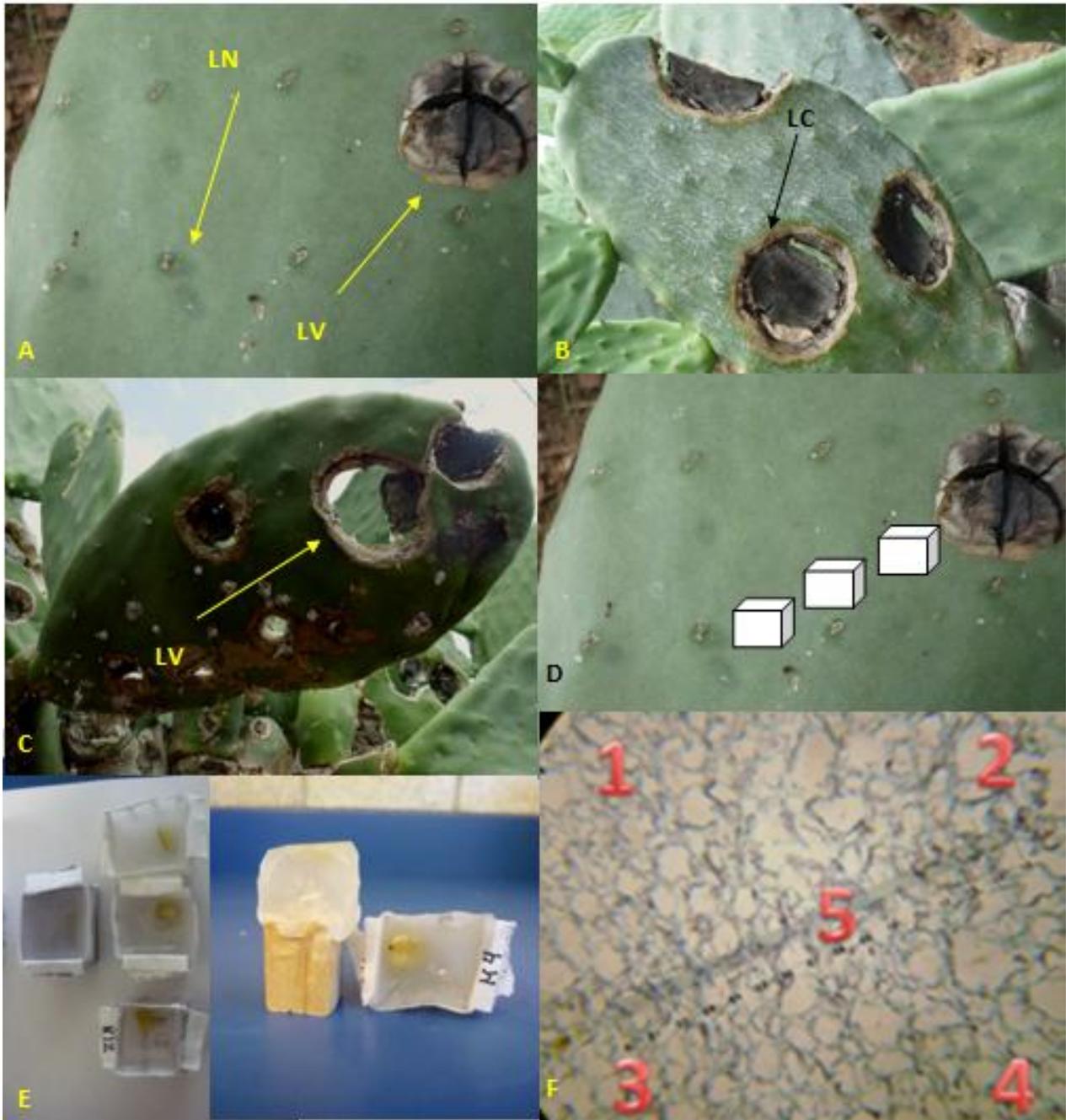


Figura 2. Síntomas de “Mancha Negra” en nopal verde. LV: Lesiones viejas, LN: Lesiones nuevas, LC: Lesiones corchosas en Tlalnepantla Morelos. (A) Lesiones nuevas junto a lesiones viejas. (B) Lesiones de apariencia corchosa (C) Lesiones viejas (D y E) Metodología de obtención de muestras de tejido vegetal para la detección histológica de infecciones latentes. de nopal verde de donde se tomaron las cuatro trozos de 1cm² distribuidos entre lesiones viejas y nuevas para los cortes histológicos (F) Numero de campos visuales observados en los cortes histológicos de cladodios de de nopal verde.

2.3.2. Proceso en laboratorio

De las muestras colectadas se realizaron cortes continuos de forma radial de 1cm² iniciando de las lesiones viejas hasta llegar a las lesiones nuevas. Posteriormente se fijaron los trozos en FAA (500 ml de etanol 95%, 100 ml de formaldehido, 350 ml de agua destilada y 50 ml de acido acético glacial) durante 24 h, transcurrido el tiempo se lavaron con agua cada 15 min, posteriormente se colocaron en frascos etiquetados con fecha de colecta, parcela, número de muestra y número de repetición donde pasaron por diferentes concentraciones de alcohol etílico (50, 70, 96, y 100%), alcohol absoluto-xileno (1:1) y en paraplast. En cada solución se mantuvieron durante tres horas, los tejidos se retiraron de sus frascos y se colocaron en cubos de papel individual para agregar parafina fundida. Una vez sólidos los cubos se montaron en soportes de madera para ser sostenidos en el micrótopo rotatorio y hacer los cortes de 10 µ de grosor, estos se suspendieron en agua con grenetina a una temperatura de 55°C y se montaron en portaobjetos (Quezada, 2005).

2.3.3. Tinción

Los cortes se pasaron por tres cambios de xileno de tres minutos cada uno posteriormente se hidrató con dos cambios de alcohol (96% y 100%) Después se tiñeron con la técnica de tinción doble safranina (metilcelosolve)-verde rápido (López *et al.*, 2005) y se observaron al microscopio de luz para identificar la presencia de micelio o hifas que pudieran asociarse a infecciones latentes en cladodios de nopal verdura.

De un total de 78 cladodios en siete fechas de muestreo se obtuvieron 312 trozos, tomando cuatro trozos entre la lesión joven y vieja (Figura 2D) se realizó en total 6240 laminillas, estas laminillas tenían de cuatro a cinco cortes y de estos cortes se tomó en cuenta cinco campos visuales (Figura 2F).

Para verificar que el micelio observado en los cortes fuera el hongo de interés se tomó un trozo de cada muestra colectada y se guardó en frascos de vidrio de 5x2 cm y se colocó en refrigeración, para su extracción de DNA. Así mismo de cada las muestras se tomaron tres trozos de nopal adicionales a los de histología y a los trozos tomados para extracción de DNA y se sembraron en PDA, para confirmar la posible presencia de micelio en los tejidos. En caso de obtener crecimiento micelial se separó y se sembró nuevamente en cajas con PDA.

2.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 6240 laminillas que se observaron no se encontró ningún tipo de micelio o hifa (Cuadro 6).

Cuadro 6. Números de cortes histológicos realizados en cladodios de nopal verdura sintomáticos y asintomáticos a la infección de *P. opuntiae*.

Fecha de colecta	Número de cladodios colectados	Clave	Parcela	Total de trozos	Laminillas	Cortes	Micelio	Hifa
29-06-2009	10	M1-M10	Parcela 2	40	800	4000	-	-
06-07-2009	15	M11-M25	Parcela 1 y 2	60	1200	6000	-	-
13-07-2009	10	M26-M36	Parcela 1	40	800	4000	-	-
20-07-2009	15	M37- M52	Parcela 1 y 2	60	1200	6000	-	-
27-07-2009	5	M53-M57	Parcela 1	20	400	2000	-	-
03-08-2009	11	M58-M68	Parcela 1 y 2	44	880	4400	-	-
10-08-2009	12	M69-M80	Parcela 2	48	960	4800	-	-

Según Hernández (2008b), basado en un estudio de campo en la misma región donde se realizó el presente trabajo, existe un posible ciclo secundario de infección que se puede presentar en otoño con expresión epidémica de baja intensidad a finales de invierno, en esta etapa, la humedad relativa decrece notoriamente (de 90 a 40%). Esto establece la posibilidad de infecciones latentes como otro mecanismo de inducción patogénica en adición a esporas aéreas. Sin embargo, en el presente trabajo no se logro obtener información para soportar la hipótesis, porque no se encontraron estructuras que confirmaran la presencia del hongo.

En otros estudios histológicos con *P. opuntiae* si se ha encontrado micelio pero directamente asociados al tejido enfermo (Quezada, 2005). En nuestro estudio los trozos se cortaron entre las lesiones viejas y nuevas por lo que el énfasis fue el tejido aparentemente sano con el fin de detectar micelio latente en estas zonas. Tejido enfermo eventualmente se destruye y se desprende de la planta por lo que se hipotético la permanencia de micelio en el tejido circundante a la lesión.

Los resultados de los aislamientos presentaron micelio de diferente color (Cuadro 7) los cuales se identificaron de acuerdo a claves taxonómicas y se descartó la posibilidad de obtener *Pseudocercospora opuntiae*.

Cuadro 7. Características de los aislamientos obtenidos de cladodios de Nopal verdura colectados en Tlalnepantla, Morelos.

Muestra	Número de trozos sembrados	de Micelio	Hongo
1-20	-	-	-
21-26,53,35-43	42	Amarillento	<i>Aspergillus</i> Barnett y Hunter (1998)
27-30, 44-53, 68-70	42	Gris intenso	<i>Alternaria</i> Barnett y Hunter (1998)
31-34, 54-67, 70-84	90	Rosado	<i>Fusarium</i> Barnett y Hunter (1998)

2.5. CONCLUSIONES

No fue posible encontrar micelio o hifas del hongo *P. opuntiae* en los cortes histológicos realizados con material de campo colectado entre junio-agosto. Esta evidencia sugiere que la enfermedad de la mancha negra se desarrolla a partir de inóculo liberado en las fases de esporulación. Estos resultados sugieren que una fuente de inóculo principal podría ser a partir de lesiones viejas en cladodios con crecimiento activo o a partir de cladodios eliminados mediante poda por el productor y que se quedan en el cultivo, esta es una práctica de manejo regional común para formar estructuralmente la planta, con fines fitosanitarios o para regular la producción. Por lo tanto, la eliminación de residuos de podas deben ser incorporados a un programa de manejo de la mancha negra. Sin embargo se recomienda realizar estudios en condiciones controladas en cámaras bioclimáticas para confirmar estos resultados.

CAPÍTULO III

IMPLICACIÓN DE *Colletotrichum* sp. EN EL SÍNDROME DE LA MANCHA NEGRA (*Pseudocercospora opuntiae*) EN EL NOPAL VERDURA (*Opuntia ficus-indica* Miller).

3.1. Resumen

La mancha negra ocasionada por el hongo *Pseudocercospora opuntiae* representa un problema complejo por su posible interacción con otros fitopatógenos afectando la productividad. Aunado a esto la típica mancha negra se ha encontrado asociada con otras manchas de apariencia acuosa, con márgenes de color rojizo, y considerando que previamente se encontró en nopal a *Colletotrichum*, es primordial evaluar la implicación de este patógeno en el síndrome de la mancha negra. Para ello se realizó el muestreo de forma dirigida a cladodios que presentaron dicha asociación de síntomas, estas muestras se procesaron en laboratorio para obtener el propágulo de cada hongo, a su vez se sembraron pencas de nopal sanas en sustrato con 50% tezontle y 50% peat moss para realizar las pruebas de patogenicidad. La inoculación de los hongos fue por el método de aspersión, posteriormente se realizaron diluciones para ajustar la concentración de propágulos, siendo para *Pseudocercospora* 6×10^4 UFC/ml y para *Colletotrichum* 2×10^5 UFC/ml. Se utilizaron tres pencas por cada cepa y para la combinación de las mismas manteniéndose a 18°C con 12 h de luz. Los resultados obtenidos mostraron que 150 días después de la inoculación los cladodios no presentaron síntomas típicos de la mancha negra ni síntomas de asociación con *Colletotrichum* por lo cual es posible descartar un sinergismo entre los hongos estudiados.

