



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**  
**AGRÍCOLA**



**POSGRADO EN PROTECCIÓN VEGETAL**

PROTECCION VEGETAL

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS A**  
**CLADODIOS DE NOPAL CON SÍNTOMAS DE ENGROSAMIENTO**  
*(Opuntia ficus indica (L) Mill.).*

**TESIS PROFESIONAL**

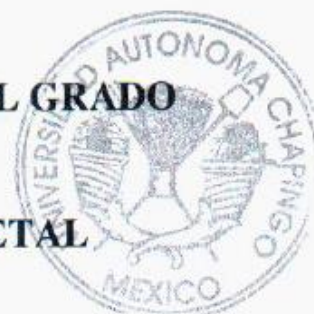
**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO**

**DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

**PRESENTA:**

**GUADALUPE LÓPEZ BUENABAD**



DIRECCION GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXAMENOS Y OPOSICIONES

**CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, JUNIO 2015**

La presente Tesis, titulada: **AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS A CLADODIOS DE NOPAL CON SÍNTOMAS DE ENGROSAMIENTO (*Opuntia ficus indica* (L) Mill.)**, realizada y presentada por la alumna: **Guadalupe López Buenabad** bajo la dirección del comité asesor indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

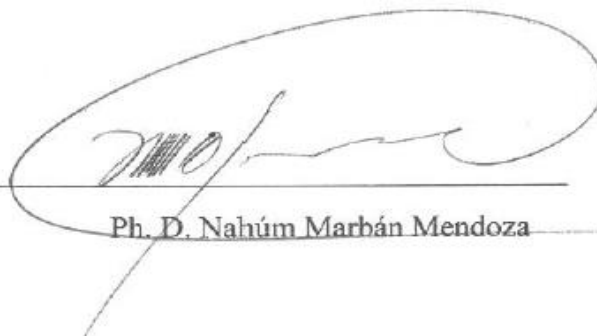
**MAESTRO EN CIENCIAS EN PROTECCIÓN VEGETAL**

DIRECTORA:



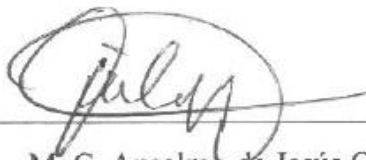
Dra. Ernestina Valadez Moctezuma

ASESOR:



Ph. D. Nahúm Marbán Mendoza

ASESOR:



M. C. Anselmo de Jesús Cabrera Hidalgo

Chapingo, Edo. De México, Junio 2015.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por ser la institución que financió mis estudios de Posgrado.

A la Universidad Autónoma de Chapingo, por ser el medio para concretar mi formación profesional, a través del Posgrado en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola, sus instalaciones y su academia.

Al comité asesor por su orientación y apoyo en la realización de este trabajo.

A la Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por su dirección siempre tan acertada, por sus conocimientos compartidos y su valioso tiempo dedicado a este trabajo de tesis.

Al Ph. D. Nahúm Marbán Mendoza, por su apoyo y participación en la presente tesis.

Al Dr. Anselmo de Jesús Cabrera Hidalgo por su participación y sus comentarios con respecto a este trabajo.

A la M.C. Carmen Medina Mendoza, por la asesoría técnica en el desarrollo de este trabajo de investigación. A los compañeros de laboratorio TSU Karina Cruz Aguilar, TSU Abraham Merino Chávez, Dra. Claudia Verónica de Teodoro Pardo, Dr. Samir Samah, por toda su ayuda y colaboración durante este trabajo de investigación.

A la Dra. Norma Marina Alarcón Rodríguez por su apoyo en la fase de secuenciación.

A Ana Eugenia Rangel Castillo, Abraham Jiménez Camargo y Nelson Laville, por todas sus aportaciones y sugerencias. A Dolores Luna Almanza y Alberto Zaragoza, por todas las facilidades brindadas en el trabajo de laboratorio.

## **DEDICATORIA**

A Eustolia, Marcela, Blanca y Elsa<sup>†</sup> por estar siempre al lado mío impulsándome en lo personal y lo profesional. A mis sobrinos Rocío y Saúl, por ser siempre la alegría de la familia y nuestro motivo para ser siempre mejores.

A Nelson Laville por acompañarme en esta experiencia, por su amor, apoyo y dedicación.

A mis amigos y amigas de la maestría: Ana Eugenia, Michelle, Karen y Abraham, por compartir todos los buenos momentos y hacer de los malos más llevaderos.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Guadalupe López Buenabad (1978)

Nació el día 01 de julio de 1978 en la localidad de San Sebastián Frontera, Chazumba, Oaxaca. Realizó sus estudios de nivel básico en la escuela primaria “Benito Juárez” (1987-1994); el nivel medio básico en la Escuela Secundaria Técnica No. 21 “Lázaro Cárdenas” (1994-1999); el nivel medio superior en la Preparatoria Federal por Cooperación “ C.P. Gilberto Martínez Gutiérrez (2000- 2002), todos estos en la ciudad de Tehuacán, estado de Puebla

Los estudios de nivel superior los realizó en la Universidad Autónoma Chapingo Departamento de Fitotecnia (2004-2009) obteniendo el título como Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. En el 2010 colaboró como Técnico Extensionista en la Secretaria de Desarrollo Rural en el estado de Puebla y del 2011 al 2012 como Técnico Extensionista en la Secretaria de Desarrollo Rural y Equidad para las Comunidades en el Distrito Federal. Inició sus estudios de Maestría en el Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo en el Posgrado de Protección Vegetal en el 2013 finalizando en 2015 con la presentación de este trabajo de investigación.

**Email:** [buenabadvv@hotmail.com](mailto:buenabadvv@hotmail.com)

## INDICE GENERAL

	Página
INDICE DE CUADROS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	v
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVO GENERAL	3
3.1 Objetivos específicos	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Origen y distribución	4
4.2 Características ecológicas	4
4.3 Características morfológicas	5
4.4 Taxonomía	5
4.5 Usos	6
4.6 Importancia mundial	7
4.7 Importancia nacional	8
4.7.1 Zonas productoras	9
4.7.2 Estado de México	11
4.8 Generalidades del cultivo	12
4.8.1 Cultivares	12
4.8.2 Método de plantación	13
4.8.3 Densidad de siembra	13
4.8.4 Riego	13
4.8.5 Labores culturales	13
4.8.6 Cosecha	14
4.8.7 Plagas	14
4.8.8 Enfermedades	15
4.8.8.1 Pudrición suave o bacteriana	15
4.8.8.2 Mancha negra	15

4.8.8.3 Mal de oro	16
4.8.8.4 Engrosamiento del cladodio	16
4.9 Herramientas moleculares para la determinación de la diversidad genética en hongos fitopatógenos	19
4.9.1 Marcadores	20
4.9.2 Marcadores morfológicos	20
4.9.3 Marcadores genéticos	20
4.9.4 Técnicas moleculares	21
4.9.4.1 Purificación del DNA	21
4.9.4.2 Reacción Cadena Polimerasa (PCR)	21
4.9.4.3 Internal Transcribed Spacer (ITS)	22
4.9.4.4 Polimorfismos de Fragmentos de Restricción (RFLP)	23
4.9.4.5 Enzimas de restricción	23
4.9.4.6 Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)	24
4.9.4.7 Secuenciación	25
4.9.4.8 Antecedentes en la identificación de agentes causales de enfermedades en nopal	26
V. MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Área de estudio	28
5.2 Recolecta de material	29
5.3 Aislamiento y purificación de hongos	29
5.4 Caracterización fenotípica	30
5.5 Caracterización molecular	30
5.5.1 Protocolo de extracción de DNA en hongos.	30
5.5.2 Cuantificación y calidad de DNA	31
5.5.3 Amplificación de fragmentos	32
5.5.3.1 Condiciones de PCR-ITS para la amplificación de DNA ribosomal	32
5.5.3.2 Electroforesis de la amplificación	33
5.5.3.3 RFLP-ITS	33

5.5.3.4 Gel de acrilamida al 6%	34
5.5.3.5 PCR-ISSR	35
5.5.3.6 Secuenciación	36
5.5.3.7 Reacción de secuenciación.	37
5.5.4 Análisis de datos	38
5.5.4.1 Análisis PCR-RFLPs	38
5.5.4.2 Análisis PCR-ISSR	39
5.5.4.3 Análisis de secuencias	39
5.5.4.4 Elaboración de árboles filogenéticos	39
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>41</b>
6.1 Aislamientos y purificación de hongos asociados a cladodios de nopal con y sin síntomas de engrosamiento	41
6.2 Caracterización fenotípica	42
6.3 Caracterización molecular	49
6.3.1 Extracción de DNA	49
6.3.2 Amplificación de fragmentos ITS	49
6.3.3 RFLP-ITS	50
6.3.4 PCR-ISSR	57
6.3.5 Secuenciación	59
6.3.6 Análisis de secuencias	59
6.3.7 Análisis filogenético	63
<b>VII. CONCLUSIONES</b>	<b>65</b>
<b>VIII. LITERATURA CITADA</b>	<b>66</b>



## INDICE DE CUADROS

	<b>Página</b>
<b>Cuadro 1. Producción de nopal en México en la modalidad de riego y temporal en el 2013.</b>	<b>9</b>
<b>Cuadro 2. Estados productores de nopal forrajero en México (riego y temporal) en el 2013.</b>	<b>9</b>
<b>Cuadro 3. Estados productores de Nopalitos en México (riego y temporal) en el 2013.</b>	<b>10</b>
<b>Cuadro 4. Estados productores de tuna (riego y temporal) en México en el 2013.</b>	<b>11</b>
<b>Cuadro 5. Principales plagas en nopal.</b>	<b>14</b>
<b>Cuadro 6. Secuencias de los iniciadores para amplificar región ITS.</b>	<b>32</b>
<b>Cuadro 7. Reacciones PCR-ITS, se realizaron a un volumen de 50 <math>\mu</math>L.</b>	<b>32</b>
<b>Cuadro 8. Iniciador para PCR-ISSR.</b>	<b>35</b>
<b>Cuadro 9. Reacción para PCR-ISSR a un volumen de reacción 25 a <math>\mu</math>L</b>	<b>36</b>
<b>Cuadro 10. Iniciadores para amplificar intrones del gen del factor elongación y de la traducción 1<math>\alpha</math> (EF1<math>\alpha</math>).</b>	<b>36</b>
<b>Cuadro 11. Reacciones para amplificar intrones del gen del factor de elongación de la traducción 1<math>\alpha</math> (EF1<math>\alpha</math>), se realizaron a un volumen de 50 <math>\mu</math>L</b>	<b>37</b>
<b>Cuadro 12. Identificación de secuencias</b>	<b>60</b>

## INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Síntomas del engrosamiento del cladodio en nopal. Imagen tomada el 24 de enero del año 2014, en la región de San Juan Teotihuacán, Estado de México. Imagen de la autora.	17
Figura 2.	Zona de muestreo en el Estado de México.	28
Figura 3.	Proporción de hongos encontrados en cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento en los municipios de San Martín de las Pirámides, San Juan Teotihuacán, Nopaltepec y Axapusco, Estado de México, en enero del año 2014.	41
Figura 4.	Coloraciones del micelio de <i>F. subglutinans</i> en medio de cultivo PDA.	43
Figura 5.	<i>F. subglutinans</i> . a) Crecimiento en PDA, b) Microconidios unicelulares hialinos y macroconidios fusiformes, c) Macroconidio con cuatro septas. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega píxeles 5X. Imagen de la autora.	43
Figura 6.	<i>F. oxysporum</i> a) Coloración de colonias de 10 días en medio PDA, b) Macroconidios, c) Fialides y microconidios, d) Coloración de colonias de 30 días en medio PDA e) Clamidosporas. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 40X y 10X (e), tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega píxeles 5X. Imagen de la autora.	44

<b>Figura 7.</b>	<b><i>A. alternata</i>. a) y b) Crecimiento de la colonia en medio PDA, c), d) y e) Conidióforos simples con conidios apicales, f) y g) micelio septado. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. Imagen de la autora.</b>	<b>45</b>
<b>Figura 8.</b>	<b>Coloraciones y crecimiento de colonias de <i>Phoma</i> sp. en medio PDA.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 9.</b>	<b><i>Phoma</i> sp. a) Colonia en PDA, b) Clamidosporas solitarias y en cadena. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. Imagen de la autora.</b>	<b>47</b>
<b>Figura 10.</b>	<b><i>M. opulenta</i> a) Colonias en medio PDA, b) Micelio desarrollado, c) Pseudotecio, d) Ascas octosporicas y ascosporas. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 10X (pseudotecio) y 40X. Tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. Imagen de la autora.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 11.</b>	<b>Gel de agarosa al 1.2% revelando fragmentos de 1000 a 1300 pares de bases (pb) aproximadamente del producto de PCR de la región ITS amplificado del DNA de hongos con los iniciadores NL4 y 5HP.</b>	<b>49</b>
<b>Figura 12.</b>	<b>Perfiles de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción.</b>	<b>51</b>
<b>Figura 13.</b>	<b>Dendograma generado por amplificación ITS y digerido con la enzima de restricción <i>Hinf</i>I. Grupo I: <i>Montagnula</i> sp., grupo II: <i>Phoma</i> sp., grupo III: <i>Alternaria</i> sp. y grupo IV: <i>Fusarium</i> sp.</b>	<b>52</b>

<b>Figura 14.</b>	<b>Dendograma generado por amplificación ITS y digerido con la enzima de restricción <i>Hha</i>I. Grupo I (<i>Alternaria sp.</i>), grupo II (<i>Phoma sp.</i>), grupo III (<i>Montagnula sp.</i>) y grupo IV (<i>Fusarium sp.</i>).</b>	<b>53</b>
<b>Figura 15.</b>	<b>Dendograma generado por amplificación ITS y digerido con la enzima de restricción <i>Hae</i>III. Grupo I (<i>Montagnula sp.</i>), grupo II (<i>Phoma sp.</i>), grupo III (<i>Alternaria sp.</i>) y grupo IV (<i>Fusarium sp.</i>).</b>	<b>54</b>
<b>Figura 16.</b>	<b>Dendograma generado por amplificación ITS y digerido con las enzimas de restricción <i>Hinf</i>I, <i>Hha</i>I y <i>Hae</i>III. Grupo I (<i>Phoma sp.</i>), grupo II (<i>Montagnula sp.</i>), grupo III (<i>Alternaria sp.</i>) y grupo IV (<i>Fusarium sp.</i>).</b>	<b>56</b>
<b>Figura 17.</b>	<b>Dendograma generado por PCR-ISSR con el iniciador (GGAT) 4. Grupo I (<i>Fusarium sp.</i>), grupo II (<i>Alternaria sp.</i>) y grupo III (<i>Montagnula sp.</i>).</b>	<b>58</b>
<b>Figura 18.</b>	<b>Gel de agarosa al 1.2% de productos amplificados de la región TEF e ITS.</b>	<b>59</b>
<b>Figura 19.</b>	<b>Árbol filogenético por Máxima Parsimonia obtenido del análisis del alineamiento de secuencias de la región TEF (<i>Fusarium</i>) e ITS (<i>Alternaria</i>, <i>Phoma</i> y <i>Montagnula</i>).</b>	<b>64</b>

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS ASOCIADOS A CLADODIOS DE NOPAL CON SÍNTOMAS DE ENGROSAMIENTO (*Opuntia ficus indica* (L) Mill.).**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FUNGI ASSOCIATED TO CACTUS PADS WITH SYMPTOMS OF THICKENING (*Opuntia ficus indica* (L) Mill.).**

**López Buenabad G.<sup>1</sup>, Valadez Moctezuma E.<sup>2</sup>**

**RESUMEN**

El nopal (*Opuntia ficus indica* (L) Mill.) es reconocido como la cactácea de mayor importancia económica. El 59% de la superficie cultivada con nopal se localiza en las zonas áridas y semiáridas de México. Al nopal lo pueden atacar hongos, bacterias, virus y fitoplasmas de diferente naturaleza. El engrosamiento es considerado como la más severa y se encuentra distribuida en la mayoría de las zonas nopaleras de nuestro país. Su agente causal se desconoce aunque se ha especulado la presencia de virus, fitoplasmas, factores abióticos como la deficiencia de calcio y desbalances hormonales. El objetivo de esta investigación fue aislar, comparar e identificar hongos obtenidos de plantas con y sin síntomas de engrosamiento del cladodio del nopal. La comparación se hizo mediante marcadores moleculares del tipo PCR-RFLP e ISSR y la identificación molecular a través de la secuenciación de la región ITS y TEF. Los resultados arrojaron la presencia de cuatro tipos de hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros: *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma* y *Montagnula*; distinguiéndose variabilidad genética al diferenciarlos por los perfiles generados con las técnicas de RFLPs e ISSR. La presencia dominante de *Fusarium* en cladodios de nopal con engrosamiento sugiere una relación con esta enfermedad.