Palabras clave: sinergismo, hongos fitopatógenos, asociación.

3.2. INTRODUCCIÓN

En la región alta de Tlalnepantla, Morelos la incidencia de mancha negra alcanza un nivel de incidencia hasta del 52.3%, y tiene un carácter edemico (Hernández, 2008a). El agente causal de la mancha negra de nopal fue identificado como *P. opuntiae* (Quezada *et al.*, 2006; Ayala *et al.*, 2006).

En algunas áreas de Tlalnepantla se ha encontrado la típica mancha negra (Figura 3A), asociada con otras manchas de apariencia acuosa y con márgenes de color rojizo (Figura 3B). Aunque no se han encontrado ampliamente diseminado este síndrome posiblemente existe un efecto de asociación entre estos dos problemas. Dado que la naturaleza de la mancha rojiza es más pequeña que la mancha negra (que se atribuye a *P. opuntiae*) el causante de la infección primaria dejando en un papel secundario a diferentes hongos. Previamente se encontraron en nopal a *Alternaría* y *Colletotrichum* por el tipo de manchas (Hernández 2008b; Quezada *et al.*, 2006; Montiel *et al.*, 2004; Herrera *et al.*, 2003).

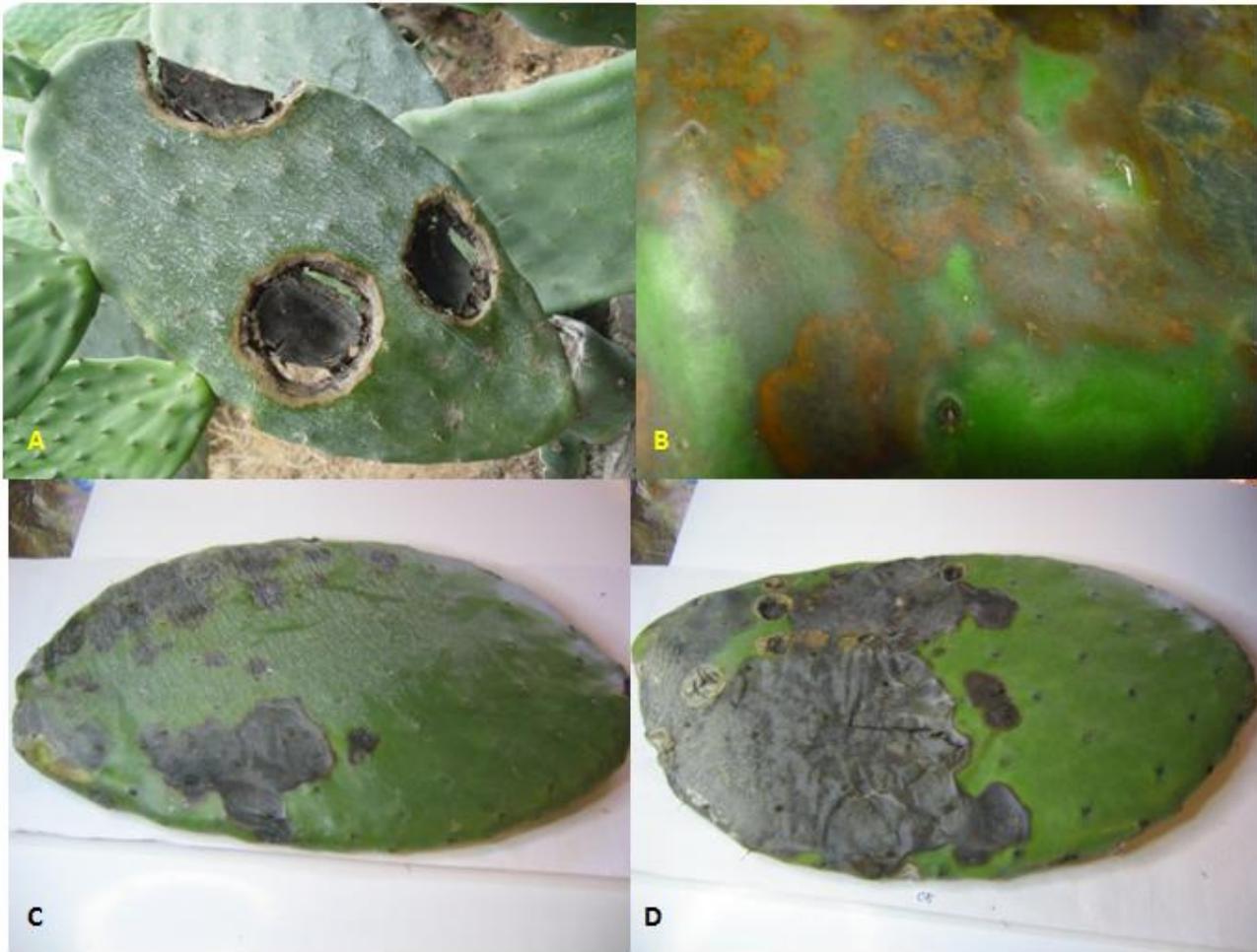


Figura 3. Síntomas relacionados con *Pseudocercospora*. (A) Síntomas de Mancha negra *Pseudocercospora opuntiae* en nopal verdura en Tlalnepantla, Morelos. (B) Manchas de coloración rojiza asociadas a *Pseudocercospora* y *Colletotrichum* en nopal verdura en Tlalnepantla. (C y D) Síntomas de Mancha negra tipo mapa en nopal verdura en diferente grado de severidad.

Quezada *et al.* (2006) encontraron 83 aislamientos asociados a los síntomas de mancha negra de los cuales un 76% se identificó como *Colletotrichum* sp. inicialmente, no obstante formo tres grupos de estos aislamiento de acuerdo al color del micelio entre ellos están el micelio abundante y algodonoso color salmón pálido, sin presencia de anillos, el micelio abundante y algodonoso, color blanco-rosado, anillos de color gris y por ultimo un micelio abundante y algodonoso, color salmon-rosado con anillos de color gris, por otra parte de haber identificado a *Colletotrichum gloeosporioides* en nopal verdura en Tlalnepantla, Morelos, pero solamente describió a *Pseudocercospora* como causante de la enfermedad de mancha. De la misma manera Ayala *et al.* (2006) únicamente reportan a *P. opuntiae* asociado a manchas negras de nopal silvestre y cultivado (*Opuntia* sp). Con base a lo anterior se propuso la presente, investigación con el objetivo de evaluar alguna probable implicación de *Colletotrichum* sp. en el síndrome de la mancha negra en el nopal verdura.

3.3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó el dos muestreos de forma dirigida a cladodios que presentaron el síntoma que se asocia a *Colletotrichum* (Figura 3B) las pencas se colocaron en bolsas de papel etiquetadas para su transporte, y se procesaron en el Colegio de Postgraduados, el muestreo se realizó durante septiembre de 2008 en Tlalnepantla, Morelos la colecta se realizo en dos parcelas ubicadas en la parte alta del lugar de estudio, tomando 16 trozos de cladodios con los síntomas antes mencionado.

Para el hongo *Pseudocercospora* se reactivó una cepa proporcionada por el Laboratorio de Parasitología de la Universidad Autónoma de Chapingo.

3.3.1. Procesamiento en laboratorio del hongo *Colletotrichum*

A partir de cladodios sintomáticos de campo se cortaron trozos del tejido vegetal que incluyo el área marginal de la zona de avance del síntoma de *Colletotrichum*, se lavó con agua corriente, se continuo con un proceso de lavado con hipoclorito de sodio al 3% (Quezada *et al.*, 2006). El exceso de cloro se eliminó mediante dos lavados con agua estéril y secado con sanitas. Se sembraron de 5-10 trozos de tejido vegetal con síntomas por caja *petri* con medio de cultivo papa destroza agar (PDA). Un segundo trozo de tejido vegetal de 2x2 cm se colocó en un tubo de ensayo con agua destilada estéril dejándolo reposar durante 10 min, posteriormente la solución se inoculó en el medio de cultivo para detectar posible presencia de bacterias (Gijón, 1996) a partir de los diferentes tipos de micelio (Figura 4) se procedió a separar las colonias.

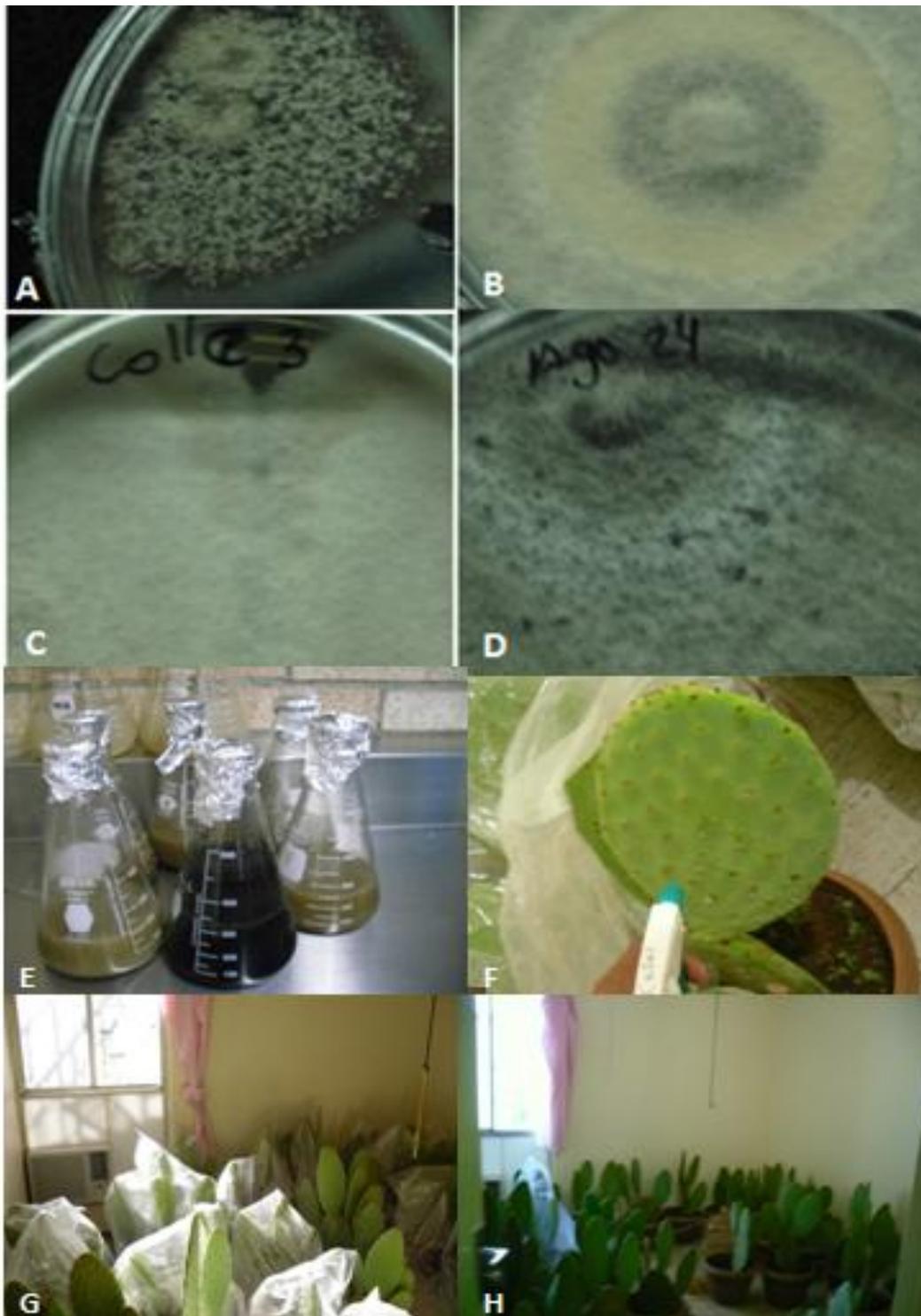


Figura 4. Tipos de micelio obtenidos de *Colletotrichum* a partir de síntomas de mapa de coloración rojiza colectados en campo. (A) Cepa de color gris/crema. (B) Micelio abundante color durazno/gris claro algodonoso. (C) Micelio abundante color gris claro algodonoso. (D) Micelio abundante color gris claro. (E) Cepas de *Colletotrichum* en medio líquido papa dextrosa, obtenidas de síntomas de mancha con coloración rojiza en nopal verdura colectadas en Tlalnepantla, Morelos. (F) Inoculación de propagulos de *Colletotrichum* y *Pseudocercospora* mediante aspersión manual en pencas de nopal verdura. (G Y H) Aspecto del área de inoculación de pencas inoculadas con temperatura controlada a 18°C y 12h luz.

Posteriormente se realizaron preparaciones de los diferentes micelios obtenidos y se verificaron las características morfológicas de *Colletotrichum* (Cuadro 8).

Cuadro 8. Tipo de colonias obtenidas de cladodios de *Opuntia ficus-indica* Miller, con síntomas de *Colletotrichum* en Tlalnepantla, Morelos.

Grupo	Colonia	Conidios	Genero
1	Micelio abundante color gris claro algodonoso.	Unicelulares cilíndricos	hialinos <i>Colletotrichum</i> Barnett y Hunter (1998)
2	Micelio abundante color crema gris.	Unicelulares cilíndricos	hialinos <i>Colletotrichum</i>
3	Micelio abundante color gris-claro.	Unicelulares cilíndricos	hialinos <i>Colletotrichum</i>
4	Micelio abundante color durazno-claro.	Unicelulares cilíndricos	hialinos <i>Colletotrichum</i>
5	Micelio abundante color durazno-gris claro algodonoso.	Unicelulares cilíndricos	hialinos <i>Colletotrichum</i>

Estas colonias se purificaron en PDA por la técnica de punta de hifa. Se mantuvieron en luz blanca para su uso en pruebas de patogenicidad.

3.3.2. Reactivación del hongo *Pseudocercospora*

La cepa del hongo *Pseudocercospora* originalmente se obtuvo de material preservado en aceite mineral en el laboratorio de micología de la Universidad Autónoma de Chapingo, por lo que fue necesario realizar tres lavados con agua destilada estéril antes de colocar el trozo de agar con micelio en cajas con medio PDA. El medio sembrado se mantuvo en luz negra a 31°C para inducir su crecimiento micelial.

3.3.3. Pruebas de patogenicidad

3.3.3.1. Cladodios para inoculación

Para las pruebas de patogenicidad, a finales de Diciembre del 2008 se sembraron 93 cladodios provenientes de Tlalnepantla Morelos que no mostraban ningún tipo de síntoma al momento de ser colectados. El sustrato que se utilizó fue 50% tezontle y 50% peat moss en macetas del número siete en el invernadero del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. Los cladodios sembrados se mantuvieron en observación para verificar que no desarrollaran algún síntoma de enfermedad previa a la inoculación.

3.3.3.2. Método de inoculación

Para la inoculación de los hongos se utilizaron 24 cladodios y se utilizó el método de aspersión (Leyva-Mir *et al.*, 2009), el inóculo se obtuvo colocando las diferentes cepas en medio líquido papa dextrosa (PD) (Figura 4E). Las cepas se colocaron en agitación continua para que *Pseudocercospora* formara masas de micelio para su uso como la fuente de inóculo, a comparación de Quezada *et al* (2006) y Ayala-Escobar *et al* (2006) que usaron aspersión de conidios y aplicación de rodajas de PDA con micelio directamente aplicadas a la planta. Previo a la inoculación, las pencas se cubrieron con bolsas de plástico durante tres días para generar humedad relativa condensada sobre el cladodio.

Para la preparación del inóculo de *Colletotrichum* se observó la cantidad de conidios mediante la cámara Neubauer y se realizaron diluciones para ajustar las concentraciones utilizadas (Cuadro 9). Para las cepas de *Pseudocercospora* se contabilizaron masas de hifas compactadas y se utilizó una concentración de 6×10^4 UFC/ml. La inoculación se realizó el 12 de abril de 2010 utilizando aspersores manuales. La suspensión micelial se asperjó sobre las pencas a las cuales se les realizaron heridas realizadas con la navaja de un bisturí estéril así como a cladodios sin heridas (Figura 4F).

Cuadro 9. Cepas de *Colletotrichum* empleadas para la inoculación

Origen	Clave	Concentración
Parcela 1	Colle 1	2×10^5 UFC/ml
Parcela 2	Colle 2	2×10^5 UFC/ml
Parcela 1	Colle 3	2×10^5 UFC/ml
Parcela 2	Colle 4	2×10^5 UFC/ml
Parcela 2	Colle 5	2×10^5 UFC/ml

Las pencas que se utilizaron como testigos se asperjaron con agua destilada, posteriormente se colocó nuevamente una bolsa de plástico para mantener la mayor humedad relativa posible y propiciar la infección. Se utilizaron tres pencas por cada cepa y para la combinación de las mismas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Combinaciones utilizadas para la inoculación de hongos.

Combinaciones	Ufc/ml	Repeticiones
Testigo	Agua destilada estéril	3
<i>Pseudocercospora</i>	6×10^4	3
<i>Colletotrichum</i>	2×10^5	3
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum</i> 1	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$	3
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum</i> 2	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$	3
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum</i> 3	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$	3
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum</i> 4	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$	3
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum</i> 5	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$	3

3.3.3.3. Condiciones de incubación de los cladodios

Las plantas después de la inoculación se mantuvieron dentro de un cuarto cerrado con aire acondicionado marca LG mod. WD81CM para mantener una temperatura de 18°C y con 12h de luz (Figura 4G y 4H).

3.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1. Pruebas de patogenicidad

Después de 150 días de inoculación (ddi) los cladodios no presentaron síntomas típicos de la mancha negra ni síntomas con asociación de *Colletotrichum*, en el presente trabajo se utilizó una concentración de unidades infectivas de 6×10^4 y 2×10^5 para *Pseudocercospora* y *Colletotrichum*, respectivamente, esta concentración es mayor a la que reportó Quezada *et al.* (2006) la cual fue de 1×10^5 y 8×10^3 conidios/ml, respectivamente. Para estos mismos organismos, Ayala *et al.* (2006) usaron 5×10^3 conidios/ml de *Pseudocercospora*, Quezada *et al.* (2006) reportaron síntomas a los 104 ddi por otra parte Ayala *et al.* (2006) no reportaron los días producción de síntomas pero si a la formación de conidióforos de *P. opuntiae* a los 5 a 8 días después de la formación del síntoma. Las diferencias de concentración del inoculo de *Colletotrichum* utilizadas en los trabajos de Quezada *et al.* (2006) y de Ayala *et al.* (2006) y las utilizadas en este trabajo son notorias debido a se decidió incrementar las concentraciones ya que se utilizo como fuente de inoculo propagulos, y no conidios como los utilizados en los trabajos antes mencionados.

En otro trabajo Quezada *et al.* (2006) obtuvieron tres aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* en contrasté en este trabajo se encontraron cinco aislamientos *Colletotrichum* los cuales se diferenciaron por el color de micelio. En ambos trabajos los cladodios inoculados con *Colletotrichum* no presentaron síntomas, ni se observo algún sinergismo cuando los hongos se combinaron.

3.5. CONCLUSIONES

En la presente investigación no fue posible verificar que exista un sinergismo entre *Pseudocercospora* y *Colletotrichum* en cladodios de nopal verdura como se planteaba inicialmente, debido a que ninguno de los patógenos inoculados sobre el mismo cladodio de nopal ocasionó síntomas visibles. Posiblemente en futuras investigaciones sea necesario considerar las condiciones edafoclimáticas en donde se presenta naturalmente la enfermedad, ya que cuando estas condiciones se trataron de reproducir en un ambiente diferente los patógenos fueron incapaces de generar la enfermedad. La viabilidad del inóculo pudo ser otro factor que debe considerarse en el futuro. Bajo condiciones de laboratorio y en medio de cultivo PDA *Pseudocercospora opuntiae* tiene un lento crecimiento mientras que *Colletotrichum* es rápido.

CAPÍTULO IV

ASOCIACIÓN DE UN VIRUS CAUSANTE DE MANCHAS CLORÓTICAS EN *Opuntia*

ficus-indica Miller

4.1. Resumen

En diversos lugares de México las personas usualmente consumen los cladodios de nopal verdura inmaduros como vegetales y la localidad de Cuautepec de Hinojosa, Hidalgo es una de estas regiones que produce este vegetal. Se detectó un virus en cladodios de nopal verdura (*O. ficus indica*) cultivado en la región de Cuautepec de Hinojosa, Hidalgo, con halos cloróticos y manchas irregulares. Los cladodios afectados desarrollan moderada clorosis y pérdida de turgencia en postcosecha en infección severa. El virus se transmitió mecánicamente a 11 plantas indicadoras. En *Chenopodium quinoa* causó limitada infección sistémica en nervaduras y con manchas amarillas en el área internerval. El virus se transmitió exitosamente en 43% de cladodios inoculados mecánicamente reproduciendo los síntomas de halos cloróticos 7ddi y manchas cloróticas e irregulares a los 25ddi. El análisis electroforético mostró que el virus aislado de plantas de nopal verdura tuvo un genoma de ARN de cadena sencilla, mientras que al microscopio electrónico se observó un alto número de partículas virales en forma de varilla flexible. El ensayo por RT-PCR confirmó que el virus es una especie del género Potexvirus. Las características biológicas de este virus sugieren que es una variante relacionada con la especie Cactus virus X. En campo, este virus causó una incidencia de 47-60% y severidad de 51-79% con una distribución espacial claramente agregada con fuerte direccionalidad en sentido de los surcos posiblemente por efecto del manejo de poda y cosecha.

Palabras clave: nopal verdura, cactáceas, enfermedades virales, Potexvirus.

4.2. INTRODUCCIÓN

Debido a la domesticación algunas cactáceas por la población nativa de México, en nuestro país se han empleado diferentes especies de esta familia que tienen importancia económica, ecológica y cultural, particularmente del grupo conocido como nopales (*Opuntia* spp.) (Chávez *et al.*, 2009; Griffith, 2004; Bravo y Scheinvar, 1999). Uno de los usos más comunes de estas especies es la producción de cladodios inmaduros para su consumo como verdura (nopal verdura o nopalitos), siendo *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller la especie más importante para este fin. Por la calidad del fruto o tuna destaca la especie *Opuntia amyyclea* (L.) y para la producción de forraje se emplean sobre todo *Opuntia streptacantha* (L.) (cardón) y *O. leucotricha* (L.) (duraznillo) (Granados y Castañeda, 1997; Pimienta, 1997).

En la actualidad, México es el primer productor y consumidor de nopal verdura en el mundo. En 2010, el país contaba con más de 12 mil ha de este cultivo (Bravo y Scheinvar, 1999). Aunque el nopal verdura se cultiva en todo el país, la principal región productora y consumidora es la zona centro (Granados y Castañeda, 1997). En el estado de Hidalgo, particularmente en la región de Cuautepec de Hinojosa, se cultiva la variedad Atlixco-Puebla debido a que es la mejor adaptada a esta zona (Callejas *et al.*, 2009). En esta localidad se detectó la presencia de una enfermedad en plantas de nopal verdura que se manifiesta por la presencia de pequeñas y numerosas manchas o moteados en forma de pequeños anillos, de color amarillo intenso a blanquecino. En ataques severos, el cladodio adquiere una coloración amarillenta generalizada, adelgazamiento y eventualmente marchitez. Asimismo, una vez cortados los cladodios para su venta, se observa un oscurecimiento progresivo del

tejido mismo que en un término de 24 h puede quedar totalmente cubierto con una coloración cobriza haciéndolos no aptos para su comercialización.