**Palabras Clave:** RFLPs, ISSR, *Fusarium*.

**ABSTRACT**

*Opuntia ficus indica* (L) Mill. is recognized as the most economic important cactus. Fifty-nine % of the area cultivated with nopal is located in the arid and semiarid areas of Mexico. Fungi, bacteria, viruses and phytoplasmas of different nature damage the cactus. Thickening is considered the most severe problem and it is present in the most cacti areas of the country. Its causal agent is unknown although the presences of viruses, phytoplasmas, abiotic factors such as calcium deficiency and hormonal imbalances have been speculated. The objective of this research was to isolate, compare and identify fungi from plants with and without symptoms of thickening cladode cactus. The comparison was made by PCR-RFLP and ISSR molecular markers, and molecular identification through sequencing of the ITS region and TEF. The results showed the presence of four types of phytopathogenic fungi belonging to the genders: *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma* and *Montagnula*; genetic variability is distinguished when differentiate the profiles generated by RFLP techniques and ISSR. The dominant presence of *Fusarium* in cactus pads with thickening suggests a relationship with the disease.

**Key words:** RFLP, ISSR, *Fusarium*.

<sup>1</sup> Tesista, <sup>2</sup> Director

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) es una especie nativa del continente Americano (Bravo-Hollis, 1978) y actualmente tiene distribución mundial amplia (Patrick, 2004; Reyes *et al.*, 2004), es reconocida como la cactácea de mayor importancia económica (Kiesling, 1999; Nobel *et al.*, 2002) con 3.5 millones de hectáreas de nopaleras silvestres y más de 1.5 millones de hectáreas de nopaleras cultivadas.

El 59% de la superficie cultivada con nopal se localiza en las zonas áridas y semiáridas de México (Flores, 2004).

En el 2013, la superficie nacional sembrada de nopal (forrajero, tuna y nopalito) fue de 84,922 ha, según datos de la SIAP (2014). En este mismo año en el estado de México la superficie sembrada de nopal para verdura y tuna es de 869 ha y 16,774 ha respectivamente con un rendimiento de 93 ton/ha para nopal verdura y 8.19 ton/ha para tuna (SIAP, 2014).

El cultivo de nopal, ya sea con fines de verdura o tuna, implica una serie de prácticas agronómicas para incrementar los rendimientos, sin embargo el control de plagas y enfermedades ha sido un factor limitante, dado que no han sido objeto de estudio de manera significativa en el aspecto científico, reflejándose en la escasa literatura reportada para los aspectos fitosanitarios.

Gutiérrez (1992) y Pimienta (1974) reportaron el engrosamiento de cladodio de nopal, Chatilla o Nopal macho como una de las enfermedades importantes en este cultivo en el país. Los síntomas característicos de la sintomatología son un crecimiento reducido de la planta, seguido de un engrosamiento del cladodio y una pérdida gradual del color verde

característico, se reduce la producción de flores y las que salen, aparecen en la parte plana del cladodio.

Cano (2012) menciona que en el engrosamiento de cladodio de nopal no se encuentran presentes virus transmisibles mecánicamente o por los insectos *Chelinidea tabulata* o *Hesperolabops gelastops* (Kirk) debido a que fueron incapaces de transmitir los síntomas. En cuanto a reguladores de crecimiento este autor detectó que en las plantas con síntomas de engrosamiento el ácido giberélico y ácido indolbutírico estaban en desproporción con respecto a las de aspecto sano, lo que podría dar una explicación del engrosamiento, ya que estas auxinas están involucradas en la elongación celular, relacionando su carencia con el decremento de altura de la planta en general.

Debido a que no se ha establecido que tipo de agentes son los causales del engrosamiento de nopal y a la necesidad de identificarlos, el objetivo de este trabajo de investigación fue aislar, comparar e identificar morfológica y molecularmente hongos obtenidos de cladodios de plantas con y sin síntomas de engrosamiento.

## **II. HIPÓTESIS**

A través de la comparación de los perfiles de marcadores moleculares, es factible establecer diferencias y semejanzas entre los organismos que se comparen; entonces, si se utilizan técnicas de marcadores genéticos apropiadas será posible diferenciar a los hongos aislados de cladodios de nopal.

## **III. OBJETIVO GENERAL**

Aislar, comparar, caracterizar e identificar hongos asociados al cladodio de plantas de nopal con síntomas y sin síntomas de engrosamiento.

### **3.1 Objetivos específicos**

1. Comparar y agrupar aislamientos de hongos asociados al cladodio de nopal con síntomas y sin síntomas de engrosamiento, por su similitud morfológica y molecular.
2. Identificar los hongos aislados de cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento en base a sus características moleculares y morfológicas.



## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Origen y distribución

El género *Opuntia* y las cactáceas son originarias de América (Granados y Castañeda, 1991). El género *Opuntia* está distribuido desde Canadá hasta la Patagonia (Chile y Argentina) con casi 300 especies de cactus. En México se tienen registradas 104 especies y variedades (Nobel, 1995).

El nopal pertenece a la familia Cactaceae comúnmente conocidas como cactáceas o cactus. Las cactáceas son plantas que caracterizan los paisajes mexicanos, se distribuyen principalmente en las zonas áridas aunque una gran diversidad de especies se encuentra en las zonas tropicales, subtropicales y templadas. En México encontramos el mayor número de géneros y especies de toda América. En México se le llama nopal a varias especies del género “*Opuntia*” de la familia “*Cactaceae*” (Ríos y Quintana, 2004).

Los nopales (*Opuntia spp.*) están ampliamente distribuidos y representados en México por 66 especies y 33 variedades o subespecies con gran diversidad genética a nivel inter e intraespecífica (Bravo-Hollis, 1978).

### 4.2 Características ecológicas

El nopal se encuentra distribuido mayormente en las regiones áridas y semiáridas como los desiertos. Las condiciones para la vida en un desierto deben obedecer a adaptaciones para

climas con temperaturas extremas, alta radiación solar, fuertes vientos, poca humedad en el ambiente y en el suelo, suelos salinos y generalmente arenosos. Aunado a ello, deben enfrentarse a precipitaciones erráticas o nulas en largos periodos de tiempo. Por lo que el agua se convierte en un factor limitante en su vida. Las características ecológicas que incluyen las morfológicas, fisiológicas y bioquímicas del nopal han permitido su permanencia en estas regiones gracias a que juntas se combinan para lograr una economía del agua (Nobel, 1999).

#### **4.3 Características morfológicas**

La morfología de las plantas del genero *Opuntia* es variada, pueden ser arbustivas o arbóreas, con cladodios cilíndricos, con o sin espinas pequeñas llamadas ahuates y grandes que son consideradas hojas modificadas. Los frutos pueden ser polispermos, carnosos, ovoides y con espinas (Granados y Castañeda, 1991). Quizá su característica principal es la presencia de areolas (Bravo-Hollis, 1978). De cada areola se origina una flor o nopalito, las flores son autógamas y solamente abren durante 24 horas (Boke, 1980; Nerd y Mizrahi, 1995; Wang *et al.*, 1997); además, la mayor producción de brotes se presenta en cladodios de 1 o 2 años de edad (Bowers, 1996).

#### **4.4 Taxonomía**

El género *Opuntia* ha sido descrito por Philip Miller, publicado en The Gardeners Dictionary (González *et al.*, 2001), de acuerdo a la siguiente clasificación:

Reino: Plantae

Division: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Cariophyllydae

Orden: Cariophyllales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Opuntioideae

Tribu: Opuntieae

Género: *Opuntia* Mill.

#### **4.5 Usos**

El nopal tiene diversos usos de tipo antropocéntrico, tales como cerco vivo, conservador del suelo, clarificante de aguas y materia prima para elaborar artesanías, pinturas, fármacos diversos, fructosa y pectina (Mondragón y Pérez, 1994; Ochoa, 1997; Cárdenas *et al.*, 1998; Flores, 2004; Sáenz, 2004). Para los mexicanos el nopal es una planta de gran tradición y un símbolo nacional (Anaya, 2001; Stephen y Arias, 2001; Méndez *et al.*, 2004).

Para Callejas (2007), la industrialización de la tuna y el nopalito en México es de tipo semiartesanal, lo que dificulta cumplir los requerimientos que exigen las cadenas comerciales a sus proveedores y su comercialización se hace de forma regional, dentro del

área de producción; sin embargo, la industria mexicana está considerada como la más desarrollada del mundo.

Por su variedad, sabor, aroma y textura únicos, uno de los usos principales del nopal es el consumo en fresco del fruto, llamado tuna. Del fruto se pueden obtener directamente jugos y néctares, bebidas fermentadas y destiladas, licor, dulces, jaleas, mermeladas, fruta cristalizada, etc., (Sáenz, 2002; Sáenz, 2004; Nery *et al.*, 2006).

El uso de los nopalitas se incluye principalmente en la medicina y la alimentación (Pérez, 1998), por componentes como vitaminas, minerales, antioxidantes, fibra dietética, hidrocoloides y colorantes naturales (Sáenz, 2004). Esta verdura se ha convertido en un alimento muy apreciado, pues además de su contenido nutricional, repercute positivamente en la fisiología de los humanos y animales que lo consumen, con beneficios a la salud y prevención de las enfermedades (Sáenz, 2006).

Uno de los principales usos del nopal en el ámbito mundial es la utilización de las pencas en la cría de la cochinilla (*Dactylopius coccus* Costra), es la fuente del pigmento rojo natural llamado ácido carmínico, usados en el sector cosmético, farmacéutico, gastronómico y textil; además de uso ornamental (Llanderal y Nieto, 1999).

#### **4.6 Importancia mundial**

Dado el poder de adaptación que poseen las opuntias les permite colonizar casi cualquier medio, registrándose su presencia en diversas partes del mundo como en Argentina, Australia, Bolivia, Brasil, Colombia, Chile, España, Estados Unidos, Grecia, Guatemala, Italia y Oriente Medio (Barbera, 1999). Barbera e Inglese (1992) mencionan que la

producción italiana lo registra como un cultivo especializado, cultivando 2500 ha de una sola especie: (*Opuntia ficus-indica*).

SAGARPA (2015) menciona que para el 2011 los productores de tuna y nopal exportaron 7,200 toneladas al mercado de los Estados Unidos (Los Ángeles, Chicago, Detroit, Nueva York, Mc Allen); 500 toneladas a Canadá (Toronto y Montreal); 300 toneladas a Europa (Alemania, Holanda, Bélgica, Francia e Italia) y 100 a Sudamérica (Chile).

Para el 2013, los principales estados exportadores de tuna fueron Zacatecas, estado de México y Puebla, para nopal verdura fueron el Distrito Federal, Morelos y Estado de México (ASERCA, 2015).

Según Flores *et al.* (1995) la superficie mundial cultivada con nopal (verdura, tuna, forrajero y para producción de cochinilla) fue 1.3 millones ha; Brasil fue el principal país productor (36%), seguido de Sudáfrica (25%) y México (5%). El uso es 88% para forraje, 5.8% para producir tuna, 5.1% para la cría de cochinilla y 1.1 % para producir nopalito. El principal productor de nopal forrajero es Brasil (41%); de tuna y nopalito México (98% y 63%, respectivamente); y de grana cochinilla, Perú (97%).

#### **4.7 Importancia nacional**

En México esta hortaliza ocupa el 8vo lugar dentro del consumo de productos hortícolas, después del tomate rojo, papa, chile verde, cebolla, sandía, melón y tomate verde. Con un consumo per cápita anual de 8.5 kg (Flores *et al.*, 1995; Sánchez, 2006). Las estadísticas de producción nacional de nopal para tuna, forraje y nopal verdura se describen en el Cuadro 1:

**Cuadro 1. Producción de nopal en México en la modalidad de riego y temporal en el 2013.**

Cultivo	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Nopal forrajero	15,987.25	9,461.25	140,722.59	14.87	386.41	54,377.05
Nopalitos	13,123.91	12,520.73	786,774.52	62.84	2,448.17	1,926,160.70
Tuna	55,812.40	50,822.65	487,375.29	9.59	3,269.36	1,593,403.84

**Fuente: SIAP, 2014.****4.7.1 Zonas productoras**

El mercado de nopalito y tuna se concentra en el Distrito Federal y área metropolitana (70% de la producción nacional), siendo el Distrito Federal el principal productor de nopalito y el Estado de México el principal productor de tuna, seguidos de los estados de Morelos, Puebla e Hidalgo (Callejas, 2007).

En el cuadro 2 se citan los principales estados productores de nopal forrajero, siendo Coahuila el productor número uno.

**Cuadro 2. Estados productores de nopal forrajero en México (riego y temporal) en el 2013**

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Aguascalientes	1,024.50	976.50	33,219.00	34.02	291.64	9,688.11
Coahuila	13,941.75	7,704.75	82,216.90	10.67	399.18	32,819.53
Durango	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Jalisco	19.00	19.00	532.00	28.00	476.77	253.64
Michoacán	30.00	30.00	117.00	3.90	600.00	70.20
Nuevo León	30.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Zacatecas	941.00	731.00	24,637.69	33.70	468.61	11,545.57
	15,987.25	9,461.25	140,722.59	14.87	386.41	54,377.05

**Fuente: SIAP, 2014.**

En el centro del país el principal uso del nopal es como verdura, teniendo al Distrito Federal y Morelos como las principales entidades productoras de nopal verdura (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Estados productores de Nopalitos en México (riego y temporal) en el 2013.**

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Aguascalientes	203.00	201.00	10,395.08	51.72	1,761.71	18,313.09
Baja California	613.75	608.75	22,816.73	37.48	2,922.93	66,691.75
Baja California Sur	37.50	34.50	249.00	7.22	7,901.20	1,967.40
Chihuahua	2.00	2.00	18.00	9.00	8,000.00	144.00
Colima	23.00	23.00	321.00	13.96	3,838.01	1,232.00
Distrito Federal	4,331.00	4,331.00	270,064.00	62.36	3,198.20	863,717.56
Durango	81.18	76.00	2,600.00	34.21	5,585.77	14,523.00
Guanajuato	244.00	241.50	4,995.94	20.69	2,448.93	12,234.69
Guerrero	9.00	9.00	157.18	17.46	4,921.15	773.51
Hidalgo	32.50	32.00	799.70	24.99	3,770.31	3,015.11
Jalisco	736.50	435.50	23,006.23	52.83	3,446.78	79,297.42
Michoacán	340.00	325.50	9,503.35	29.20	4,455.82	42,345.18
Morelos	3,566.00	3,416.00	326,330.00	95.53	1,785.10	582,530.66
México	869.50	861.50	80,697.35	93.67	2,044.47	164,983.49
Nayarit	46.50	46.50	234.05	5.03	2,629.13	615.35
Nuevo León	2.00	2.00	6.00	3.00	7,000.00	42.00
Oaxaca	96.50	93.00	1,178.19	12.67	4,103.50	4,834.71
Puebla	250.00	235.00	13,714.15	58.36	732.88	10,050.83
Querétaro	34.50	33.50	547.81	16.35	4,445.83	2,435.47
San Luis Potosí	432.00	426.00	1,134.74	2.66	1,057.55	1,200.04
Sinaloa	14.00	14.00	133.50	9.54	3,554.78	474.56
Sonora	136.00	88.00	1,805.70	20.52	5,245.06	9,471.00
Tamaulipas	642.48	605.48	6,727.16	11.11	1,942.70	13,068.87
Tlaxcala	12.00	12.00	126.00	10.50	4,714.29	594.00
Veracruz	21.50	21.50	449.20	20.89	5,268.86	2,366.77
Zacatecas	347.50	346.50	8,764.46	25.29	3,336.00	29,238.26