En otros lugares del mundo se han reportado síntomas similares ocasionados por virus que causan reducción en la calidad del nopal, por ejemplo *Cactus virus X (CVX)* (Lastra *et al.*, 1976), *Saguaro cactus virus (SgCV)* (Nelson y Tremaine 1975), *Sammons' Opuntia virus (SOV)* (De La Torre *et al.*, 2007; Milbrath y Nelson, 1972), *Tobacco mosaic virus* (Giri y Chessin, 1975) y *Cactus virus 2 (CV-2)* (ICTV). En nopal verdura, los síntomas se manifiestan en la parte de interés comercial (cladodios), lo cual justifica la importancia de generar conocimiento acerca de la etiología de esta enfermedad. Con base en lo anterior, los objetivos del presente trabajo fueron determinar el agente causal de las manchas cloróticas del nopal verdura en Cuautepec de Hinojosa, Hidalgo, y estimar la incidencia y severidad en plantaciones comerciales ubicadas en esta localidad.

4.3. MATERIALES Y MÉTODOS.

4.3.1. Sitio de estudio en Cuautepec de Hinojosa, Hidalgo colecta de material vegetal

Se inspeccionaron tres unidades de producción de nopal verdura de 102 x 46 m cada una, ubicadas en Puerta de Yolo, Cuautepec de Hinojosa, Hidalgo. Las tres unidades tenían sistema de riego por aspersión, una estaba parcialmente cubierta con polietileno transparente y las otras dos se encontraban al aire libre. Las plantas estaban sembradas en surcos a una distancia de 35 cm entre plantas y 60 cm entre hileras. La fertilización consistió en estiércol vacuno. El manejo de plantación y cosecha incluyó el uso intenso de podas. En

estas unidades se colectaron 50 cladodios de diferentes plantas de nopal, 25 tenían halos cloróticos alrededor de las areolas (Figura 5) y las restantes eran asintomáticos. Las muestras se trasladaron al invernadero y laboratorio de Virus Fitopatógenos del Colegio de Postgraduados-Campus Montecillo para realizar los estudios correspondientes.



Figura 5. Síntomas diversos ocasionados por virus en nopal verdura en Cuatepec de Hinojosa Hidalgo. (A) Halos cloróticos con bordes gruesos y contiuos en nopal verdura. (B) Halos cloróticos alrededor de la areolas del nopal verdura. (C) Manchas cloróticas alrededor de las areolas del nopal. (D) Manchas cloróticas alrededor de areolas en brotes nuevos de nopal verdura.

4.3.2. Análisis fitosanitario general

Mediante observación directa al microscopio compuesto y la siembra de trozos de los cladodios con síntomas en cajas Petri conteniendo medio de cultivo papa dextrosa agar o B de King, se descartó la presencia de nematodos, hongos y bacterias fitopatógenas. Al obtener resultados negativos para estos microorganismos, se decidió continuar con la extracción de RNA bicatenario para determinar la presencia de un posible virus. Mediante observación directa al microscopio compuesto y la siembra de trozos de los cladodios con síntomas en cajas Petri conteniendo medio de cultivo papa dextrosa agar o B de King, se descartó la presencia de nematodos, hongos y bacterias fitopatógenas. Al obtener resultados negativos para estos microorganismos, se decidió continuar con la extracción de RNA bicatenario para determinar la presencia de un posible virus.

4.3.3. Extracción de RNA bicatenario

Se tomó epidermis de cladodios con los síntomas antes descritos así como de cladodios asintomáticos como testigo para extraer RNA bicatenario (RNA_{bc}) siguiendo el protocolo de Dodds *et al.* (1987) previa separación del mucílago de las muestras por interferir en la extracción.

El RNA_{bc} se visualizó en un gel de agarosa al 1%. Las condiciones de electroforesis fueron 60 V por 10 min y posteriormente a 80 V por 40 min.

4.3.4. Determinación del rango de hospedantes

Se inoculó mecánicamente un conjunto de plantas indicadoras utilizando como fuente de inóculo la epidermis de cladodios con síntomas procedentes de Cuauhtepac de Hinojosa, Hidalgo. Esta epidermis se maceró en un buffer de fosfatos + DIECA (dietil ditiocarbamato de sodio 0.01 M) pH 7.2. Posteriormente, se espolvoreó carborundum 600 mallas sobre las hojas de las siguientes plantas indicadoras: *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* L., *N. rustica* L., *N. glutinosa* L., *N. occidentalis* Wheeler, *N. benthamiana* L., *N. clevelandii* Gray, *Capsicum annuum* L., *Chenopodium quinoa* Willd., *Ch. amaranticolor* Coste and Reyn., *Datura stramonium* L. y *Solanum lycopersicum* Mill. Finalmente, con un hisopo se tomó la savia obtenida de los cladodios con síntomas y se frotó sobre la superficie foliar.

Se inocularon tres juegos de plantas indicadoras (Dijkstra y De Jager, 1998), las cuales se mantuvieron en invernadero a una temperatura de 25-30°C, similar a la que reporta Labrín *et al.* (2005) con una humedad relativa de 70 ± 5% 12 horas-luz. Diariamente se revisaron las plantas durante 15 días para registrar la aparición de síntomas.

4.3.5. Purificación parcial

A partir de cladodios con síntomas se realizó la purificación parcial del posible virus de acuerdo con el protocolo propuesto por Lastra *et al.* (1976). Una vez que se obtuvo el purificado parcial, su infectividad se corroboró inoculando mecánicamente dos juegos de las siguientes plantas: *Cucumis sativus* L., *Cucurbita pepo* L., *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*, *N. rustica*, *N. glutinosa*, *N. occidentalis*, *N. benthamiana*, *Capsicum annuum* y *Solanum*

lycopersicum. La inoculación se realizó de la misma manera indicada en el apartado anterior, excepto que en este caso se utilizaron 2 mL del purificado parcial mezclado con 4 mL de buffer de fosfatos + DIECA 0.01M pH 7.2. Las plantas inoculadas se mantuvieron en invernadero y se observaron diariamente durante 15 días para registrar la aparición de los síntomas.

4.3.6. Microscopía electrónica

En un portaobjetos se mezclaron 200 μ L del purificado parcial obtenido con 200 μ L de acetato de uranilo 2%, posteriormente se colocó una gota de la mezcla sobre una rejilla de cobre de 400 mallas cubierta con formvar y se dejó secar a temperatura ambiente. Las rejillas se llevaron a la Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional para su observación y toma de fotografías en un microscopio electrónico de transmisión JEOL.

Adicionalmente, la epidermis correspondiente a zonas de halos cloróticos de cladodios enfermos se desprendió y maceró en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo homogéneo al cual se agregó un volumen igual de glutaraldehído en un tubo eppendorf. Posteriormente, se colocaron 50 μ L de esta mezcla sobre una rejilla de cobre de 400 mallas cubierta con formvar por 10 min. La rejilla se lavó con una solución de cocodilato y se dejó secar sobre papel filtro por una hora. Después se expuso a una gota de acetato de uranilo por 5 min y se secó durante una hora. A continuación con ayuda de pinzas entomológicas se tomó la rejilla y se sumergió en un vaso de precipitado con agua bidestilada 40 veces, se cambió el agua y se continuó con otros 40 lavados para terminar con cuatro lavados más con una pizeta.

Finalmente, se colocó la rejilla sobre un pedazo de papel filtro y se dejó secar por 24 h a temperatura ambiente para posteriormente observar y tomar fotografías a 27,000X en un microscopio electrónico de transmisión JEOL modelo JEM-100 CX II de la FES Iztacala, UNAM.

4.3.7. Pruebas de patogenicidad

Para determinar la transmisión del agente causal, se inocularon mecánicamente siete cladodios de plantas de nopal verdura asintomáticas. Se utilizó como fuente de inóculo la epidermis de cladodios con síntomas, la cual se maceró en un buffer de fosfatos + DIECA 0.01M pH 7.2. Se espolvoreó carborundum 600 mallas sobre la parte superior del cladodio cubriendo una superficie aproximada de 5 cm², con un hisopo se tomó la savia infectiva y se frotó sobre la penca. Como testigo negativo se tuvieron siete plantas de nopal asintomáticas en ellas se espolvoreó carborundum 600 mallas y se frotó con un hisopo el buffer antes indicado. Todas las plantas se mantuvieron en invernadero durante 45 días y se observaron cada 72 h para registrar la aparición de los síntomas. Las plantas sanas empleadas en esta fase experimental provinieron de Tlalnepantla, Morelos. En esta región no se han observado los síntomas virales descritos en este trabajo (Rodríguez *et al.*, 2008)

4.3.8. Extracción de ARN

Se realizó la extracción de RNA total a partir de epidermis de cladodios que mostraban síntomas con el producto comercial Trizol© siguiendo las instrucciones del fabricante. El producto se visualizó en un gel de agarosa al 1% siendo las condiciones de electroforesis 60

V por 10 min y posteriormente a 80 V por 40 min. Por otro lado, se realizó una segunda extracción de RNA total por medio del método de sílica a partir de epidermis de cladodios asintomáticos y con síntomas el cual se visualizó en un gel de agarosa al 1%. En este caso, las condiciones de electroforesis fueron 100 V, 50 mA por 50 min.

4.3.9. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR)

Debido a la sospecha de una mezcla de especies virales, se utilizaron primers generales para los géneros *Tobamovirus*, *Potexvirus* y *Carmovirus*. En el caso de *Potexvirus* (Van der Vlugt *et al.*, 2000) se utilizaron los primers POTEX1RC (5' -TCAGTRTTDGCRTCRAARGT-3'), POTEX2RC (5'- AGCATRGCNSCRTCYTG- 3') y POTEX5RC (3'-CAYCARCARGCMAARGAYGA- 5') donde R=A+G, D=G+A+T Y=C+T, S=G+C, N=A+C+G+T, que amplifican un fragmento de 735 y 584 pb para 1/5 y 2/5, respectivamente.

Para estos primers se realizó rt-PCR en un solo paso con las siguientes condiciones del termociclador: un ciclo de 50°C-32'; un ciclo de 94°C-3'; 30 ciclos a 94°C-30", 51.5°C-1', 68°C-1', un ciclo de 68°C-5' y 4°C-∞.

Con los mismos primers de *potexvirus* se utilizaron diferentes condiciones que fueron las siguientes: un ciclo de 95°C-5'; un ciclo de 42°C-45'; un ciclo de 94°C 3'; 35 ciclos a 94°C-30", 51.5°C-1', 72°C-1', posteriormente, un ciclo de 72°C-5", por último 4°C-∞.

En el caso de *tobamovirus* (Adkins y Roskopf, 2001) se utilizaron los primers TMV5vAccl (5' -TAATACGACTCACTATAGGTATTTTTACAACAATTACCAAC- 3') y TMV3vc (3'-TGGCCCCTACCGGGG- 5') que amplifican un fragmento de 360 a 419pb; posteriormente se utilizaron los primers TMVcp5 (5- 'GTTTTAAATATGTCTTACAG- 3') y TMVcp3 (3'-TGAGGTAGTCAAGATGCATA- 5') que amplifican un fragmento de 300 pb. Adicionalmente, se emplearon los primers específicos a *Tobacco mosaic virus* (TMV): TMVCPF (5'-GCNYTNGGNAAYCARTTYCARACNCARCAR- 3') y TMVCPR (3'-NGCRTCNARNGTYTCNGCNCTNGTNGGRTT- 5') donde R=A+G, Y=C+T, N=A+C+G+T, que amplifican un fragmento de 240 pb.

Para los primers TMV 3vc/TMV5vAccl se realizó rt-PCR en un solo paso con las siguientes condiciones del termociclador: un ciclo de 50°C-45'; un ciclo de 94°C-21'; 30 ciclos de 94°C-45", 55°C-45", 72°C-1'; un ciclo de 72°C-7'.

Para los primers TMVcp5/TMVcp3, también se realizó rt-PCR en un solo paso con las siguientes condiciones del termociclador: un ciclo de 42°C-45'; un ciclo de 94°C-3'; 40 ciclos de 94°C-50", 52°C-52", 72°C-40"; un ciclo de 72°C-7' y finalmente 4°C-∞.

Se realizó rt-PCR de un solo paso para los primers TMVCPF/TMVCPR con las siguientes condiciones del termociclador: un ciclo de 42°C-45'; un ciclo de 94°C-3'; 35 ciclos de 95°C-50", 52°C-50", 72°C-50"; un ciclo de 72°C-6' y finalmente 4°C-∞.

Para *Carmovirus* (Chen, 2007) se utilizaron los primers CarMV (5'-CTCCATGGTCATGGAA(A/G)ATAAAGGAGAA- 3') y CarMV/F (3'-CAACAAATATCCTACACTGTCCTAGGTG- 5') que amplifican un fragmento de 669 pb con las siguientes condiciones del termociclador: un ciclo de 96°C-5'; 95°C-10'; 95°C-15'; 95°C-5'; 42°C- 45'; 96°C-5'; 30 ciclos de 96°C-50", 52°C- 30", 72°C -30" y un ciclo de 72° por 7'.

4.3.10 Distribución espacial de incidencia y severidad

Se realizó una evaluación de la incidencia y severidad en tres unidades de producción de nopal verdura descritas previamente para buscar plantas con cladodios que mostrarán manchas cloróticas irregulares o circulares y anillos cloróticos alrededor de las aereolas. Para evaluar la severidad se consideró el número de cladodios con síntomas respecto al número de cladodios totales por planta; en el caso de la incidencia, se determinó el número de plantas con síntomas en cada unidad de producción de la manera siguiente: la primera unidad se dividió en tres secciones consistentes en cinco surcos cada una (localizadas a la entrada, la parte media y al final del invernadero, respectivamente) para evaluar 50 plantas/surco/sección con un total de 250 plantas. En las otras dos unidades de producción se evaluaron en cada una 20 plantas continuas en cinco surcos para un total de 100 plantas. Los datos obtenidos se analizaron con Surfer® ver. 8.0 para generar mapas de dispersión de severidad por interpolación geoestadística.

4.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1. Sitio de estudio.

Los cladodios de nopal verdura colectados tuvieron manchas anulares alrededor de las aereolas o entre ellas, las cuales tuvieron un color amarillo claro en cladodios pequeños y amarillo intenso en cladodios maduros llegando en algunos casos a cubrir toda su superficie. Después de 48h, los cladodios colectados presentaron cambios en consistencia y color de verde a marrón. Esta propiedad es identificada por los productores causándoles problemas en la comercialización. Este mismo fenómeno fue observado por Lastra *et al.* (1976) en *Nopalea cochenillifera* infectado con el virus X del cactus (*Cactus virus X*) donde los síntomas tienden a enmascararse en cladodios jóvenes pero se expresa en cladodios maduros con un obscurecimiento.

4.4.2. RNA bicatenario

En el gel de electroforesis se observó la presencia de bandas fluorescentes únicamente en la muestra del cladodio con síntomas lo cual indica la presencia de un agente infeccioso de tipo viral con RNA genómico (Figura 6A). En cactáceas se ha reportado un total de siete especies virales con genoma RNA (De La Torre *et al.*, 2007; Hausbeck y Gildow, 1991; Lastra *et al.*, 1976; Nelson *et al.*, 1975; Casper y Brandes, 1969) de los cuales únicamente *Opuntia Sammons' virus* y *Tobacco mosaic virus* causan síntomas similares a los observados en Cuauhtepic de Hinojosa, Hidalgo.

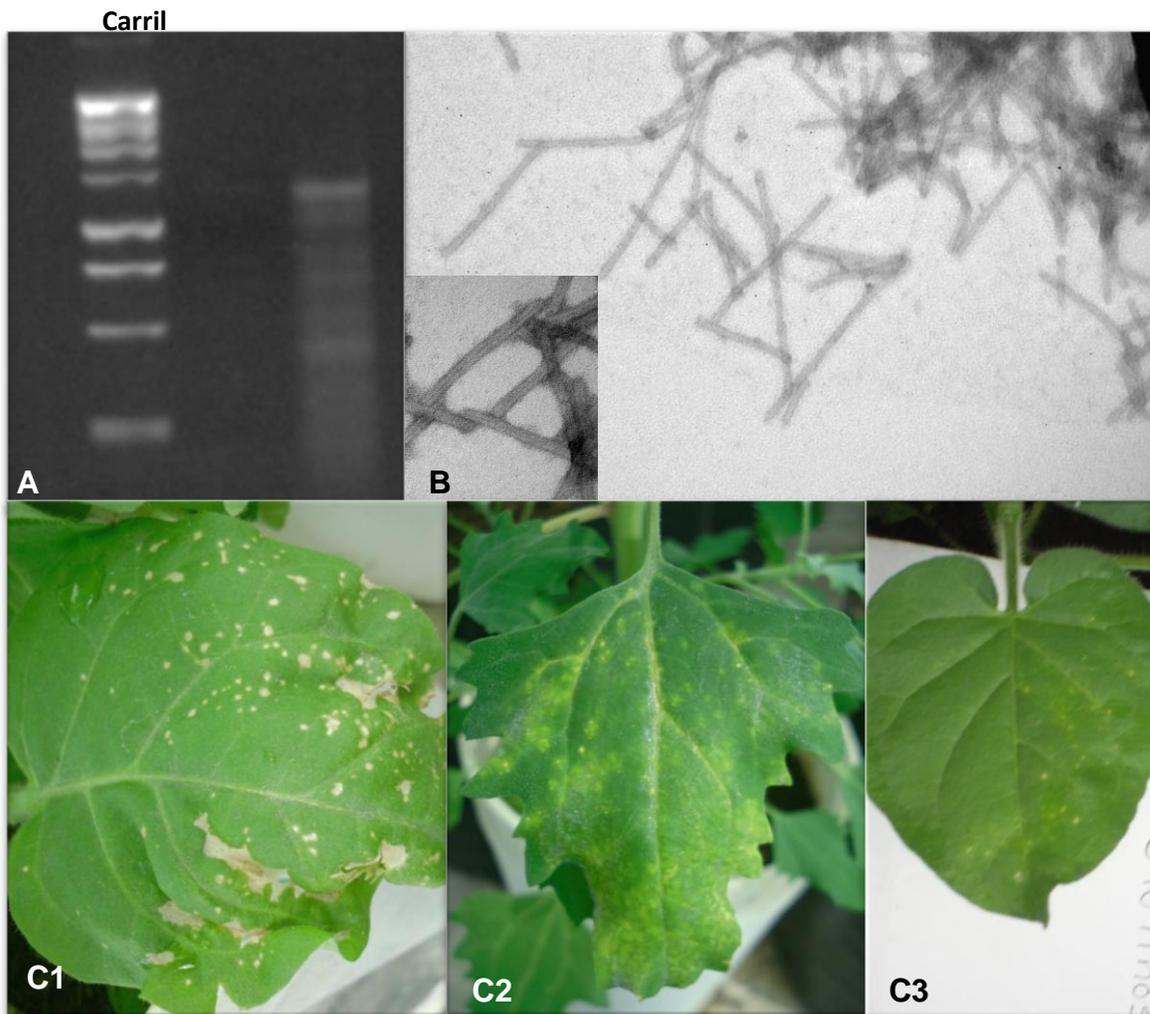


Figura 6. (A) Bandas de RNA bicatenario obtenidas a partir de plantas de nopal verdura. Carril 1: marcador molecular de 1kb. Carril 2: Cladodios asintomáticos; Carril 3: Cladodios con manchas anulares cloróticas alrededor de las aereolas. (B) Partículas virales obtenidas a partir del purificado parcial hecho de cladodios de nopal verdura (C1) Lesiones locales necróticas en *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*. (C2) Lesiones locales cloróticas en *Ch. quinoa*. (C3) Lesiones locales cloróticas en *N. benthamiana* L.

4.4.3. Rango de hospedantes

Las plantas inoculadas de *Chenopodium amaranticolor*, *Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* (Figura 6) y *Datura stramonium* presentaron lesiones locales cloróticas a los siete días después de la inoculación (ddi).

En *Nicotiana glutinosa* y *Chenopodium quinoa* los síntomas se presentaron a los 10 ddi y consistieron en pequeñas lesiones locales cloróticas que posteriormente fueron necróticas (Cuadro 11). En *C. quinoa* se detectó una limitada infección sistémica evidente en las nervaduras y en la producción de manchas amarillas en el área internerval. Únicamente en plantas de *N. benthamiana* se observó un enrollamiento de hojas nuevas y posteriormente marchitez severa, lo cual indicó un movimiento sistémico del agente causal. La tipología de síntomas en plantas indicadoras reforzó la asociación de un agente de tipo viral en las plantas estudiadas. Considerando el número de plantas indicadoras que mostraron síntomas, el putativo virus en nopal verdura no tiene un amplio rango de hospedantes. Del rango de hospedantes empleado, *Q. quinoa*, *N. glutinosa* y *N. tabacum* permiten comparar los virus reportados en cactáceas (De La Torre *et al.*, 2007; Hausbeck y Gildow, 1991; Lastra *et al.*, 1976; Nelson *et al.*, 1975; Casper y Brandes, 1969). Lesiones locales cloróticas e infección sistémica limitada observadas en *Q. quinoa* descartó a *Saguaro virus*, *Sammons' Opuntia virus* y *Zygocactus virus* los cuales inducen, en los primeros dos, lesiones locales y en el último caso una ligera infección sistémica expresada como enrollamiento foliar. De igual manera, se observaron lesiones locales cloróticas en *N. glutinosa* lo cual contrastó con lesiones necróticas y deformación reportadas para el *Tomato spotted wilt virus* (TSWV). En *N. tabacum* se encontraron lesiones locales necróticas distintas al mosaico sistémico típico del *Tobacco mosaic virus* (Fauquet *et al.*, 2005). El *Cactus virus X* y *Cactus virus 2* inducen infección sistémica en *Q. quinoa* pero en el último caso es asintomático (Fauquet *et al.*, 2005).

Cuadro 11. Síntomas en plantas indicadoras de los virus reportados en cactáceas y el virus encontrado en Cuautepec de Hinojosa, Hidalgo.