**Fuente: SIAP, 2014.**

Los estados de México y Zacatecas son los principales productores de tuna a nivel nacional (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Estados productores de tuna (riego y temporal) en México en el 2013.**

Ubicación	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton/Ha)	PMR (\$/Ton)	Valor Producción (Miles de Pesos)
Aguascalientes	769.00	754.00	2,336.60	3.10	2,860.38	6,683.57
Baja California Sur	96.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Coahuila	131.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Durango	18.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Guanajuato	1,786.50	1,706.50	20,447.60	11.98	2,506.31	51,248.03
Hidalgo	6,255.00	5,339.00	25,465.75	4.77	3,504.54	89,245.76
Jalisco	2,152.00	2,152.00	12,853.20	5.97	3,409.46	43,822.42
Michoacán	3.00	3.00	9.60	3.20	3,400.00	32.64
México	16,774.00	16,774.00	137,312.60	8.19	3,525.25	484,061.17
Nayarit	10.00	10.00	38.96	3.90	3,061.79	119.29
Oaxaca	65.00	41.00	185.84	4.53	3,178.99	590.78
Puebla	4,842.00	4,429.00	75,691.50	17.09	3,759.06	284,528.74
Querétaro	649.00	492.00	1,072.98	2.18	4,632.06	4,970.11
San Luis Potosí	2,696.00	1,657.00	11,413.06	6.89	3,614.81	41,256.01
Tamaulipas	1,500.00	1,430.00	4,290.00	3.00	3,033.80	13,015.00
Tlaxcala	32.00	32.00	232.00	7.25	1,800.00	417.60
Veracruz	22.00	20.00	110.00	5.50	3,500.00	385.00
Zacatecas	18,011.90	15,983.15	195,915.60	12.26	2,924.87	573,027.75
	55,812.40	50,822.65	487,375.29	9.59	3,269.36	1,593,403.84

**Fuente: SIAP, 2014.**

#### 4.7.2 Estado de México

En el estado de México se cultivan 16, 774 ha de nopal para la producción de tuna y 869.5 ha para nopalito, concentradas principalmente en los municipios de San Martín de las Pirámides, Otumba, Axapusco y San Juan Teotihuacán, con un valor de la producción de \$ 484,061.00 para tuna y para nopalito de \$ 164, 983.00 (SIAP, 2014; Flores *et al.* 1997).



## 4.8 Generalidades del cultivo

### 4.8.1 Cultivares

En la zona productora correspondiente al estado de México, Hidalgo y Tlaxcala, el principal cultivar es Alfajayucan (*O. Albicarpa* Scheinvar) cuyo rendimiento oscila en 7.3 ton/ha (Flores *et al.*, 1997; Castellanos *et al.*, 1999).

Chapman *et al.*, (2002) reporta que en la región tunera del estado de México, aledaña a San Juan Teotihuacán se cultivan más de 7,000 ha con la variedad Reyna. Adicionalmente, en algunas zonas productoras como San Martín de las Pirámides, se produce el tipo de tuna acida llamada “xoconostle”, predominando dos especies “Xoconostle chivo” (*Opuntia oligacantha*) y “Xoconostle cuaresmero” (*Opuntia matudae*) que es la especie más difundida y mejor cotizada en el mercado (Cano *et al.*, 1999 y Scheinvar, 1995).

Higuera (1996) hace referencia que en el estado de Puebla los productores de esta zona tunera basan su producción en un solo cultivar conocido como “Blanca villanueva”, cuyos rendimientos son altos (15 a 20 ton/ha). En tanto que en la región centro-norte se distingue por la explotación de una amplia diversidad de cultivares en cuanto a tamaño, color y época de cosecha: Burrón, Cristalina, Amarilla montesa, Pico chulo, Rojo pelón, Esmeralda, Gavia, Blanca San José, Alfayuca, Chapeada, Papantón, Rubí Reyna, entre otras de menor importancia (SAGAR, 1998).

#### **4.8.2 Método de plantación**

El método de propagación es asexual siendo el más práctico y sencillo. Puede llevarse a cabo utilizando pencas completas, fracciones mínimas de una penca o conjuntos de dos o más pencas (Vázquez, 1981; Cruz, 1982; Pimienta, 1988 y Estrada *et al.* 1994).

Unos quince días antes de realizar la plantación en el terreno se procede a cortar las pencas. Estas se colocan bajo la sombra para que cicatricen y evitar pudriciones una vez establecidas en el terreno. El corte debe protegerse aplicándole una pasta bordelesa. Después del periodo de cicatrización se abre un surco de 10 a 15 cm de profundidad (García y Grajeda, 1991).

#### **4.8.3 Densidad de siembra**

Para la producción de nopal verdura (García y Grajeda, 1991) se recomienda que el número de plantas por hectárea deba ser de cuarenta mil plantas. Esto significa que se deja un metro entre surcos y 25 cm entre plantas.

#### **4.8.4 Riego**

Aun cuando la planta de nopal solo vive con el agua de las lluvias, es recomendable aplicar un riego ligero una vez por mes en los meses de sequía (García y Grajeda, 1991).

#### **4.8.5 Labores culturales**

La poda de formación es una práctica que consiste en que una vez que la penca plantada ha desarrollado su sistema de raíces y entra en actividad, se inicia la brotación de nuevas yemas, que darán origen a las pencas superiores; sobre estas se desarrollarán los nopalitas

que se cosecharán para la venta. Se deben seleccionar dos brotes centrales superiores de la penca inicial a fin de facilitar la cosecha y las limpias. La plantación debe mantenerse libre de las malas hierbas (García y Grajeda, 1991).

#### 4.8.6 Cosecha

La cosecha se presenta en los meses de lluvia. Como nopalitos, el mercado acepta brotes de 10 a 15 cm de longitud; pero en ocasiones se prefieren más pequeños o más grandes (García y Grajeda, 1991). Para tuna el momento del corte se pueden emplear los siguientes índices externos: tamaño y llenado de fruto, cambios externos de color, pérdida de los ahuates, firmeza del fruto y aplanamiento de la cavidad floral (Cantwell, 1995).

#### 4.8.7 Plagas

Borrego y Burgos (1986) consensan las principales plagas del cultivo de nopal (Cuadro 5), las cuales se presentan en el transcurso del año, correspondiendo a estados fenológicos y condiciones ambientales.

**Cuadro 5. Principales plagas en nopal.**

Nombre común	Nombre científico
Picudo barrenador	<i>Metamasius spinolae</i>
Barrenador o “torito”	<i>Moneilema spp.</i>
Grana o cochinilla	<i>Dactylopius opuntiae (Lichstenstein)</i>
Gusano cebra	<i>Melitara nephelepasa (Dyar)</i>
Gusano blanco	<i>Laniifera cyclades (Druce)</i>
Minador del nopal	<i>Maramara opuntiella (Busk)</i>
Barrenador de la unión de las pencas del nopal	<i>Metapleura potosí (Busk)</i>
Trips	<i>Neohyadatotrips opuntiae (Hood)</i>
Picudo de las espinas	<i>Cylindrocopturus biradiatus (Champion)</i>
Picudo de la penca	<i>Gerstaeckeria spp</i>
Chinche gris	<i>Chellinadea tabulata (Burmeister)</i>
Chinche roja	<i>Hesperolabops gelastops (Kirk)</i>
Chinche del fruto	<i>Narnia pallidicornis (Stal)</i>
Barrenador de la penca del nopal	<i>Aerotypia pleurotella (Walsingham)</i>
Escamas	<i>Diaspis echinocacti</i>

#### **4.8.8 Enfermedades**

El modo de establecimiento de las nuevas plantaciones de nopal, así como el deficiente manejo de los huertos ha propiciado el desarrollo de enfermedades (Osorio y Soto, 1994).

Osorio (1989) describe las siguientes enfermedades en nopal:

##### **4.8.8.1 Pudrición suave o bacteriana**

Las pencas afectadas por esta enfermedad se vuelven suaves, viscosas y oscuras, con exudados rojo amarillentos. La pudrición suave está limitada al tejido parenquimatoso; la cutícula y los filamentos vasculares permanecen intactos. En los cladodios afectados se percibe un olor desagradable. Según la parte afectada del cladodio, este puede llegar a caer rápidamente. Este problema es causado por la bacteria *Erwinia caratovora* ssp. *caratovora*.

##### **4.8.8.2 Mancha negra**

Inicialmente la enfermedad se ve como una mancha redonda, clorótica, la parte interna del tejido se vuelve de color verde oscuro y conforme avanza el daño se torna de color negro debido a la pudrición de tejidos. Cuando la enfermedad ha avanzado, bajo la epidermis se observa una pudrición blanda, semiacuosa de color negro. La lesión es circular y mide de 2.5 a 6.0 cm de diámetro. Las manchas pueden atravesar el cladodio y cuando están secas en la superficie de las mismas se observan las estructuras del hongo, el tejido dañado se cae y se observa una perforación a través de la penca. Una penca puede tener una o varias manchas, las cuales, según su posición, pueden ocasionar la caída de ésta, o bien un

debilitamiento de la planta. Se ha encontrado que el causante de la enfermedad puede ser *Macrophomina* o *Glomerella cingulata* (*Collectotrichum gloesporoides*).

#### **4.8.8.3 Mal de oro**

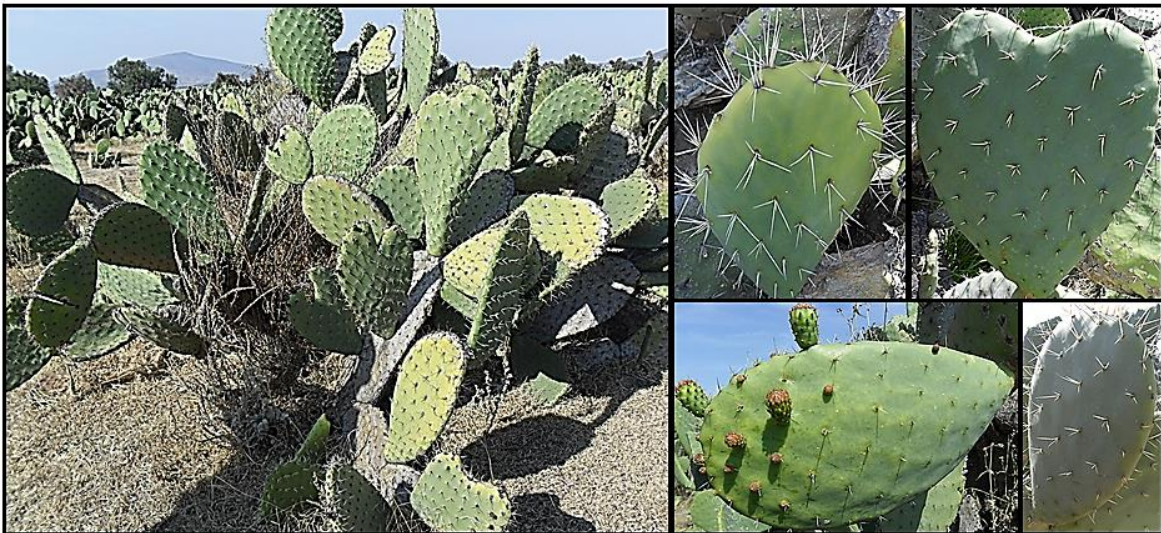
Esta enfermedad se caracteriza por un cambio paulatino en la tonalidad de color verde y posteriormente del verde al amarillo oro. La importancia de esta enfermedad radica en que impide la realización de la fotosíntesis en las pencas afectadas al ser cubiertas por el hongo; lo que puede traducirse en una reducción de la producción si la planta es severamente afectada. Esta enfermedad es causada por los hongos *Alternaria* spp. y *Hansfordia* spp.; no obstante autores como Chávez *et al.* (1981) señalan que *Alternaria* spp. y *Ascochyta* spp. son los causantes del daño.

Con respecto a enfermedades ocasionadas por virus, Chessin y Lesemann (1972), mencionan que se presentan en forma natural en cactáceas, estos son el virus Opuntia Sammons (SOV), virus X de los cactus (CVX), virus cactus 2 (CV2), virus en zygocactus (ZV), virus cactus del saguaro (SCV).

#### **4.8.8.4 Engrosamiento del cladodio**

Uno de los trabajos más sobresalientes sobre esta enfermedad fue realizado por García (1967); en dicho trabajo, se consigna por primera vez la presencia del hinchamiento excesivo de cladodios, la presencia de mosaicos y la proliferación excesiva de yemas. El engrosamiento de cladodios fue retomado posteriormente por Pimienta (1974) y Osorio (1989).

Esta enfermedad es considerada como la más severa y se encuentra distribuida en la mayoría de las zonas nopaleras de nuestro país. Los síntomas característicos de esta enfermedad son los siguientes: inicia con el amarillamiento de los brotes de un año, además estos se presentan en la parte plana del cladodio en lugar del margen, como es lo usual; el tamaño de los frutas y las pencas se reduce (60 y 90%), la planta en general aumenta de grosor por lo que de ahí deriva su nombre (Figura 1). Dado que los frutos, debido a su pequeño tamaño, son de forma esférica y de tamaño muy reducido no son comercializados. En estado avanzado de la enfermedad provoca que disminuya la brotación. Los cladodios afectados son de consistencia suave y tiene por lo general el ápice atrofiado. Así mismo, también es posible observar a la planta dañada parcialmente; esto es, unos brazos se observan sanos y otros enfermos. No se ha observado la muerte de las plantas y su agente causal se desconoce (Osorio, 1989).



**Figura 1. Síntomas del engrosamiento del cladodio en nopal. Imagen tomada el 24 de enero del año 2014, en la región de San Juan Teotihuacán, Estado de México. Imagen de la autora.**

Inicialmente, se supuso que su agente causal era un virus, pero los diversos estudios realizados hasta el momento lo señalan como un complejo de microorganismos. De acuerdo a Osorio (1989), estudios realizados a nivel de laboratorio demostraron que esta enfermedad tiene una alta capacidad infectiva, dado que ha sido posible transmitir los síntomas de plantas enfermas a plantas sanas; sin embargo, en campo su dispersión es lenta. Así mismo no se ha logrado la remisión de los síntomas con tetraciclinas. No obstante se observaron que después de cuatro años de manejo y la poda de formación y sanitaria redujo la severidad de la enfermedad.

Granata (1995) menciona que algunos autores han señalado que se trata de micoplasmas, mientras que otros lo reportan como fitoplasmas, pero es más posible que esta enfermedad se establezca a través de un complejo patogénico. En tanto que Felker *et al.* (2009) señalan que el posible agente causal sea un umbravirus y que su transmisión puede ser mecánica a través de áfidos aunque se continúan estudios que permitirán confirmar estas afirmaciones.

Cano (2012 ) realizó pruebas de detección de auxinas por el método de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para determinar la concentración de hormonas, lo cual mostró que el ácido indol-3-acético (AIA) es el principal responsable del desorden fisiológico, ocasionando el elongamiento celular, lo cual puede dar explicación del engrosamiento del cladodio en nopal.

En el estudio de factores bióticos y abióticos relacionados con el engrosamiento del cladodio de nopal realizado por Ramírez (2013) menciona que las plantas afectadas por el engrosamiento corresponden a plantas con deficiencias de calcio en el suelo, con concentraciones menores a 2000 ppm.

#### **4.9 Herramientas moleculares para la determinación de la diversidad genética en hongos fitopatógenos**

El conocimiento de la diversidad genética y patogénica de poblaciones de hongos fitopatógenos, en el contexto de su ámbito geográfico como en el de las interacciones con sus plantas hospederas, constituyen una información de especial relevancia. Su aplicación es eficaz en el manejo de estrategias de control integrado de enfermedades en cultivos agrícolas como lo es el uso de cultivares tolerantes o resistentes. Y que su eficacia de estos, puede verse comprometida por la variabilidad en ocasiones existente en las poblaciones de patógenos (Pallas *et al.*, 2007).

El desarrollo de metodologías moleculares y su aplicación al estudio de la diversidad genética de microorganismos fitopatógenos han permitido superar las limitaciones inherentes al empleo de procedimientos microbiológicos convencionales y además han ubicado el estudio de los hongos fitopatógenos en un contexto de biología de poblaciones (Pallas *et al.*, 2007).

Se han desarrollado y utilizado metodologías basadas en métodos de extracción de DNA/RNA tomadas directamente del suelo, microorganismos y plantas infectadas (De Boer *et al.*, 1995; Mercado-Blanco *et al.*, 2001). El desarrollo de la tecnología PCR (polymerasa chain reaction) constituye el paso metodológico subsiguiente en los análisis moleculares (White *et al.*, 1990; Pallas *et al.*, 2007).



#### **4.9.1 Marcadores**

Un marcador es cualquier característica morfológica o molecular de proteínas, enzimas, RNA o DNA, que permite establecer diferencias entre los organismos o grupo de organismos que se comparan (Valadez y Kahl, 2000).

#### **4.9.2 Marcadores morfológicos**

En el caso de microorganismos, los marcadores morfológicos pueden ser utilizados para diferenciarlos en cuanto a forma, color de la colonia, tipo de micelio, susceptibilidad a fagos o antibióticos, requerimientos nutricionales entre otros. La desventaja en la utilización de estos marcadores es que la mayoría son afectados por condiciones ambientales que pueden enmascarar los efectos del gen o genes de interés (Aguilar, 2003).

#### **4.9.3 Marcadores genéticos**

Permiten realizar un análisis directo de las translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones internas del DNA, en secuencias discretas y específicas. Para obtener marcadores de DNA se usan diferentes métodos para agruparse de manera convencional en tres categorías. La primera técnica conocida como hibridación tipo Southern, tiene el propósito de explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos de DNA, ocasionados por la restricción del genoma con algunas endonucleasas en particular. La segunda categoría agrupa las metodologías basadas en la tecnología de la reacción cadena polimerasa o PCR, la cual utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de DNA de longitudes no mayores de 6kb en promedio. La

tercera categoría involucra metodologías que combina los productos de PCR mas la hibridación tipo Southern (Valadez y Kahl, 2000).

#### **4.9.4 Técnicas moleculares**

Los microorganismos causantes de enfermedades pueden ser diagnosticadas por la identificación de características propias, tales como su material genético o proteínas. El uso de técnicas de marcadores moleculares permite el análisis simultáneo de un gran número de muestras; así como el diseño de primers específicos para la detección e identificación de diversos patógenos de plantas (Valadez y Kahl, 2005).

##### **4.9.4.1 Purificación del DNA**

En términos generales, la purificación del DNA implica el rompimiento de la estructura que lo contiene y la eliminación de cualquier sustancia contaminante o molécula unida a él, como son las proteínas, las membranas, las sales, etc. Los métodos más comunes involucran diferentes pasos de clarificación con disolventes para eliminar las fracciones gruesas (membranas y proteínas) y precipitaciones del DNA para la eliminación de impurezas más pequeñas. El método específico depende del origen del DNA, su tamaño y su estructura, y también el uso que se le pretenda dar a la molécula purificada (Balbás, 2002).

##### **4.9.4.2 Reacción Cadena Polimerasa (PCR)**

La PCR es una reacción enzimática en la cual un segmento de ADN de una región específica del genoma de la especie se amplifica de manera cíclica en una mezcla de reacción in vitro; lo anterior permite un aumento exponencial del segmento seleccionado de

ADN, llegando a obtener millones de copias que por cantidad es posible visualizar aun cuando la secuencia que se busca se encuentre en concentración muy baja (Saiki *et al.*, 1988; Balbás, 2002).

La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del ADN molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con el ADN entre los dos oligonucleótidos y se sigue con un paso de amplificación. Luego, se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo (Claros, 1998). Según la técnica, se usan uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN o diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Valadez y Kahl, 2000).

#### **4.9.4.3 Internal Transcribed Spacer (ITS)**

Los genes del rRNA de los eucariontes conocidos como DNA ribosomal o rDNA, se encuentran como unidades repetidas que están arregladas en tándem. Estos genes están localizados en sitios espaciadores de los genes 18S, 5.8S y 28S rRNA, el espacio transcrito interno se conoce como ITS1 e ITS2. Estas regiones de DNA permiten diferenciar especies dentro de un género mediante el análisis de las regiones espaciadoras de los genes del DNA

ribosomal, pero no son de utilidad para diferenciar al interior de la especie (Guadet *et al.*, 1989; Riethmuller *et al.*, 2002).

Los ITS, no son regiones codificantes de aminoácidos y por lo tanto están sujetas a una elevada variabilidad. Estas regiones generan un importante polimorfismo también dentro de la misma entidad taxonómica, en particular para género y especie (Guevara, 2007).

#### **4.9.4.4 Polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP)**

La técnica de RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms) se basa en el uso de enzimas de restricción que actúan sobre el DNA y permiten identificar polimorfismos en un determinado locus. Los alelos detectados vienen definidos por las diferentes longitudes de los fragmentos de DNA generados por alguna enzima de restricción. Los RFLP's han sido utilizados para la constitución de mapas de ligamiento, y en estudios de diversidad y evolutivos, pudiendo los datos generados mediante este tipo de marcador, ser analizados estadísticamente por diversos métodos (Nei y Kumar, 2000; Pallas *et al.*, 2008).

#### **4.9.4.5 Enzimas de restricción**

Las endonucleasas de restricción son enzimas que reconocen secuencias específicas de nucleótidos de DNA de doble cadena. La mayoría de las endonucleasas de restricción hidrolizan el DNA de un modo reproducible en un punto concreto dentro de una secuencia de reconocimiento. Generalmente, enzimas diferentes reconocerán secuencias diferentes que tienen una longitud de unos 4-6 nucleótidos (Becker *et al.*, 1997).

El análisis de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) fue el primer marcador de DNA utilizado por biólogos poblacionales (Parker *et al.*, 1998). Este

método expresa diferencias específicas del DNA que fueron reconocidas por enzimas de restricción particulares (endonucleasas). Cada una de las endonucleasas reconoce y corta solamente una secuencia específica de bases nitrogenadas en el DNA, siempre y cuando éstas no estén protegidas (metiladas). Por consiguiente cualquier DNA que no esté metilado puede ser reconocido y cortado en fragmentos de longitud definida; y cualquier mutación dentro de esos sitios, podría cambiar el patrón del fragmento y permitir que se detecte un RFLP al comparar dos o más genomas (Valadez y Kahl, 2000).

#### **4.9.4.6 Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)**

Los marcadores ISSR son obtenidos con PCR utilizando un solo iniciador o primer, cuya composición está basada en secuencias repetidas (motif) de dinucleótidos o trinucleótidos. El número de dinucleótidos o trinucleótidos varía, pero en general consta de al menos 14 de ellos. Las secuencias de los primers de microsatélites pueden ser anclados con uno o dos nucleótidos extras en sus extremos 5' o 3' (Wolfe, 2005).

Los primers anclados son más específicos, ya que además de seleccionar la región correspondiente al microsatélite, deben complementar las bases adicionales, lo que conlleva a que la especificidad de los productos seleccionados se incremente, de acuerdo al número de bases que conformen el ancla una vez que los fragmentos de DNA se han sintetizado (Valadez *et al.*, 2001).

Zietkiewicz *et al.* (1994) mencionan que los ISSR frecuentemente amplifican de 25 a 50 bandas en una sola reacción. Este patrón característico de productos de PCR se considera la “huella genética” de cada uno de los individuos analizados.

Los polimorfismos entre individuos de la misma población pueden detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido amplificado por el primer, o a la longitud de la secuencia intermedia amplificada.

Las bandas de ISSR son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homócigo o heterócigo), mientras que su ausencia representa el genotipo homócigo recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus.

La ausencia de una banda puede deberse a varios factores: la no existencia de un sitio de unión completo al primer debido a una mutación; re-arreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis; inserciones o deleciones suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifica como un locus diferente.

#### **4.9.4.7 Secuenciación**

En hongos fitopatógenos son frecuentes las comparaciones basadas en los “internal transcribed spacers” (ITS1 e ITS2) presentes en las regiones espaciadoras de los RNA ribosómicos (18S, 5.8S y 28S), así como las secuencias intergenicas (IGS, “intergenic repeat sequences”) localizadas entre las unidades repetitivas de los genes de rRNA nuclear. White *et al.* (1990) diseñaron los primeros iniciadores para la amplificación mediante PCR de las regiones ITS de hongos. Aunque estos iniciadores se diseñaron a partir de un número limitado de secuencias, su capacidad como herramienta de detección e identificación ha quedado ampliamente demostrada y su utilidad en el análisis de diversidad genética sigue vigente (Typas *et al.*, 1992; Collins *et al.*; 2003; Anderson y Cairney, 2004). La utilización de ITS en análisis filogenéticos de hongos es una práctica generalizada. Además, la

mayoría de los trabajos realizados en diversos organismos eucariotas indican que las ITS resultan más informativas para la reconstrucción filogenética a nivel de género y especie que otras secuencias génicas (Coleman, 2003). Otras secuencias frecuentemente utilizadas en la inferencia de filogenia en hongos son las que codifican para la subunidad pequeña del RNA ribosómico mitocondrial (mtSSU o rns), las regiones codificantes e intrones del factor de elongación de la traducción 1-(EF-1), de la  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -*tub*), de la histona 3 (H3), de la actina (Act), de la calmodulina (Cal), del citocromo b mitocondrial (cob) etc., (White *et al.*, 1990; Carbone y Kohn, 1999; Glass y Donaldson, 1995; O'Donnell *et al.*, 2000; Varga *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001).

#### **4.9.4.8 Antecedentes en la identificación de agentes causales de enfermedades en nopal**

El uso de estas o algunas herramientas moleculares para la identificación de agentes causales para las enfermedades en nopal son escasas, realizadas estas por lo general solo a nivel morfológico. Granata *et al.* (2006) realizó la técnica PCR/RFLPs para la caracterización de fitoplasmas asociados al engrosamiento de nopal. Flores (2012) realiza la identificación molecular de hongos asociados a la mancha negra del nopal, para lo cual extrajo DNA de los hongos aislados para posteriormente amplificar y secuenciar la región ITS de los mismos, reportando 8 hongos a nivel de género y especie, asociados a esta enfermedad. Ramírez (2013) realiza un análisis molecular, identificando y aislando microorganismos de raíz aislados de nopal con y sin síntomas de engrosamiento, identificando bacterias y hongos, algunos patogénicos y otros con actividad antifúngica, realizando extracción de DNA, amplificando la región ITS de los microorganismos aislados

y realizando una comparación entre ellos con el uso de marcadores moleculares como RFLPs, ISSR, RAPDS, además de secuenciar la región ITS y TEF.

Sin embargo, en la actualidad no hay mayores reportes del uso de estas herramientas moleculares en el diagnóstico de agentes causales en enfermedades del nopal, siendo la identificación morfológica la más recurrida.



## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Área de estudio

La zona de muestreo de cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento fue en el estado de México, en la región del valle de Teotihuacán productora de nopal-tuna. Comprendiendo los municipios de Nopaltepec, Axapusco, San Martín de las Pirámides y San Juan Teotihuacán (Figura 2), localizada entre los 2270 msnm hasta los 2450.

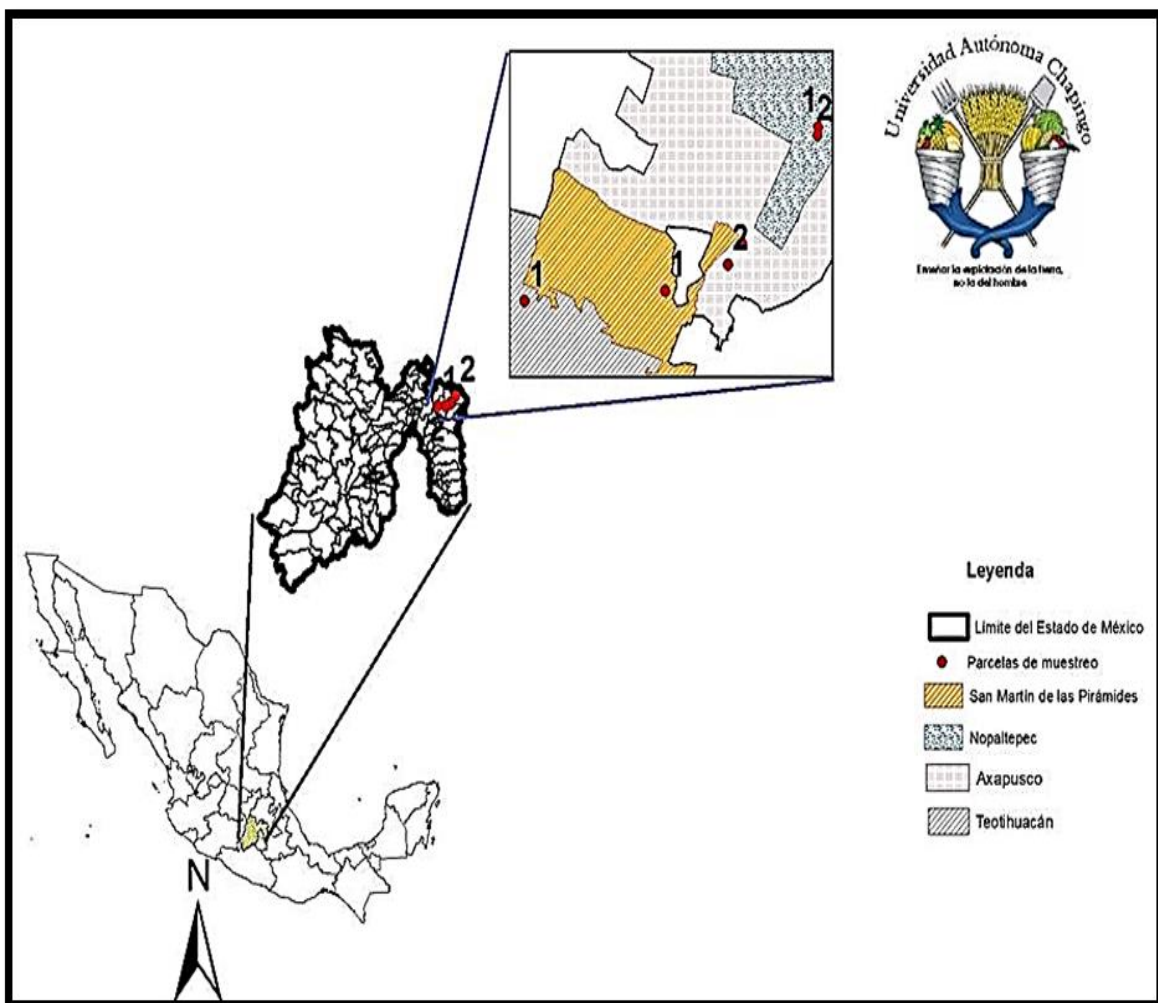


Figura 2. Zona de muestreo en el Estado de México.

## **5.2 Recolecta de material.**

La recolecta se realizó en el mes de enero en parcelas comerciales de nopal tuna. De cada uno de los municipios se eligieron muestras de acuerdo a la incidencia reportada por Cano (2012).

Se recolectaron un total de 25 muestras de cladodio, 21 con síntomas de engrosamiento y 4 sin los síntomas visibles. Se colocaron en papel estrasa y se conservaron en un lugar fresco. Se procesaron en el laboratorio de Biología Molecular en el departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

## **5.3 Aislamiento y purificación de hongos**

Los cladodios de nopal se lavaron con agua corriente, posteriormente se cortaron en tres partes correspondientes a la parte apical, parte media y base del cladodio, de cada parte obtenida se hicieron 5 cortes de aproximadamente medio centímetro, se colocaron en vasos de 25 mL con agua destilada; se obtuvieron 125 cortes en promedio.