Hospedante	Hidalgo	<i>Opuntia Sammons' virus</i>	<i>Cactus Virus X</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Cactus virus 2</i>	<i>Zygocactus virus</i>	<i>Saguaro cactus virus</i>	<i>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</i>
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Llc	-	-	LI	-	Sistémico/ manchas verde	-	Lln/deformación
<i>N. rustica</i> .L	Ss	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. benthamiana</i> L.	Ss	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. tabacum</i> var. <i>xanthi</i> L.	Lln	-	-	LI	-	-	-	-
<i>Datura stramonium</i> L.	Lln	-	-		-	-	-	-
<i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	Infección sistémica/nervaduras. manchas amarillas en el área internerval	LI	Infección sistémica	LI	Ss	Ligera infección sistémica/enrollamiento foliar.	LI	-
<i>C. amaranticolor</i> Coste & Reyn	Llc	-	Lln	-	-	-	LI	-
<i>Capsicum annuum</i> L. Ancho L.	Ss	-	--	-	-	-	-	-
<i>Lycopersicon esculentum</i> M.	Ss	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. tabacum</i> var. <i>Clevelandi</i>	Lln	-	-	Mosaico sistémico	-	Ss	-	Lln/deformación
<i>N. tabacum</i> var. <i>occidentalis</i>	Ss	-	-	-	-	-	-	Lln/deformación

Llc = lesiones locales cloróticas; Mos = mosaico; Lln = lesiones locales necróticas; Ss = sin síntomas

4.4.4. Microscopía electrónica

A partir del purificado parcial se observó un alto número de partículas virales en forma de varilla flexible (Figura 6B). Con savia de epidermis se observó el mismo tipo de partícula aunque en menor número posiblemente debido al efecto del macerado (Dijkstra y De Jager, 1998). Sin embargo, en el caso del purificado se observó un mayor número de partículas fragmentadas con aspecto de varillas rígidas. Debido al reporte de un *Tobamovirus* en cactáceas, posiblemente el *Opuntia Sammons' virus*, el cual posee partículas rígidas (De La Torre *et al.*, 2007), se realizaron mediciones de estas partículas los cuales en promedio fueron de 112 x 24nm. Estos valores fueron inferiores al reportado por De La Torre *et al.* (2007) (325nm) y el reportado en el ICTV (317 x 18nm) (Fauquet *et al.*, 2005), por lo cual se descartó que las fracciones rígidas correspondieran a una especie de *Tobamovirus* de la reportada en cactáceas. Con respecto a los otros virus reportados en cactáceas el *Cactus virus X*, *Zygocactus virus* y *Cactus virus 2* poseen varillas flexibles y pertenecen a géneros distintos de la familia *Flexiviridae* (Fauquet *et al.*, 2005).

4.4.5. Pruebas de patogenicidad

La transmisión mecánica del agente causal fue exitosa en el 43% de las plantas inoculadas. Ninguna planta testigo mostró síntomas. A los 7 ddi se presentaron los primeros síntomas en el 100% de los brotes provenientes de cladodios inoculados. Estos síntomas consistieron en anillos y halos cloróticos tenues localizados principalmente en la parte media de los brotes (Figura 7B1). A los 14 ddi, el número de halos se incrementó, principalmente rodeando las areolas, así como su tamaño (1-1.5cm) y la intensidad de la clorosis (Figura 7B2). A los 25

ddi, los halos se tornaron en manchas cloróticas circulares (1.5-2cm) e irregulares por su coalescencia. En algunas manchas se percibió un ligero hundimiento marginal y una leve clorosis generalizada del brote (Figura 7B3). Estos síntomas contrastan con los reportados por De La Torre y colaboradores (2007), los cuales consistieron en manchas cloróticas de 0.5-1cm distribuidos uniformemente en el cladodio y fuera de la zona areolar. En este caso, sin embargo, el virus se reportó en una cactácea tunera cultivada, el cual exhibe una textura de mayor consistencia. De los otros virus reportados en cactáceas (Hausbeck y Gildow, 1991; Lastra *et al.*, 1976; Nelson *et al.*, 1975; Casper y Brandes, 1969) únicamente el *Cactus virus X* causa síntomas similares a los reportados en este trabajo. En cactáceas silvestres, este virus induce manchas anulares amarillas simples o concéntricas de 2-4cm entorno a las areolas. En pitaya (*Hylocereus undatus*) se reportan manchas cloróticas, moteado, necrosis y amarillamiento de plantas (Liao *et al.*, 2003).

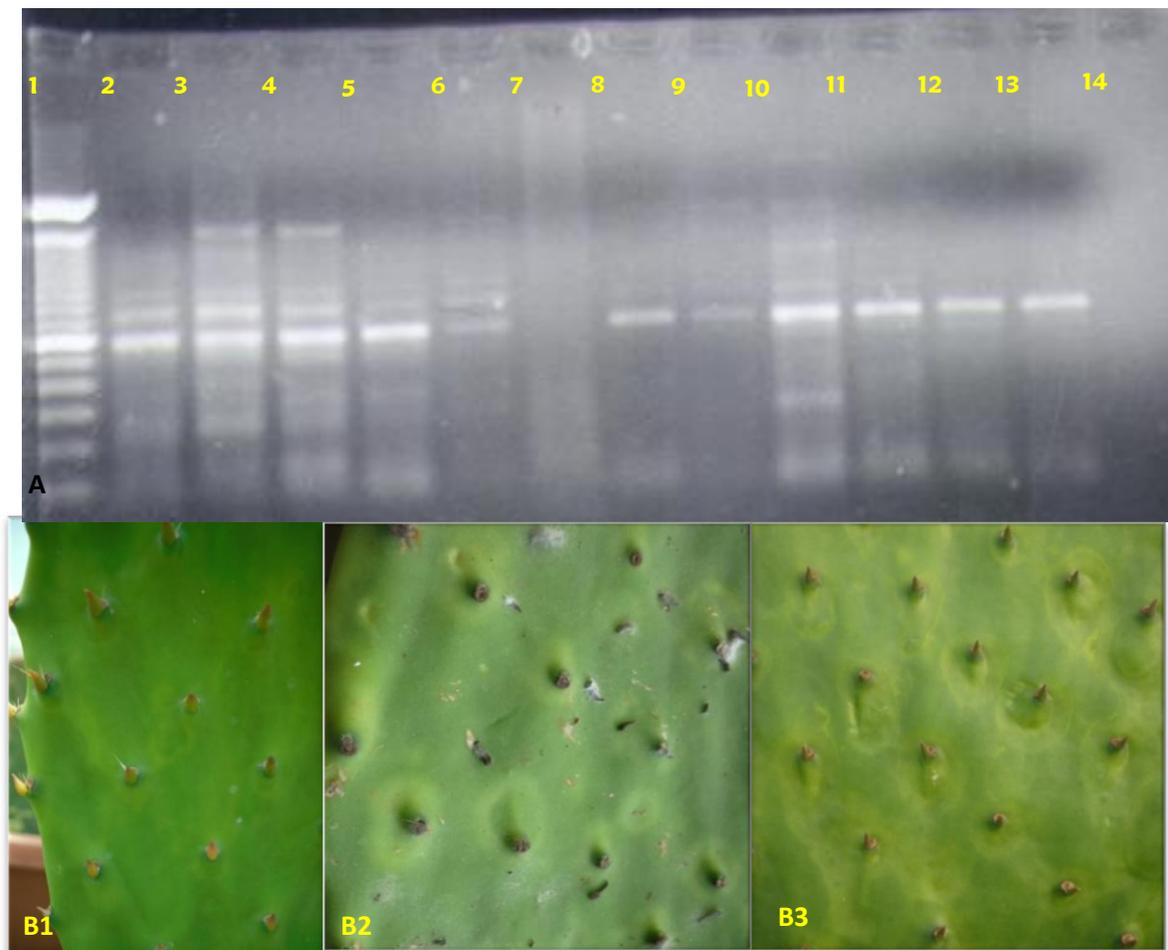


Figura 7. (A) Electroforesis de rt-PCR obtenidos con primers específicos para potexvirus. Carril 1) Marcador molecular de 1kb. Carriles 2-6 y 8-12: Cladodios de nopal verdura con manchas anulares cloróticas: Carril 13) Tejido foliar de orquídea infectada con un potexvirus; Carril 14) Testigo negativo. Carril 7) Vacío. (B) Manchas anulares cloróticas en brotes de cladodios inoculados con savia infectiva a los 7 (B1), 14 (B2) y 25 (B3) días después de la inoculación.

4.4.6. Transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR)

El ensayo de la rt-PCR fue positivo para el género *Potexvirus* a partir de RNA procedente de tejido de cladodios de nopal colectados en campo que mostraban manchas anulares cloróticas (Figura 7A). Este resultado es congruente con microscopía electrónica donde se observaron partículas virales flexibles, por lo que los síntomas asociados a cladodios de nopal verdura podrían corresponder a una especie de *Potexvirus*. El *Cactus virus X* y el

Zygocactus virus son especies de este género previamente reportadas en cactáceas. Sin embargo, los síntomas inducidos por *Zygocactus virus* son distintos a los encontrados en este trabajo en *C. quinoa*, por lo que posiblemente se trate de *Cactus virus X*. Adicionalmente, se eliminó definitivamente la presencia de un *Tobamovirus* como preliminarmente se había indicado a través de microscopia, rango de hospedantes y sintomatología en nopal. Este virus es el único que previamente se tenía registrado para México infectando nopal tunero cultivado en San Martín de las Pirámides, Edo. México (De La Torre *et al.*, 2007).

4.4.7. Distribución espacial de incidencia y severidad.

La incidencia de plantas enfermas fue de 47-60% en las unidades de producción evaluadas. La severidad, estimada con el número de cladodios sintomáticos con respecto al total de cladodios por planta, fue de 51-79%. Esto implica que más del 50% de cladodios/planta tuvieron el síntoma viral lo que sugiere una infección crónica a pesar del estado joven de la plantación por lo que el agente asociado pudiera ser transmisible vegetativamente. Esta incidencia es comparable a la reportada en Taiwán por Liao *et al.* (2003) para el *Cactus virus X* en pitaya (*Hylocereus undatus*), el cual tuvo una incidencia de 90% en Pintung, 50 en Kinman y 60-70% en otras áreas. El patrón de distribución espacial de plantas enfermas fue agregado con direccionalidad en el sentido de los surcos (Figura 3). El tamaño de los agregados estimados por interpolación espacial fue de 2-5 plantas, lo cual indica un posible mecanismo de diseminación asociado con el manejo de plantación vía poda estructural y de cosecha, la cual se realiza con cuchillo sin desinfectar. Esta posibilidad se reafirma con el resultado de la transmisión mecánica la cual fue de 43%. Por lo tanto, manejo de este virus

debe ser preventivo mediante el uso de material propagativo sano y con desinfección de utensilios de poda y cosecha.

Debido a que México, principalmente el altiplano, es el principal productor de nopal verdura en el mundo y que con este trabajo se confirman dos virus recientes en cactáceas (De La Torre *et al.*, 2007), es necesario verificar la presencia del *Cactus virus X* y conducir estudios epidemiológicos y de manejo, así como estudios etiológicos adicionales relativos a otras especies virales.