En la campana de flujo laminar, en condiciones asépticas y con apoyo de un mechero de alcohol y pinzas de relojero, se llevó el proceso de desinfestación. Los cortes de cladodio se sumergieron en una solución de cloro comercial 25% durante 45 segundos, se les dio un enjuague con agua destilada estéril y se pasaron a otra solución alcohol etanol 70% durante 45 segundos posteriormente se les dio otro enjuague con agua destilada estéril y se les quitó el exceso de humedad con sanitas estériles. Se colocaron los 5 cortes correspondientes a una seccionen del cladodio en cajas Petri con medio de cultivo PDA (BIOXON®) acidificado (25 gotas de ácido láctico/L), se sellaron y se incubaron a 2°C por

aproximadamente 72 horas. Se obtuvieron cultivos monoconidiales a partir de punta de hifa en agar-agua, se transfirieron y conservaron en medio PDA acidificado.

#### **5.4 Caracterización fenotípica**

Se realizaron preparaciones microscópicas de raspado de micelio de los hongos teñidos con lactofenol y ácido láctico, se observaron estructuras para su identificación; para el caso de hongos del genero *Fusarium* primero se hizo la transferencia a medio Agar-Clavel para generar las estructuras de identificación.

Para la identificación morfológica de los hongos se utilizaron el Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett y Hunter, 1972), el Atlas de Hongos de Semillas y Suelos (Watanabe, 2002) y The Fusarium Laboratory Manual (Summerell y Leslie, 2006).

#### **5.5 Caracterización molecular**

##### **5.5.1 Protocolo de extracción de DNA en hongos.**

La extracción de DNA de los hongos purificados se realizó con el protocolo I CTAB con modificaciones, tomado de Weising *et al.* (2005). Bajo condiciones de la campana de flujo laminar y mechero de alcohol se recolectó la mayor cantidad de micelio de las cajas con medio PDA (0.5 mL) en tubos Eppendorf de 2 mL, se calentó 1 mL de CTAB (CTAB 2%, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1% PVP 40,000, 0.2%  $\beta$ -mercaptoetanol) por muestra a 60 °C, posteriormente se le agregaron 10  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol por muestra. Se incubó en una cámara de agitación (baño maría) por una hora a 60 °C con intervalos de mezcla por inversión cada 10 minutos. Se retiró de la cámara de agitación y se le agregó 1 volumen de alcohol cloroformo-isoamílico (24:1) y se mezcló

por inversión durante 10 minutos. Se centrifugó por 10 minutos a 8,000 rpm. El sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo, al cual se le agregó 0.6 volumen de alcohol isopropanol 100%, se mezcló por inversión. Se adicionó 1 mL de etanol 70%, se agitó durante 3 minutos, después se centrifugó por 10 minutos a 8,000 rpm. Se deshecho el sobrenadante quedando una pastilla, la cual se dejó secar en toallas sanitas. Se agregó buffer TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) 250  $\mu$ L a 500  $\mu$ L para despegar la pastilla y se incubó a 4 °C por 30 minutos. Se añadieron 8  $\mu$ L de RNAsa a una concentración de 10  $\mu$ g/mL, mezclándose e incubándose a 37 °C por una hora. Se agregó 0.05 volumen de 5M de NaCl, se mezcló por inversión e incubó 10 minutos a 4 °C. Se centrifugó por 30 minutos a 8,000 rpm. Se observaron dos fases, se transfirió el sobrenadante a tubo nuevo, se agregó 1 volumen de isopropanol 100%, se mezcló por inversión y se almacenó a -20 °C por una hora. Se centrifugó 10 minutos a 8000 rpm por 10 minutos. Se deshechó el sobrenadante, se secó la pastilla y se disolvió en 100  $\mu$ L de buffer TE.

### **5.5.2 Cuantificación y calidad de DNA**

Los productos de DNA obtenidos del proceso de extracción se cuantificaron con el software ND\_1000 V.3.5.2 utilizando el equipo NanoDrop espectrofotómetro ND 1000® (Accesolab S.A. de C.V.) a una longitud de onda de 260 nm.

### 5.5.3 Amplificación de fragmentos

#### 5.5.3.1 Condiciones de PCR-ITS para la amplificación de DNA ribosomal.

Para la identificación de los hongos encontrados en cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento se utilizaron los iniciadores (primers) 5HP y NL4 (O'Donnell *et al.*, 1993) para amplificar la región ITS, esta combinación permite obtener fragmentos de hasta 1200 pb cuyas secuencias se muestran en la Cuadro 6.

**Cuadro 6. Secuencias de los iniciadores para amplificar región ITS**

Iniciador	Secuencia (5'-3')
5HP	GGA-AGG-AGA-AGT-CGT-AAC-AAG-G
NL4	GGC-CCG-TGT-TTC-AAG-ACG-G

Se realizó una amplificación de PCR con la mezcla de los componentes de reacción por muestra, como se indica en la Cuadro 7. La *Taq* Polimerasa utilizada para las reacciones de PCR fue GoTaq® Flexi DNA (Promega) (5U/  $\mu$ L).

**Cuadro 7. Reacciones PCR-ITS, se realizaron a un volumen de 50  $\mu$ L.**

Reactivos	Concentración Stock	Volumen/ Tubo	Concentración Final
Buffer	5 X	10 $\mu$ L	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	5 $\mu$ L	2.5 mM
dNTP's	500 $\mu$ M	10 $\mu$ L	200 $\mu$ M
Primer 5HP	10 pM	1.5 $\mu$ L	15 pM
Primer NL4	10 pM	1.5 $\mu$ L	15 pM
AGUA*	-----	-----	-----
<i>Taq</i> Polimerasa	5 U	0.3 $\mu$ L	1.5 U
DNA <sup>1</sup>	-----	-----	$\pm$ 100 ng

\*La cantidad de agua utilizada fue la necesaria para aforar a un volumen de 50  $\mu$ L.

\*La cantidad de DNA varió dada las concentraciones obtenidas del proceso de extracción.

Se utilizó un termociclador automático (GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 95 °C por 4 min, 35 ciclos (94 °C por 1 min; 58 °C por 1 min; 72 °C por 2 min) y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min- 4 °C ∞. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.2%. Las imágenes fueron documentadas empleando el programa Quantity One (Bio-Rad®).

### **5.5.3.2 Electroforesis de la amplificación**

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en un gel de agarosa al 1.2% se hizo una mezcla de 4µL de producto de PCR con 4µL de buffer de carga, las muestras se corrieron en una cámara horizontal GIBCO BRL® y un buffer de corrida de Tris-sodio Acetato-EDTA (TAE) 1X. El tiempo promedio de corrida fue de una hora a 90 Volts. Pasado el tiempo de corrida, el gel de agarosa se colocó en una solución de bromuro de etidio (0.5 µg/mL) durante 10 min, después se enjuagó en agua destilada por 10 min (en recipientes). En seguida se documentó usando un fotodocumentador modelo Universal Hood II, BIORAD®. Se utilizó un marcador molecular con un peso de 1kb marca GeneRuler™ para la estimación posterior de pesos moleculares de los productos de PCR.

### **5.5.3.3 RFLP-ITS**

Las enzimas de restricción seleccionadas fueron aquellas que reconocieron secuencias de cuatro pares de bases, esto para incrementar la probabilidad de corte en el fragmento amplificado ITS. Para caracterizar los fragmentos de ITS de los hongos obtenidos con el par de iniciadores 5HP-NL4, Ramírez (2013), propone utilizar para la digestión las

siguientes enzimas: Hinf I (Fermentas®), HhaI (Fermentas®) y HaeIII (Promega®). Las condiciones de restricción fueron de acuerdo a las fichas técnicas proporcionadas por el fabricante. En todos los casos se utilizaron 5 unidades de enzima en un volumen final de 20  $\mu$ L.

#### **5.5.3.4 Gel de acrilamida 6%**

Para la separación de los fragmentos amplificados, se utilizó una cámara vertical C.B.S. Scientific CO® modelo MVG-216-33 con una fuente de poder E-C Apparatus Vorporations®, Modelo EC-105. Los cristales de la cámara se limpiaron con etanol 70% y papel Kim Wipes®, y se ensamblaron en forma de sandwich. La preparación del gel de acrilamida fue bajo la campana de extracción de gases y guantes de nitrilo, a una concentración de 6% del gel. Para dos placas se colocaron 26 mL de Acrilamida Bis-acrilamida, 70 mL de agua destilada, 24 mL de buffer TBE 5X (), 840  $\mu$ L de persulfato de amonio (APS) al 10% y 75  $\mu$ L de N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) en un aplicador de 100 mL para vaciar la acrilamida en los cristales y se colocó un peine con 50 pozos, dejándolo polimerizar por completo. Una vez polimerizada la acrilamida se agregó el buffer de corrida TBE 1X y se cargaron con 5  $\mu$ L de las muestras (mezcladas previamente con 3  $\mu$ L buffer de carga) y se corrió a 245 voltios por aproximadamente 1.5 h. Se utilizaron 2  $\mu$ L del marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega) y 3  $\mu$ L de O'GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas).

Una vez pasado el tiempo de corrida se desarmaron las placas, se despegaron los geles y se revelaron con las siguientes soluciones en agitación constante: Solución fijadora (etanol 10%, ácido acético 1%) durante 10 min y se retiró. Posteriormente se agregó una solución

de tinción de plata (nitrato de plata 0.2%) durante 10 min y se retiró, lavando con agua destilada por 15 s con la ayuda de una piseta y por último se aplicó la solución reveladora (Hidróxido de sodio 3%) con formaldehído (100  $\mu$ L por cada 100 mL) hasta la visualización de las bandas. Las imágenes fueron documentadas empleando una cámara digital Samsung© de 12.1 mega pixeles.

#### 5.5.3.5 PCR-ISSR

Con la finalidad de corroborar el agrupamiento generado con los RFLPs, se generó un perfil de huellas de DNA mediante ISSR para comparar la similitud entre los hongos en estudio. El iniciador utilizado se indica en la Cuadro8.

#### Cuadro 8. Iniciador para PCR-ISSR.

Iniciador	Secuencia (5'-3')
(GGAT) <sub>4</sub>	GGAT-GGAT-GGAT-GGAT

La master mix realizada se muestra en el Cuadro 9. El termociclaje se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 95 °C por 4 min, 35 ciclos (95 °C por 1 min; 55 °C por 1 min; 72 °C por 2 min), y un ciclo de extensión final de 72 °C por 10 min- 4 °C $\infty$ .

Los productos amplificados se visualizaron en geles de acrilamida 6% como se describió para el caso de los RFLPs.



**Cuadro 9. Reacción para PCR-ISSR a un volumen de reacción 25 a  $\mu$ L**

Reactivos	Concentración Stock	Volumen/ Tubo	Concentración Final
Buffer	5 X	5 $\mu$ L	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2.5 $\mu$ L	2.5 mM
dNTP's	500 $\mu$ M	10 $\mu$ L	200 $\mu$ M
Iniciador	10 pM	2 $\mu$ L	20 pM
AGUA *	-----	-----	-----
Taq Polimerasa	5 U	0.3 $\mu$ L	1.5 U
DNA <sup>1</sup>	-----	-----	$\pm$ 100 ng

\*La cantidad de agua utilizada fue la necesaria para aforar a un volumen de 50  $\mu$ L. \*La cantidad de DNA varió dada las concentraciones obtenidas del proceso de extracción.

### 5.5.3.6 Secuenciación

La secuenciación de DNA se llevó a cabo en las muestras que resultaron diferentes considerando los datos obtenidos de RFLP e ISSR. Se amplificaron las regiones ITS y del gen del factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$  (*EF1 $\alpha$* ) para las cepas con características morfológicas correspondientes a *Fusarium sp.*, para estas últimas se usaron los iniciadores que se observan en el Cuadro 10 (O'Donnell *et al.*, 1998), y se utilizó la mezcla de reacción mostrada en la Cuadro 11, con las mismas condiciones de termociclaje y revelado utilizados para la región ITS.

**Cuadro 10. Iniciadores para amplificar intrones del gen del factor elongación y de la traducción 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ).**

Gen amplificado	Iniciador	Secuencia del iniciador (5'-3')a
EF1 $\alpha$ -	EF1 EF2	ATGGGTAAGGARGACAAGAC GGARGTACCAGRSATCTCATG

a R=AG; S=CG

**Cuadro 11. Reacciones para amplificar intrones del gen del factor de elongación de la traducción 1 $\alpha$  (EF1 $\alpha$ ), se realizaron a un volumen de 50  $\mu$ L**

Reactivos	Concentración Stock	Volumen/ Tubo	Concentración Final
Buffer	5 X	10 $\mu$ L	1 X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	10 $\mu$ L	2.5 mM
dNTP's	500 $\mu$ M	10 $\mu$ L	200 $\mu$ M
Primer EF1	10 pM	1.5 $\mu$ L	15 pM
Primer EF2	10 pM	1.5 $\mu$ L	15 pM
AGUA*	-----	-----	-----
Taq Polimerasa	5 U	0.3 $\mu$ L	1.5 U
DNA <sup>1</sup>	-----	-----	$\pm$ 100 ng

\*El agua fue la requerida para aforar a un volumen de 50  $\mu$ L.

<sup>1</sup> La cantidad de DNA varió dada las concentraciones obtenidas del proceso de extracción.

Para el proceso de secuenciación, es necesario realizar la limpieza de las amplificaciones que consiste en degradar los nucleótidos e iniciadores remanentes de la PCR. Este proceso se llevó a cabo con la enzima SAP/EXO (Shrimp Alakaline Phosphatase y Exonuclease) de Promega®. La reacción de limpieza se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones utilizando 2  $\mu$ L de SAP 1U, 0.2  $\mu$ L de EXO I, 6.0  $\mu$ L de agua desionizada y 4  $\mu$ L de producto de PCR. La mezcla se incubó durante 1 h a 37 °C y posteriormente 15 min a 72 °C. Después se cuantificó la concentración de DNA.

#### **5.5.3.7 Reacción de secuenciación.**

Para la reacción de secuenciación se empleó el kit Terminator Ready Reaction V.3.1 (Applied Biosystems) con las siguientes especificaciones: RR mix 2  $\mu$ L 1x, iniciador forward/reverse 4  $\mu$ L a 10 pM, Buffer 5X 3  $\mu$ L, DNA-PCR necesario para tener una

concentración final de la reacción a 0.2 ng/ $\mu$ L y agua desionizada aforada a un volumen de reacción de 20  $\mu$ L.

Las condiciones de termociclaje fueron 35 ciclos de temperatura de desnaturalización 96 °C 10 s, alineamiento 50 °C durante 5 s y de extensión 60 °C durante 4 min.

Posteriormente se realizó la precipitación del DNA, se tomaron 20  $\mu$ L de la reacción de secuenciación, después se adicionaron 20  $\mu$ L de agua MiliQ y 60  $\mu$ L de etanol al 60% (frio) y se dio vortex, dejándolo reposar por 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Después se centrifugó la muestra por 20 min a 14 000 rpm. Se inclinó el tubo y se quitó completamente la mezcla del alcohol, con ayuda de una pipeta del lado contrario al pellet (cuidado de no llevárselo). Después se lavó con 250  $\mu$ L de etanol al 70% y se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y se retiró nuevamente el etanol. Se dejó secar la pastilla en el termoblock (90 °C por 1 min.) para quitar el exceso de etanol y se resuspendió en 18  $\mu$ L de formamida. Se tomaron 9  $\mu$ L de la reacción para correr la reacción en el Secuenciador 3130X Applied Biosystems®.

#### **5.5.4 Análisis de datos**

**5.5.4.1 Análisis PCR-RFLPs.** Este se realizó una vez obtenido el perfil electroforético. Como primer paso se estimó el tamaño de los fragmentos a obtener utilizando como referencia los marcadores de DNA de peso molecular estándar y la digestión virtual realizada en el programa BioEdit. Con la información de los fragmentos en los geles, se construyó una matriz binaria de 0 y 1. El 0 fue asignado cuando una banda estuvo ausente y el 1 fue asignado cuando una banda estuvo presente. El coeficiente de similaridad de Nei y

Li/Dice (Nei y Li, 1979) entre las cepas de hongos fue determinado por el análisis de clusters, mediante el método de agrupamiento UPGMA (Unweighed pair Group Method with Arithmetic Mean) en el paquete para análisis de datos genéticos FreeTree©, considerando el método de remuestreo bootstrapping con 1000 repeticiones. El dendograma fue visualizado en el programa TreeViewX©.

#### **5.5.4.2 Análisis PCR-ISSR.**

El análisis de los perfiles obtenidos se realizó construyendo una matriz binaria (0 y 1) al igual que en RFLPs. Se utilizó el coeficiente de similaridad de Nei y Li/Dice, el método de agrupamiento UPGMA con 1000 repeticiones, en el paquete para análisis de datos genéticos FreeTree© y TreeViewX©. Para el caso de ISSR se consideraron los fragmentos que se encontraban entre los 300 y 1500 pb.

#### **5.5.4.3 Análisis de secuencias**

Una vez obtenidas las secuencias de los genes empleados para cada microorganismo, se editaron empleando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor© para alinearlas. Posteriormente se realizó una comparación con las secuencias reportadas en el GenBank mediante el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

#### **5.5.4.4 Elaboración de árboles filogenéticos**

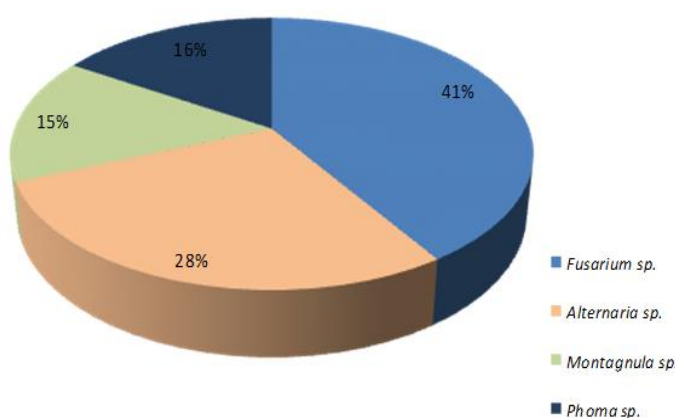
Los arboles filogenéticos se construyeron con el método estadístico de Máxima Parsimonia (MP) con 1000 repeticiones Bootstrap usando el software Mega 6.05. Se incluyeron cuatro secuencias tomadas del GenBank, correspondiendo a *Fusarium oxysporum*, *Fusarium*

*subglutinans*, *Alternaria alternata*, *Phoma sp.*, *Montagnula opulenta* y un organismo “out group” (mismo género que los organismos analizados).

## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Aislamientos y purificación de hongos asociados a cladodios de nopal con y sin síntomas de engrosamiento.

Como resultado de la recolecta de cladodios de nopal con síntomas típicos de engrosamiento se obtuvieron 93 aislados. Dichos aislados mostraron diferentes características morfológicas macroscópicas y microscópicas, lo cual permitió clasificarlos en cuatro grandes grupos, correspondiendo cada grupo a un género (Figura 3).



**Figura 3. Proporción de hongos encontrados en cladodios de nopal con síntomas de engrosamiento en los municipios de San Martín de las Pirámides, San Juan Teotihuacán, Nopaltepec y Axapusco, Estado de México, en enero del año 2014.**

En base a la proporción de aislamiento de hongos encontrados se observó que hay una mayor incidencia de organismos pertenecientes al género *Fusarium sp.* el cual fue encontrado en todas las áreas muestreadas (municipios de San Martín de las Pirámides, San Juan Teotihuacán, Nopaltepec y Axapusco, Estado de México), al igual que *Alternaria sp.*

y hongos del género *Phoma* sp. En el caso de *Montagnula* sp. no se encontró en San Martín de las Pirámides.

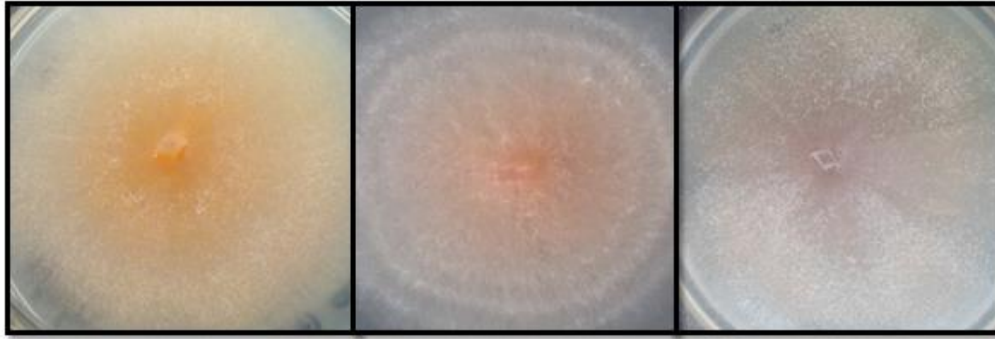
De las 11 siembras realizadas de cladodios de nopal sin síntomas de engrosamiento, se obtuvieron dos aislamientos de *Fusarium* sp., uno de *Phoma* sp. y otro de *Alternaria* sp. en todos los municipios muestreados a excepción de Nopaltepec.

## **6.2 Caracterización fenotípica**

Se observaron diferentes colores de micelio y tipos de crecimiento de las colonias, así como las esporas producidas que permitieron la diferenciación entre géneros.

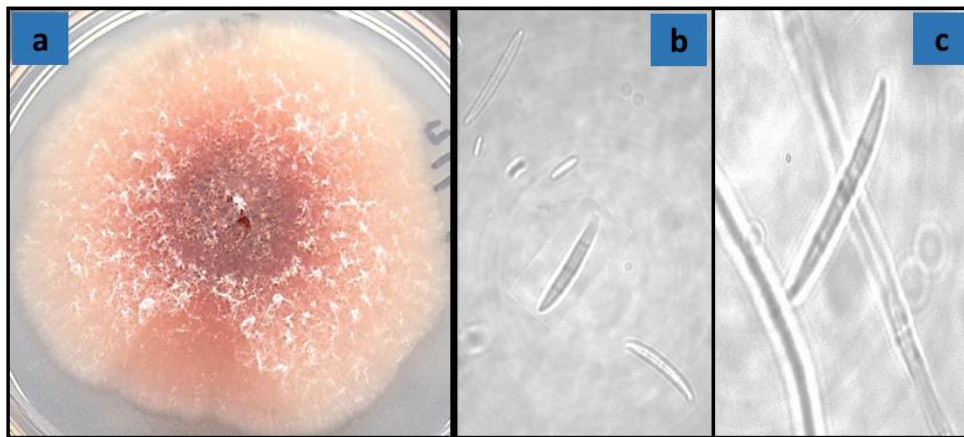
De acuerdo a Barnett y Hunter (1972) el género *Fusarium* se distingue por presentar micelio algodonoso abundante, de coloración rosa, púrpura o amarillo; conidióforos variables; macroconidios con varias celdas, ligeramente curvado o doblado en los extremos puntiagudos, típicamente en forma de canoa y microconidios unicelulares, lo cual coincidió con los aislamientos obtenidos.

*Fusarium subglutinans*. De acuerdo con Leslie y Summerell (2006) se observó que en medio de cultivo PDA el crecimiento del micelio es abundante, inicialmente blanco que se torna en morado conforme va creciendo, la pigmentación oscila desde lo incoloro a un color púrpura oscuro que es casi negro, aunque también se obtuvieron coloraciones amarillentas (Figura 4).



**Figura 4.** Coloraciones del micelio de *F. subglutinans* en medio de cultivo PDA.

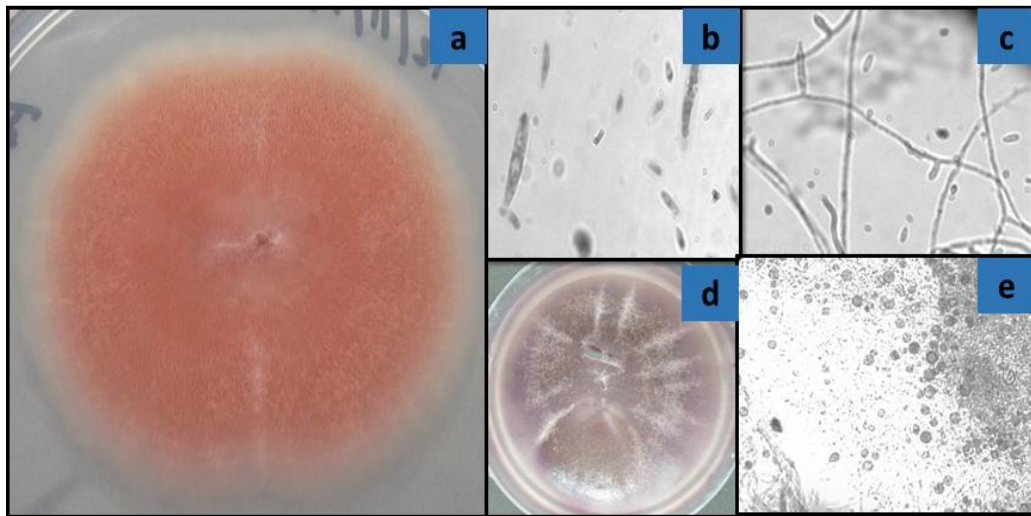
Las estructuras que se observaron para su identificación fueron tomadas de crecimientos en medio de clavel, los cuales fueron microconidios elipsoidales a fusiforme, producidos en cabezas secas de polifialides en el micelio aéreo (Figura 5). Esta especie de *Fusarium* no forma clamidosporas coincidiendo con lo descrito por Seifert (1996).



**Figura 5.** *F. subglutinans*. a) Crecimiento en PDA, b) Microconidios unicelulares hialinos y macroconidios fusiformes, c) Macroconidio con cuatro septas. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. Imagen de la autora.

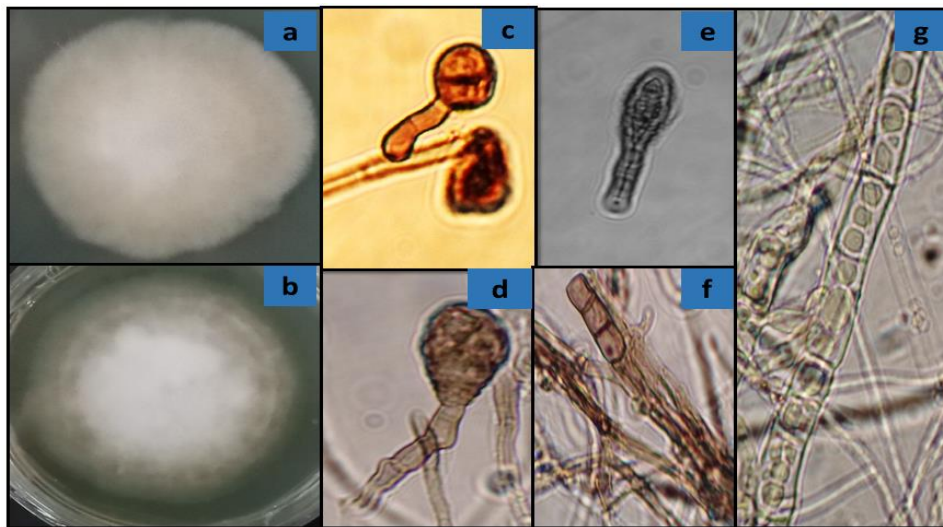


*Fusarium oxysporum*. La colonia en PDA exhibió pigmentación de color rosa y micelio algodonoso. Microconidios hialinos, elipsoides, no en cadenas, formados en macro fialides en cabezas falsas en fialides laterales, simples y cortos. Macroconidios hialinos, de tres a cinco septas con forma de luna, células apicales ligeramente agudas y célula basal en forma de pie; clamidosporas intercalares (Figura 6). Estas características coincidieron con las descritas por Booth (1971), Nelson *et al.* (1983) y Burgess *et al.* (1994).



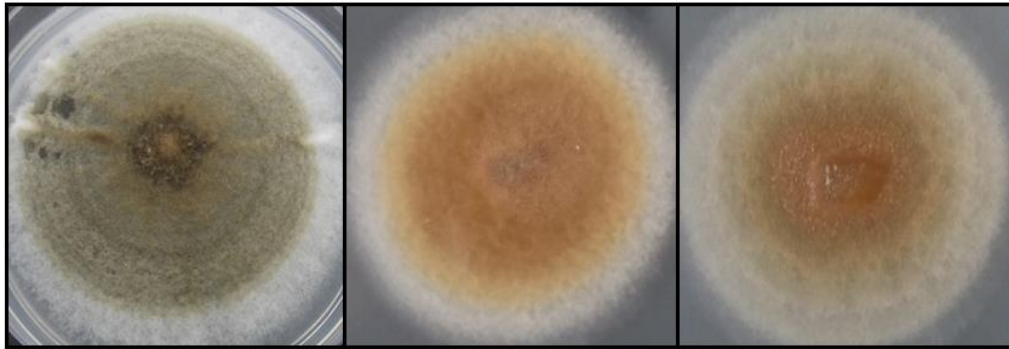
**Figura 6. *F. oxysporum* a) Coloración de colonias de 10 días en medio PDA, b) Macroconidios, c) Fialides y microconidios, d) Coloración de colonias de 30 días en medio PDA e) Clamidosporas. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 40X y 10X (e), tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. Imágenes de la autora.**

*Alternaria alternata*. Coincidiendo con Simmons (2007) este hongo produce abundante micelio ramificado con septas de color marron dorado. Barnett y Hunter (1972), Watanabe, (2002) y Taralova *et al.* (2008) mencionan que se presentan conidióforos pálido marrón, simples o ramificados, relativamente cortos, teniendo conidios concatenados en las partes fértiles apicales. De 5 a 15 conidios en cadena. Los conidios se desarrollan acropetalmente de color (oscuro) marrón, cilíndrico o en forma de huso, con picos cilíndricos menudo, muriforme, se compone de 3-4 (8) y paredes transversales 1-2 paredes longitudinales, lo cual coincidió con lo observado en las cepas obtenidas (Figura 7). Mencionan tambien que su morfología y tamaño son variables en diversos aislamientos estudiados pertenecientes a este mismo hongo.



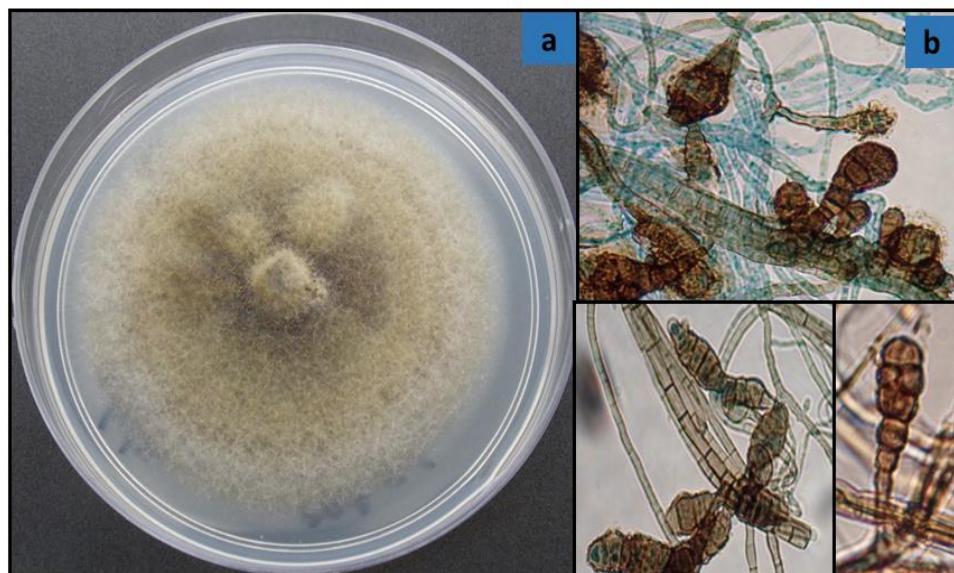
**Figura 7. *A. alternata*. a) y b) Crecimiento de la colonia en medio PDA, c), d) y e) Conidióforos simples con conidios apicales, f) y g) micelio septado. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. Imágenes de la autora.**

*Phoma sp.* El aspecto de la colonia es algodonoso, de coloraciones que varían en sus tonalidades de color olivo, gris, amarillo y marrón dependiendo de la edad y condiciones del cultivo (Figura 8), esto conforme a lo descrito por Aveskamp *et al.* (2009) y Chande (2010).