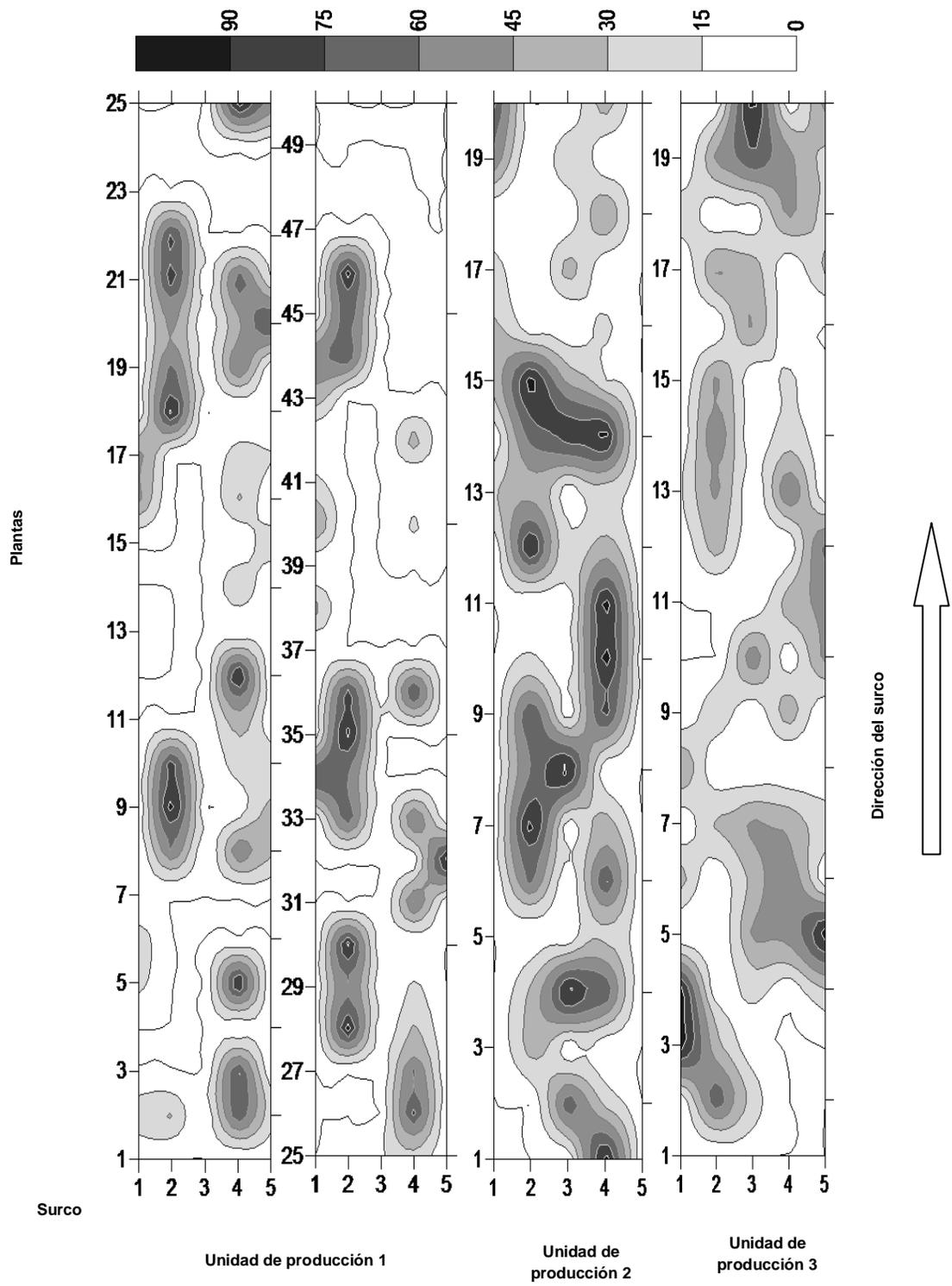


Figura 8. Datos obtenidos en el programa Surfer 8 para obtener mapas de dispersión espacial de incidencia y severidad de los síntomas atribuibles a virus.

4.5. CONCLUSIONES

Los síntomas de halos y manchas cloróticas irregulares y circulares presentes en nopal verdura (*O. ficus-indica*) se relacionaron con la infección de un virus del tipo ARN de cadena sencilla, mecánicamente transmisible a 11 especies de plantas indicadoras, con morfología de la partícula viral del tipo de varilla flexible. Se confirmó que este virus es una especie de *Potexvirus* por reacción de la transcriptasa inversa ligada a la reacción en cadena de la polimerasa (rt-PCR), utilizando oligonucleótidos degenerados. Dadas las reacciones observadas en hospedantes indicadoras susceptibles, particularmente en *C. quinoa*, los síntomas inducidos experimentalmente en nopal verdura y la morfología viral, el virus separado del nopal verdura se identificó como una variante relacionada con el *Cactus virus X*, especie de *Potexvirus* que se ha encontrado en otras especies de *Opuntia* en el mundo, pero en México constituye el primer reporte. La incidencia de este virus estuvo en el rango de 47-60% y tuvo una distribución claramente agregada con fuerte tendencia en dirección de surcos posiblemente por efecto del manejo.

V. CONCLUSIONES GENERALES

1. Los estudios histológicos realizados en nopal (*Opuntia ficus-indica* Miller) para detectar las infecciones latentes de la enfermedad mancha negra causada por el hongo *Pseudocercospora opuntiae* nos permite llegar a la conclusión de que la enfermedad se desarrolla a partir de inoculo liberado de las lesiones viejas en cladodios con crecimiento activo y no de infecciones latentes.
2. Con respecto a la evaluación de *Colletotrichum* sp. en el síndrome de la mancha negra en el nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Miller) se puede concluir que el estudio sinérgico fue inconcluso.
3. Se demostró mediante el purificado parcial la presencia de un agente de tipo viral, este se transmitió mecánicamente a 11 plantas indicadoras. En *Quenopodium quinoa* causó limitada infección sistémica en nervaduras y manchas amarillas en el área internerval.
4. El virus se transmitió exitosamente a 43% de cladodios inoculados reproduciendo halos cloróticos 7ddi y manchas cloróticas e irregulares a los 25 ddi. El análisis electroforético mostró que el virus aislado de plantas de nopal tuvo un genoma de ARN de cadena simple, mientras que al microscopio electrónico se observó un alto número de partículas virales en forma de varilla flexible.
5. El ensayo de rt-PCR confirmó que el virus es una especie del género *Potexvirus*. Las características biológicas de este virus sugieren que es una variante relacionada con la especie *Cactus virus X*.

6. En campo, este virus causó una incidencia de 47-60% y severidad de 51-79% con una distribución espacial claramente agregada con fuerte direccionalidad en sentido de los surcos. Este es el primer reporte de un *Potexvirus* en nopal verdura en México.

VI. LITERATURA CITADA

1. ADKINS, S; ROSSKOPF, E. N. 2001. Key West nightshade, a new experimental Host for Plant Viruses. *Plant Disease* 86 (12): 1310-1314.
2. ALCALA M., D.; LARA, B. 1995. Estudio de la marchitez bacteriana de la papa en tres localidades del estado Lara. *Agron. Trop* 48(3):275-289.
3. AYALA, E. V; YÁÑEZ, M. 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.
4. BRAVO, H.; SCHEINVAR, L. 1999. El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica. México. 233p.
5. CALLEJAS J., N.; MATUS G., J., A.; GARCÍA S., J., A.; MARTÍNEZ D., M., Á.; SALAS G., J., M. 2009. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y derivados en el estado de México, 2006. *Agrociencia* 43 (1):73-82.
6. CASPER, R; BRANDES, J. 1969. A new cactus virus. *J. Gen. Virol.* 5:155-156.
7. CHÁVEZ M, C. K; TECANTE, A; CASAS, A. 2009. The *Opuntia* (Cactaceae) and *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) in Mexico: a historical perspective of use, interaction and distribution. *Biodiversity and Conservation* 18: 3337-3355.
8. CHEN W., F. K. 2007. First Report of Carnation mottle virus in Calla lily (*Zantedeschia* spp). *Plant Pathology Bulletin* 16: (40):149-156.
9. DE LA TORRE, A. R; SALAZAR, S. M; RUIZ, M. R; 2007. Ocurrencia de un Tobamovirus asociado con manchas anulares amarillas en nopal tunero en México. *Agrociencia* 41: 763-773.

10. DIJKSTRA, J., DE JAGER., P., C. 1998. Practical Plant Virology. Protocols and Exercises. Edit. Springer, Berlin. 459 p.
11. DODDS, J.; MORRIS, T., JORDAN, R. 1987. Plant viral double stranded RNA. Annual Review Phytopatology. 22:151-168.
12. FAUQUET, C.M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. 2005. Virus Taxonomy Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Virus. Academic Press, San Diego, CA. 1259p.
13. GALLEGOS V. C., J. CERVANTES H., J. CORRALES G. Y G. MEDINA G. 2003. La Cadena productiva del nopal en Zacatecas: bases para un desarrollo sostenido. Universidad Autónoma Chapingo - Secretaría de Economía - Fundación Produce Zacatecas, 221 p.
14. GASSÓ, A. M., LOVISOLO, M., MOLLÁ, K. A. 2010. Histopatología del carbon thecaphora frezii en arachis hypogaea. TRABAJO PRESENTADO A LA 25º JORNADA NACIONAL DE MANÍ. 16 DE SEPTIEMBRE DE 2010. GENERAL CABRERA, CÓRDOBA. 36-38pp.
15. GIJÓN, H. A. 1996. Etiología de la pudrición del nopal (*Opuntia* spp) y su comportamiento con la cepa antagónica CAE-01. México, Tesis profesional Universidad Autónoma de Chapingo. 50p.
16. GIJÓN, H. A., QUEZADA, S. A., HERNÁNDEZ, F. B., ALVARADO, R. D., RODRÍGUEZ, L. E., SANTIAGO, S. E., MORA, A. G., RAMÍREZ, F. J., RAMÍREZ D. J. J., PEREYDA, H. J., SIMÕES, S. M. K. REYES, R. M. A., RODRÍGUEZ, C. M. E., CISNEROS, L. M. E., LÓPEZ, E. M. E., MARTÍNEZ, B. M., RAMÍREZ, O., PÉREZ, V. O., AQUINO, H. O., RIVAS, V. P., RAMÍREZ, R. S. 2007. Diagnostico de plagas y

- enfermedades en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L) en Tlalnepantla, Morelos. Monitor Agrícola. Comité Estatal de Sanidad Vegetal Morelos. Año 1. Núm. 4
17. GINN 2005. Diagnostico Fitosanitario del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L) en Tlalnepantla Morelos. 85p.
18. GIRI, L., CHESSIN, M.; 1975. A severe strain of tobacco mosaic virus from cactus. *Phytopathology* 65: 824-825.
19. GRANADOS, S., D.; CASTAÑEDA, A, D. P. 1997. El nopal. Ed. Trillas. México. 227p.
20. GRIFFITH, M. P. 2004. The origin of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91: 1915-1921.
21. HAUSBECK, M. K; GILDOW, F. E. 1991. First report of Tomato spotted wilt virus on thanksgiving cactus. *Plant Disease* 75: 215.
22. HERNÁNDEZ D., J. G. 2008a. Manejo orgánico de la producción de nopal. VI simposium taller de producción y aprovechamiento en el noreste de Mexico. 7 y 8 de Diciembre Nuevo León, México. 23p.
23. HERNÁNDEZ, S. E. 2008b. Epidemiología y control del agente causal de la mancha negra (*Pseudocercospora opuntiae*) en nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* L). Colegio de Postgraduados Campus Montecillo. 90p.
24. HERRERA G. J. E., RÍOS H. I., ARÁMBULA T. L. A., TORRES T. M. E., RIVAS B. J. J., LÓPEZ P. F. J., CASTAÑEDA M. O., CASTAÑEDA V. A., RAMÍREZ G. J. P., RAMÍREZ E. A., MARTÍNEZ C. I., MAGAÑA T. D., CARRILLO Q. A. R., OROZCO A. A., KIPPING R. D., LAUREL O. H., RAMÍREZ T. A. B. 2003. Caracterización de la cadena agroalimentaria del nopal tunero e identificación de sus demandas tecnológicas. Colegio de Postgraduados Campus San Luis Potosí. 80p.

25. KLINGELFUSS, H. L.; JOSE, T. Y. 2001. Infecção latente de *Colletotrichum truncatum* e *cercospora kikuchii* em soja. *Fitopatol. bras.* 26(2) 158-163.
26. LABRÍN, N.; RANGEL, E.; SCHMIDT, A.; CENTENO, F. Y CAMPOS. A. 2005. Virus del mosaico del *cymbidium* y de la mancha anillada del *odontoglossum* identificado en un híbrido de *Cattleya* proveniente del municipio Revenga, Estado Aragua, Venezuela. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 23:57-61. Ciudad Obregón, México pp. 57-61
27. LASTRA J., R.; GASKIN D.; UZCATEGUI R., C. 1976. Virus x del cactus en Venezuela. *Agronomía Tropical.* 26(4): 303-310.
28. LEYVA-MIR, S. G., HERNÁNDEZ, L. Y., TLAPAL-BOLAÑOS, B., FLORES-MARTÍNEZ, R. 2009. Etiología del tizón descendente de las ramas de azucena híbrida (*Lilium* spp.) En villa guerrero, estado de México *Revista Chapingo serie horticultura* 15(1): 5-8.
29. LIAO, J. Y; CHANG, C. A; YAN, C. R; CHEN, Y. C; DENG, T. C. 2003. Detection and incidence of Cactus virus X on pitaya in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin* 12: 225-234.
30. MENDEZ, G. J. S.; TALAVERA, M. D.; GRACIA, H. J. E. 2008. Identificación y control de las principales enfermedades del nopal. VI Sinposium "Taller de Produccion y aprovechamiento del nopal en el noreste de México" Memorias, Mina, N.L., México. 24 y 25 de octubre de 2008.14p
31. MENDOZA, M. F., JIMÉNEZ. E., MAIER. F. SHAFER. W., LEYVA. M. ACOSTA. M., ALVARADO Y. 2005. Empleo de la tinción anilina azul-KOH en el estudio de la interacción banano-*Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal* 5(1): 45-46p.
32. MILBRATH M, G.; NELSON, M., R.1972. Isolation and characterization of a virus from saguaro cactus. *Phytopathology* 62:739-742.

33. MONTIEL D.; OLIVARES J.L.; ZAVALA .P.; FIERRO A. 2004. Hongos asociados al cultivo de *Opuntia mutudae* y *O. joconostle* en Hidalgo, México. *Proteccion vegetal* 19(2):137-139.
34. NELSON M., R.; TREMAINE J., H. 1975. Physiochemical and serological properties of virus from saguaro cactus. *Virology* 65 (2): 309-319.
35. OSADA, K. S.; CARCAMO. R. A. 1991. Etiología de la mancha negra del nopal. Congreso Nacional de Fitopatología. Memorias de resúmenes. Sociedad Mexicana de Fitopatología. 28p.
36. PIMIENTA, E. 1997. El nopal en México y el mundo. In: Conabio. *Suculentas Mexicanas. Cactáceas*. CONABIO. México 87-95 pp.
37. QUEZADA S. A. 2005. Etiología de la mancha negra del nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. 51p.
38. QUEZADA S., A; SANDOVAL, I., J. S; ALVARADO, R. D; CÁRDENAS, S., E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. *Agrociencia* 40:5p
39. RAMOS R. J., QUINTANA, M V. 2004. Manejo general del cultivo del nopal. Colegio de Postgraduados. 5-8p.
40. RODRÍGUEZ L., E.; LOMELI, F. J. R.; LÓPEZ, J. Y A. 2008. Cadena Productiva del Nopal Verdura: II Taller de avances de investigación del Grupo Interdisciplinario de Investigación del Nopal (GIIN). Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo, Texcoco, México. 69 p.

41. Secretaría de Desarrollo Agropecuario, Proyecto GPS. 2007. Tomado de <http://www.oedrusmorelos.gob.mx/estadisticasagrop/Proyectos%20GPS/SupNopal.htm>. 22 de febrero de 2009
42. SIAP-SAGARPA. 2010. Anuario estadístico de la producción agrícola.
43. TORRES, S. A. 2010. Sistemas de producción de nopal forrajero en Brasil. VIII Simposium- Taller Nacional y 1er Internacional "Producción y Aprovechamiento del Nopal" Revista Salud Ed. 5.
44. VALDEZ F. C. A., ESQUIVE L. J. M., MORENO R. P. P. 1995. El mercado mundial del nopalito. Universidad Autónoma Chapingo. 13-14p.
45. VAN DER VLUGT R. A.A., STIJGER C.M., NAALDWIJK A.A., VERHOEVEN J.T.J., LESEMANN D.E. 2000. First report of Pepino mosaic virus on tomato. Plant Disease 84, 103.
46. ZARCO, J. R., VIRUEGA, L. F Y TRAPERO, A. 2007. Detección de la infecciones latentes de *Spilocaea oleagina* en hojas de olivo. Bol. San. Veg. Plagas, 33: 235.

Anexo 1

EXTRACCION DE RNA CON TRIAZON^{MR}

1. Pesar 0.1 g de tejido
2. Macerar con 250 µl de Triazol
3. Agregar 750 µl de Triazol
4. Incubar 5 min a 30°C
5. Agregar 200 µl de cloroformo por cada ml de Triazol
6. Mezclar por agitación e incubar 2 a 3 min a 30°C
7. Centrifugar 15 min a 10000 rpm a 2-8°C
8. Pasar el sobrenadante a otro tubo
9. Precipitar a con 500 µl de isopropanol
10. Incubar 10 min a 30 °C
11. Centrifugar 10 min a 10000 rpm a 2-8 °C
12. Desechar el sobrenadante
13. Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%
14. Centrifugar 5 min a 8000 rpm a 2-8 °C
15. Desechar el sobrenadante
16. Secar la pastilla a temperatura ambiente sobre una sanita
17. Resuspender el RNA en 40-50 µl de agua libre de nucleasas
18. Almacenar a 70 °C

METODO DE EXTRACCION DE RNA DOBLE CADENA

1. Macerar el tejido en nitrógeno o congelar el mortero con la muestra en el refko a -70 °C y pasar a un tubo de 50 ml. añadir 10 ml de STE 1X, 1 ml de SDS al 10%, 500 ml de bentonita al 2% y 9 µl de fenol-STE 1X.
2. Poner el tubo en agitación fuerte durante 30 min.
3. Centrifugar a 8000 rpm durante 10 min, calibrar con STE 1X.
4. Recuperar la fase acuosa en otro tubo y agregar 2.1 ml de etanol absoluto frio, se mezcla bien y se guarda a -20 °C.
5. En otro tubo se mezcla 25 ml de STE 1-etanol al 16% y 1g de celulosa-CF 11, agitar vigorosamente hasta que se deshagan los grumos. Tomar una jeringa de 20ml colocándole un círculo de papel filtro en el fondo y vaciar el contenido del tubo sin regresar liquido, deje que se drene completamente.
6. Tome el tubo del paso 4, descongelar el contenido y agregarlo en la columna de celulosa
7. Ya que el contenido de la jeringa se haya drenado añadir 25 ml de STA 1X-etanol 16% par limpiar la columna e eliminar el DNA, RNA de cadena sencilla, clorofilas, etc. Este paso se repite hasta que la columna vuelva hacer blanca.
8. Cuando la columna ya este blanca, se coloca por debajo de ella un tubo limpio, a la columna s ele agrega 10 ml de STE 1X sin etanol y se recupera el filtrado
9. Al filtrado se le agraga 20 ml de etanol absoluto frio y 500 µl de acetato de sodio 3M.
10. Mezclar bien y centrifugar a 8000rpm durante 30 min. Para calibrar se utiliza etanol absoluto.

11. Se elimina el sobrenadante en un solo movimiento, no regrese el líquido, vierta el tubo sobre una sanita.
12. Cuando la pastilla este seca agregue 100 a 200 μl de agua libre de nucleasas, cuidando de lavar bien las paredes. Se centrifuga brevemente para recuperar todo el líquido y se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

PLANT RNA REAGENT

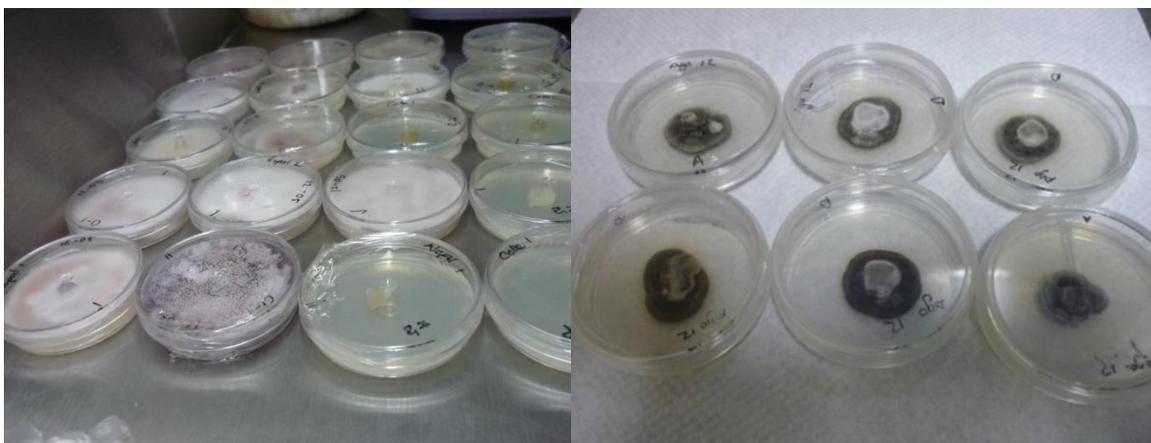
1. Adicionar 500 μ l de Plant RNA frio para 0.1g de tejido congelado, agite brevemente hasta que la muestra etc., completamente resuspendida.
2. Incubar el tubo por 5 min a temperatura ambiente, poniéndolo de manera horizontal para maximizar el área superficial durante la extracción de RNA.
3. Aclarar la solución centrifugando por 2 min a 12000 rpm en la micro centrifuga a temperatura ambiente. Transferir el sobrenadante a otro tubo.
4. Adicionar 100 μ l de NaCl 5M al extracto clarificado, tapar el tubo y mezclar.
5. Adicionar 300 μ l de cloroformo. Mezclar completamente por inversión.
6. Centrifugar la muestra a 4 °C por 10min a 12000 rpm hasta separar las fases. Transferir la parte superior, fase acuosa en un tubo para RNA.
7. Adicionar a la fase acuosa un volumen igual de alcohol isopropilico, mezclar y dejar parado a temperatura ambiente por 10 min.
8. Centrifugar la muestra a 4 °C por 10min a 12000 rpm. Decantar cuidadosamente teniendo cuidado para no perder la pastilla y adicionar 1 ml de etanol al 75% a la pastilla.
9. Centrifugar a temperatura ambiente por 1min a 12000 rpm decantar liquido sobrenadante, teniendo cuidado de no perder la pastilla. Centrifugar brevemente hasta coleccionar el liquido residual y remover con una pipeta.
10. Adicionar 10-30 μ l de agua libre de nucleasas hasta disolver el RNA. Pipetear el agua arriba y abajo sobre la pastilla hasta disolver el RNA, si se observa alguna nubosidad, centrifugar la solución a temperatura ambiente por 1 min a 120000 rpm y transferir el sobrenadante a otro tubo.

METODO DE INOCULACION DE CLADODIOS CON *Pseudocercospora* y *Colletotrichum*.

1. Se sembraron 93 cladodios asintomáticos en un sustrato de 50% de tezontle y 50% de peat moss en macetas del número 7 en el invernadero del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo.



2. Para la inoculación de los hongos se sembró en PDA el hongo de *Colletotrichum* y reactivó el hongo de *Pseudocercospora*.



3. El inóculo se obtuvo colocando en medio líquido papa dextrosa (PD) las diferentes cepas, estas se pusieron en agitación continua para obtener el micelio a inocular en cada penca del nopal verdura.



4. Para la preparación del inóculo se observó la cantidad de conidios mediante la cámara Neubauer y se realizaron diluciones para llegar a una concentración de 16×10^6 , 16×10^6 , 19×10^6 , 14×10^6 y 14×10^6 , para *Colletotrichum* 1, *Colletotrichum* 2, *Colletotrichum* 3, *Colletotrichum* 4 y Nopal 1 y 1.5×10^6 para *Pseudocercospora*, para las inoculaciones se tomaron 6×10^4 UFC/ml para *Pseudocercospora* y 2×10^5 UFC/ml para las cepas de *Colletotrichum*



5. Para la inoculación se asperjando el micelio a la penca con y sin heridas y se taparon con bolsas de plástico para aumentar la humedad relativa.



6. Combinaciones utilizadas para la inoculación de hongos.

Combinaciones	Ufc/ml
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum 1</i>	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum 2</i>	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum 3</i>	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$
<i>Pseudocercospora/ Colletotrichum 4</i>	$6 \times 10^4 / 2 \times 10^5$
<i>Pseudocercospora</i>	6×10^4

7. Las pruebas de patogenicidad se realizó en un cuarto cerrado con aire acondicionado marca LG mod. WD81CM para mantener una temperatura de 18° C para favorecer la penetración de los hongos y con 12h de luz.