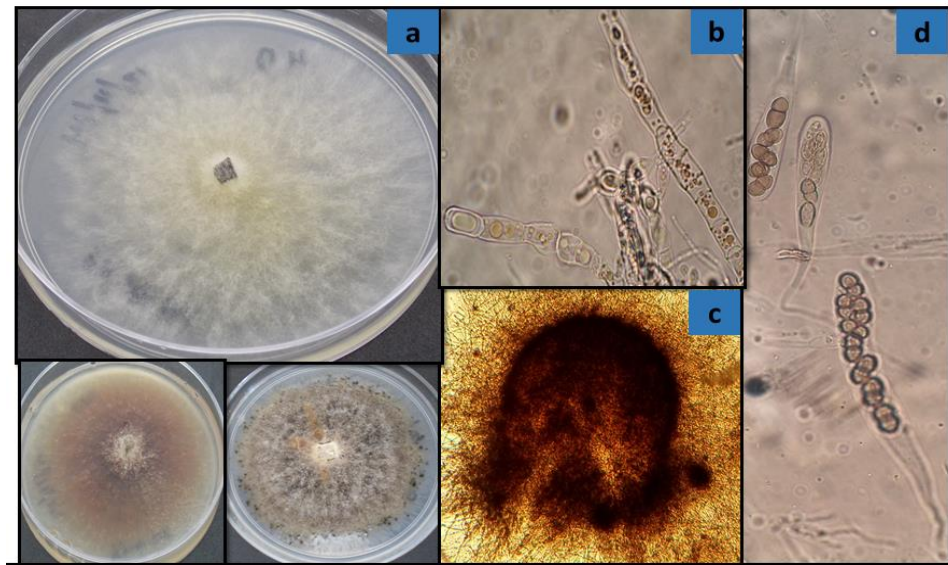
**Figura 8. Coloraciones y crecimiento de colonias de *Phoma sp.* en medio PDA.**

El género presenta picnidios globosos, subglobosos, en forma de disco, ostiolo visible: peridio marrón oscuro, pseudoparenquimatoso. Los conidios hialinos, elipsoidales, unicelular. Las clamidosporas solitarias, de color marrón oscuro, granulado y de paredes gruesas. *P. glomerata* presenta clamidosporas marrón oscuro, subglobosos, muriforme con septas transversales y longitudinales en lugar de septas irregulares, éstas se asemejan a los conidios del género *Alternaria*. En tanto que *P. medicaginis* las clamidosporas son de color marrón, globosas y en cadena, mismas que se observan en la figura 9, correspondiendo a lo descrito por Watanabe (2002) y Webster *et al.* (2007).



**Figura 9. *Phoma* sp. a) Colonia en PDA, b) Clamidosporas solitarias y en cadena. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 40X y tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. Imágenes de la autora.**

***Montagnula* sp.** Crous y Johannes (2012) describen para *M. aloe* colonias discontinuas, con micelio aéreo moderado; en PDA el crecimiento es lento, llegando a sólo 25 mm de diámetro después de 3 semanas, con micelio aéreo escaso y los márgenes de plumas, coloración canela, canela con manchas, y rosas, coincidiendo con las colonias como se observa en la figura 10.



**Figura 10. *M. opulenta* a) Colonias en medio PDA, b) Micelio desarrollado, c) Pseudotecio, d) Ascas octosporicas y ascosporas. Microestructuras observadas en ácido láctico por microscopía de luz con amplificación de 10X (pseudotecio) y 40X. Tomados con una cámara Samsung HD de 16 mega pixeles 5X. Imágenes de la autora.**

Forma pseudotecios gregarios; al madurar el ostíolo es errumpente; el pseudotecio es globoso o piriforme, de color negro. Ascas cilíndrico-claviformes, octosporicos, con un pie largo. Pseudoparáfisis filiformes, abundantes, septadas, hialinas y en apariencia. Ascósporas anchamente elipsoidales u ovoides, con un septo transversal central, constrictas, asimétricas, con la mitad anterior globosa, redondeada y más ancha que la

posterior; de color pardo pálido, se oscurecen al madurar; episporio ornamentado con diminutas verrugas, lo que se observó según Aptroop (1995), López (2000), Crous y. Johannes (2012).

### 6.3 Caracterización molecular

#### 6.3.1 Extracción de DNA

La cantidad de DNA resultante de los aislamientos procesados fue de 10.45 a 218 ng/ $\mu$ L con una calidad de 1.3 a 1.95 (Abs. 260/280), esto fue obtenido con el protocolo I CTAB con modificaciones, tomado de Weising *et al.* (2005).

#### 6.3.2 Amplificación de fragmentos ITS

La amplificación de la región ITS mostró fragmentos entre 1000 y 1300 pb aproximadamente (Figura 11).

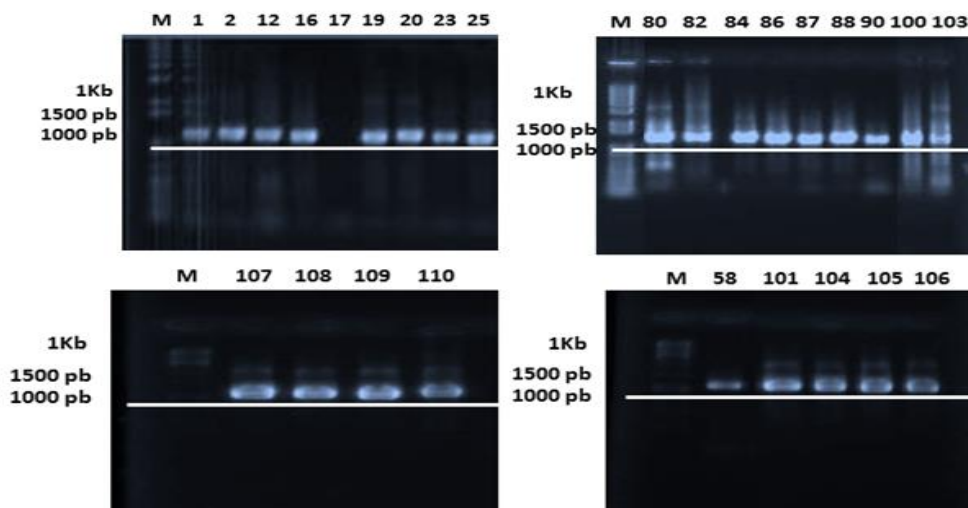
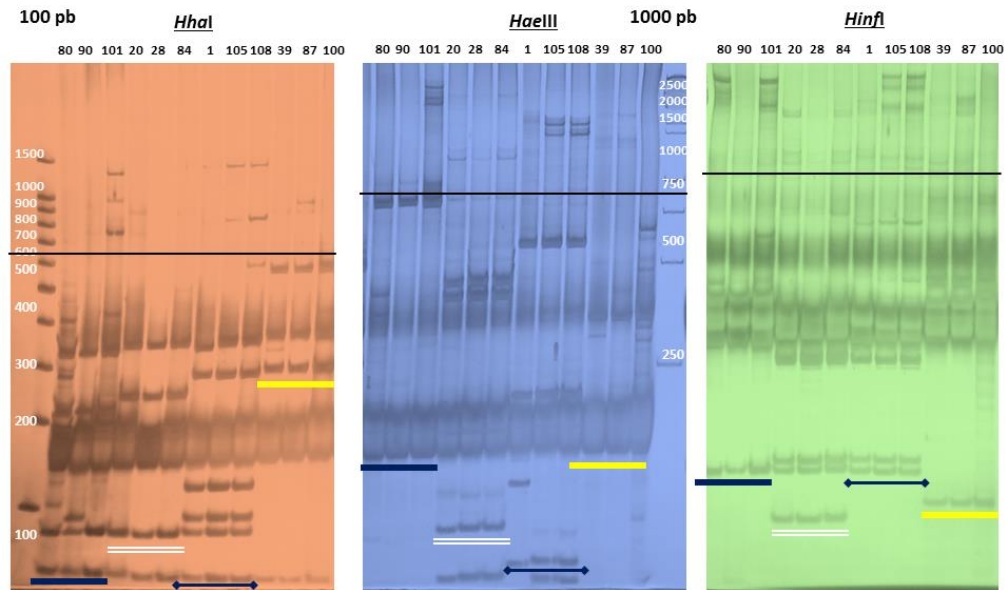


Figura 11. Gel de agarosa al 1.2% revelando fragmentos de 1000 a 1300 pares de bases (pb) aproximadamente del producto de PCR de la región ITS amplificado del DNA de hongos con los iniciadores NL4 y 5HP.

Se observó una ligera oscilación entre el peso molecular de los fragmentos obtenidos, de tal forma que algunos están más cercanos a los 1000 pb correspondiendo al género *Fusarium* según sus características morfológicas (muestra 87, 100 y 106) y coincidiendo con lo encontrado por Ramírez (2013), mientras que las muestras de los géneros *Phoma*, *Alternaria* y *Montagnula* tuvieron un peso molecular promedio de 1300 pb (80, 84 y 101). Lo cual nos sugiere la existencia de polimorfismos entre los organismos amplificados, esto según Pallas *et al.* (2007), al señalar que un fragmento de DNA representa variación genética debido a las diferencias entre individuos en la longitud.

### **6.3.3 RFLP-ITS**

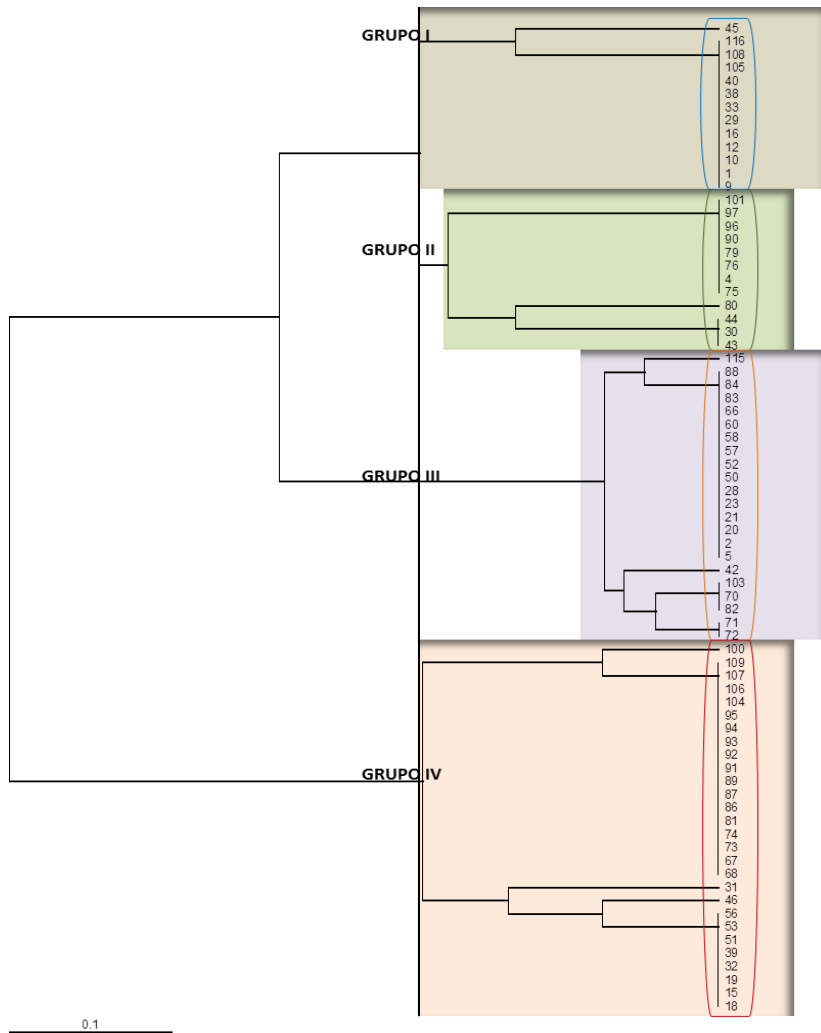
Los patrones de restricción generados a partir de la región ITS, presentaron polimorfismos al cortarse con las enzimas *Hinf*I (Fermentas®), *Hha*I (Fermentas®) y *Hae*III (Promega®) (Figura 12).



**Figura 12. Perfiles de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción.**

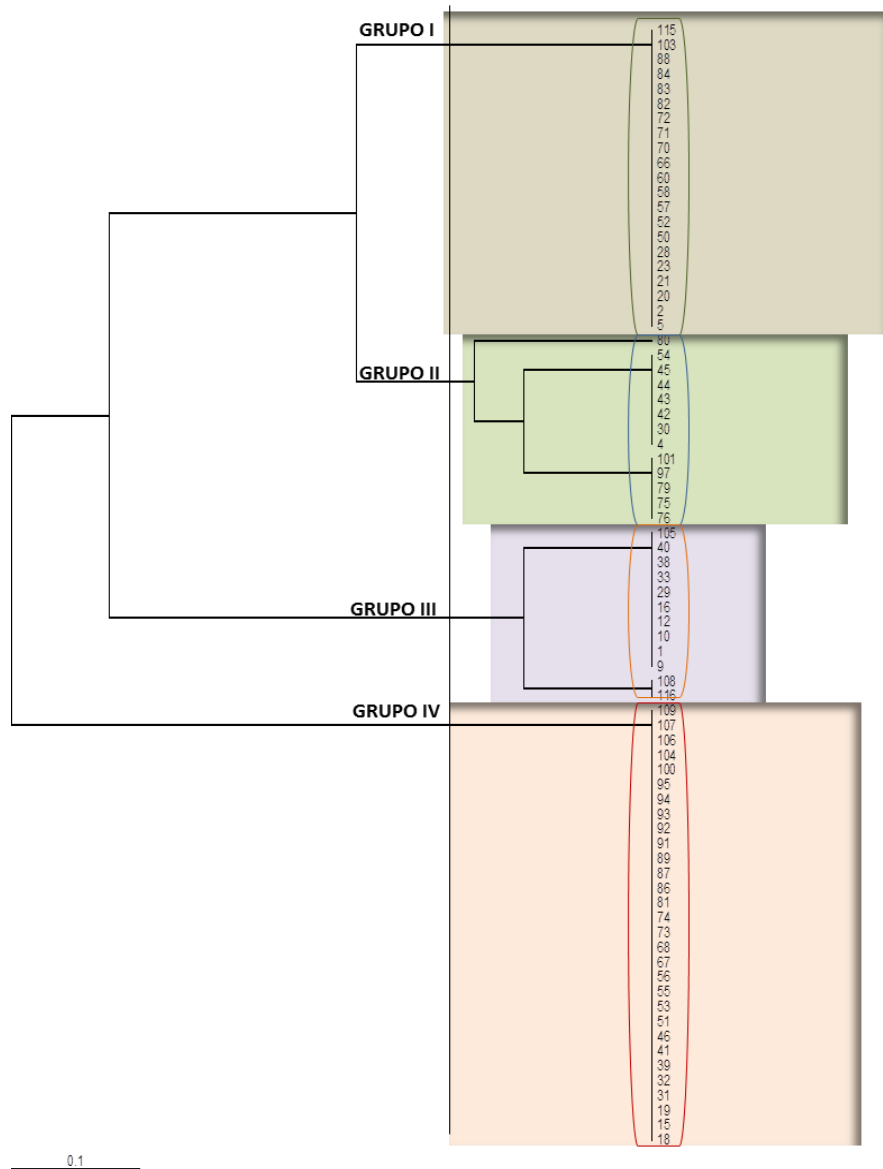
El análisis del patrón polimórfico generado por la enzima *HinfI* formó cuatro grandes grupos, correspondiendo en orden descendente del dendograma: grupo I (*Montagnula* sp.), grupo II (*Phoma* sp.), grupo III (*Alternaria* sp.) y grupo IV (*Fusarium* sp.) (ver figura 13), esto coincidió con la morfología descrita con anterioridad. Esta enzima produjo variabilidad no solo entre géneros, sino que también dentro de cada grupo, especialmente en los géneros *Fusarium* y *Phoma*.





**Figura 13. Dendrograma generado por amplificación ITS y digerido con la enzima de restricción *Hinf*I. Grupo I: *Montagnula* sp., grupo II: *Phoma* sp., grupo III: *Alternaria* sp. y grupo IV: *Fusarium* sp.**

El análisis de digestión con la enzima *Hha*I coincidió con la anterior al formar cuatro grupos de acuerdo a los géneros descritos morfológicamente (Figura 14).



**Figura 14. Dendrograma generado por amplificación ITS y digerido con la enzima de restricción *HhaI*. Grupo I (*Alternaria sp.*), grupo II (*Phoma sp.*), grupo III (*Montagnula sp.*) y grupo IV (*Fusarium sp.*).**

Es importante resaltar que para *Alternaria* y *Fusarium* no se distinguió variabilidad dentro de los grupos formados. No así para *Phoma* y *Montagnula*, para las cuales si hizo una separación interna, formando dos subgrupos para estos.

La digestión con la enzima *Hae*III separó evidentemente por géneros a la población muestreada (figura 15).

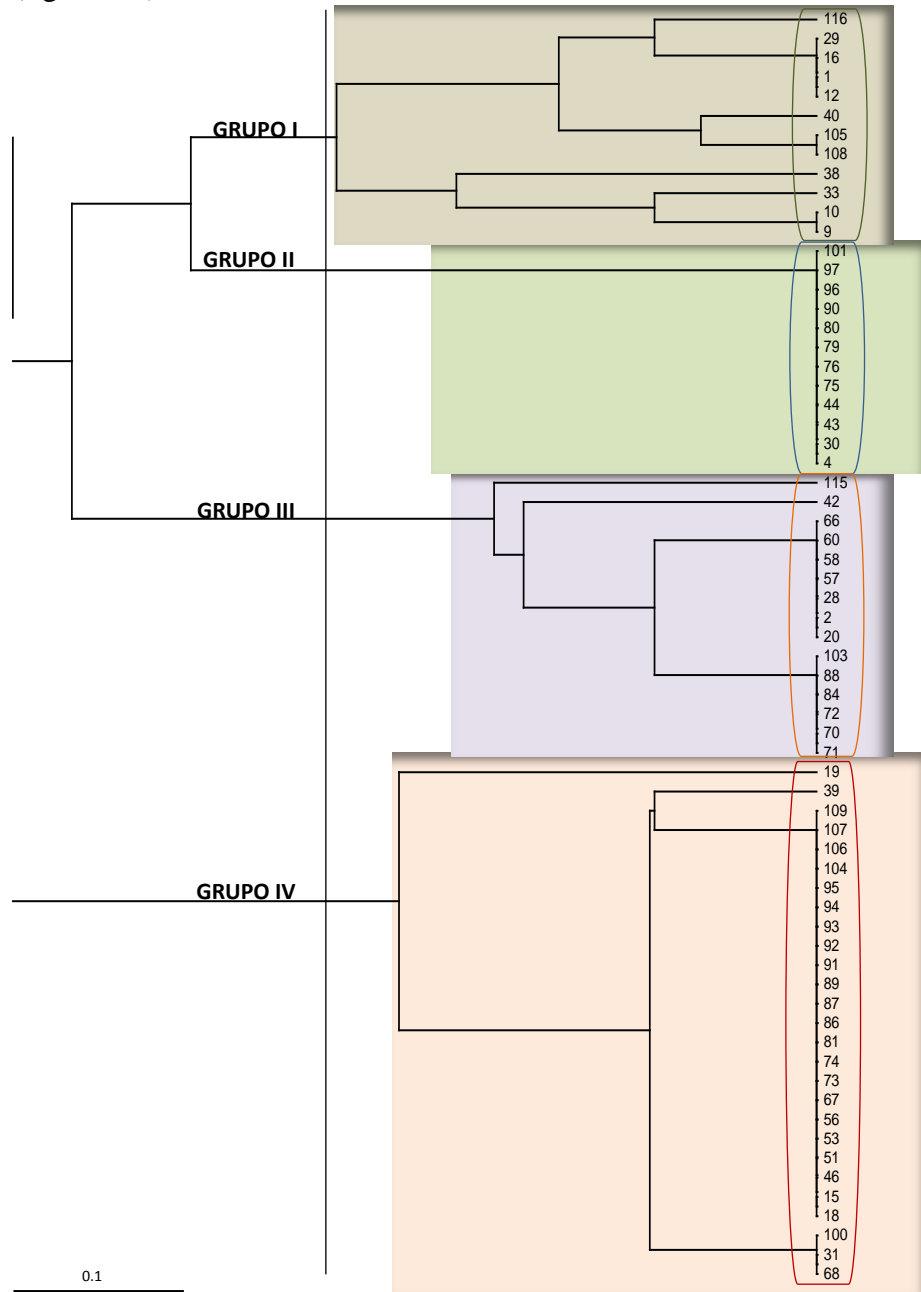


Figura 15. Dendrograma generado por amplificación ITS y digerido con la enzima de restricción *Hae*III. Grupo I (*Montagnula* sp.), grupo II (*Phoma* sp.), grupo III (*Alternaria* sp.) y grupo IV (*Fusarium* sp.).

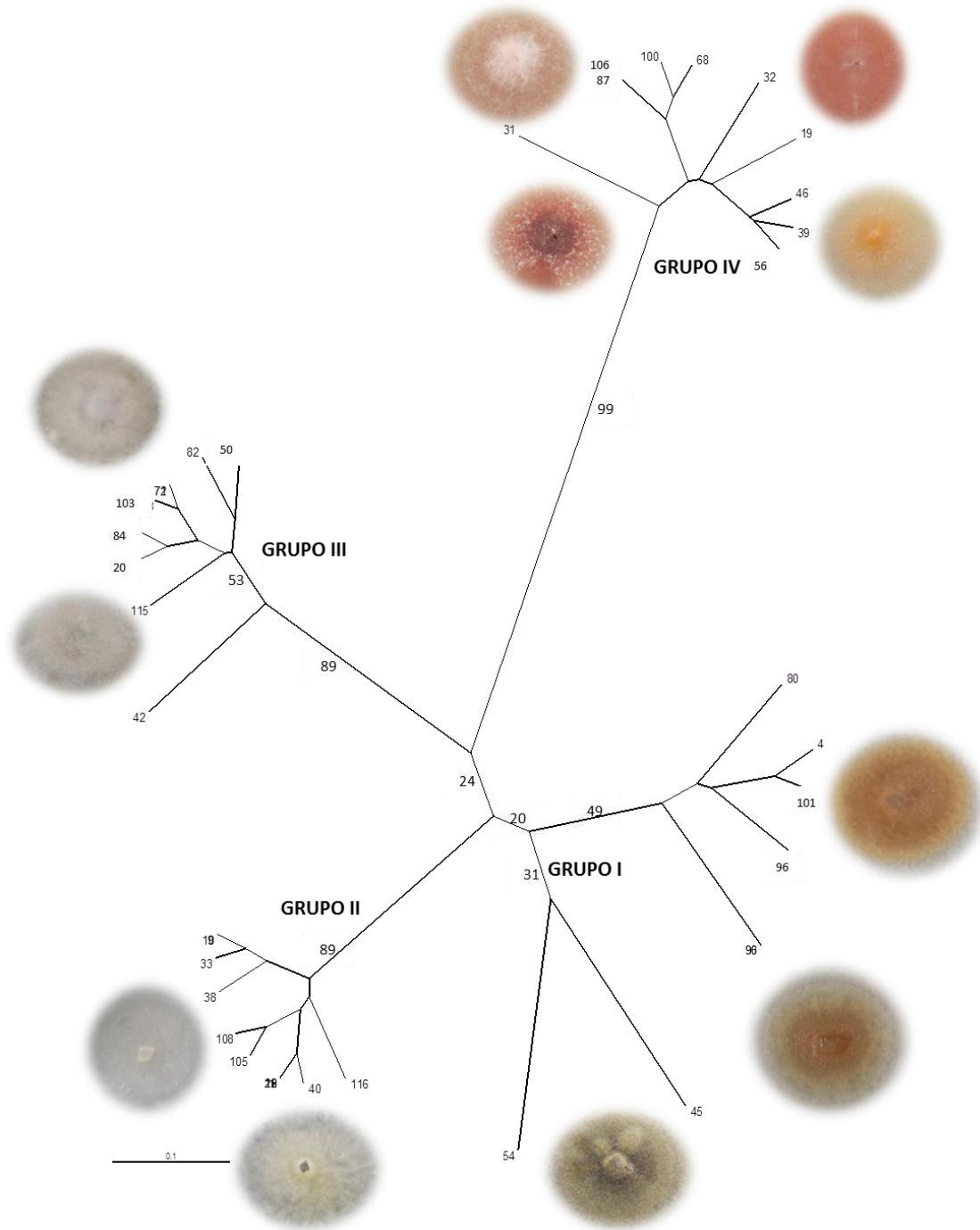
Además se observó una alta variabilidad interna en los géneros *Montagnula*, *Alternaria* y *Fusarium*, lo que no se observa en *Phoma*.

Al agrupar los fragmentos de restricción generados por las enzimas *HinfI*, *HhaI* y *HaeIII*, nuevamente formaron cuatro grandes grupos coincidiendo en los cuatro géneros descritos, los cuales presentan una gran variabilidad intraespecífica (Figura 16).

La región ITS del DNA nuclear ribosomal a menudo es insuficiente para la identificación del género *Fusarium* (O'Donnell y Cigelnik, 1997), por lo que la diferenciación intraespecífica de este género no es muy clara con el uso de las enzimas de restricción, pero si lo fue con respecto a la diferenciación con los otros géneros.

*Alternaria sp.* es una de las especies más cosmopolitas y son generalmente saprófitos (Rotem, 1994), por lo tanto, los patógenos de esta especie han sido definidos como patotipos de *A. alternata* (Tsuge *et al.*, 2013).

Técnicas modernas basadas en el DNA pueden contribuir en gran medida a la identificación y taxonomía de las especies fúngicas. Sin embargo, el número de estudios que utilizan enfoques moleculares para definir nuevas especies en *Phoma* y resolver complejos de especies dentro de este género son relativamente pocos (Torres *et al.*, 2006).



**Figura 16.** Dendrograma generado por amplificación ITS y digerido con las enzimas de restricción *Hinf*I, *Hha*I y *Hae*III. Grupo I (*Phoma* sp.), grupo II (*Montagnula* sp.), grupo III (*Alternaria* sp.) y grupo IV (*Fusarium* sp.).

Se han generado secuencias de DNA a partir de las regiones ITS,  $\beta$ -tubulina y Actina para aclarar la filogenia de *Phoma*, ya que muchas de las especies de este género como *Phoma sancta* se ha clasificado en diferentes grupos, principalmente por poseer una alta recombinación sexual (Aveskamp *et al.*, 2008).

Ariyawansa *et al.* (2014) mencionan que con nuevos datos morfológicos y moleculares con base en el análisis de las regiones ITS, LSU, SSU y  $\beta$ -tubulina, el género *Montagnula* pertenece a la familia *Didymosphaeriaceae* (*Montagnulaceae*). Lo que ha permitido reclasificar taxonómicamente a *M. opulenta* la cual antiguamente se realizaba por caracteres morfológicos (ascas), sin embargo con el análisis multigen de su filogenia se ha reconsiderado su taxonomía (Schoch *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009, 2012).

#### **6.3.4 PCR-ISSR**

En la Figura 17, se muestran los perfiles de las huellas del genoma obtenidos con el iniciador ISSR (GGAT)<sub>4</sub>, usado para caracterizar a los aislamientos de hongo. Este iniciador amplificó entre 5 y 14 fragmentos de DNA en la mayoría de los aislamientos. Los perfiles de las huellas de DNA nos muestran 3 grupos, en los cuales se separó muy claramente al género *Fusarium* (Grupo 1), sin embargo, al formar los otros grupos no pudo separarlos claramente, ya que en estos encontramos una mezcla en *Alternaria*, *Phoma* y *Montagnula*, lo cual se puede explicar por la coincidencia en el tamaño del genoma, no así con la información contenida en ella, lo cual se demuestra en la secuenciación. Es importante mencionar toda la variabilidad generada con los ISSR, lo cual nos permite ver la

variabilidad intraespecífica, sin embargo no es contundente, por lo que se requiere comparar con la amplificación de otros iniciadores.

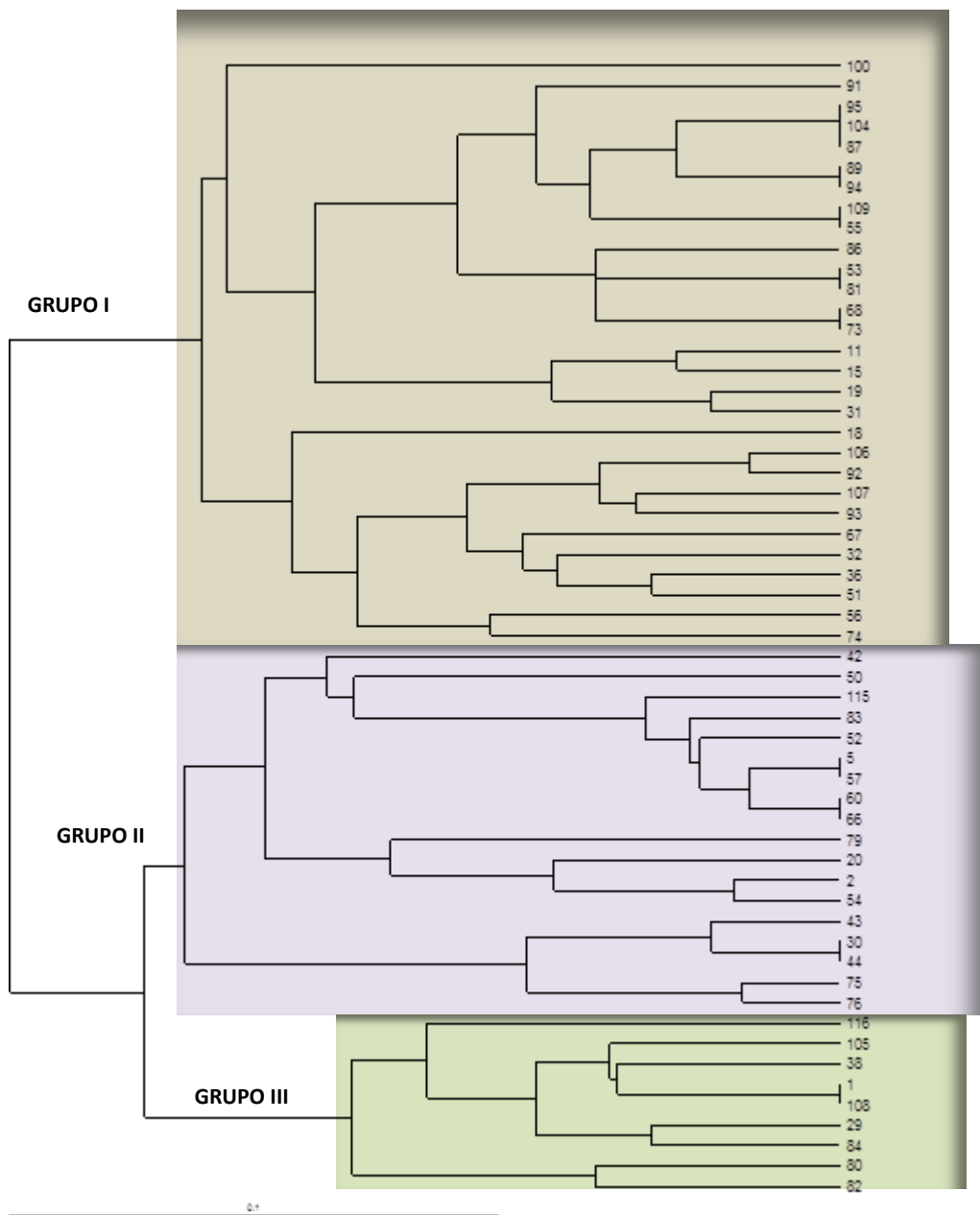
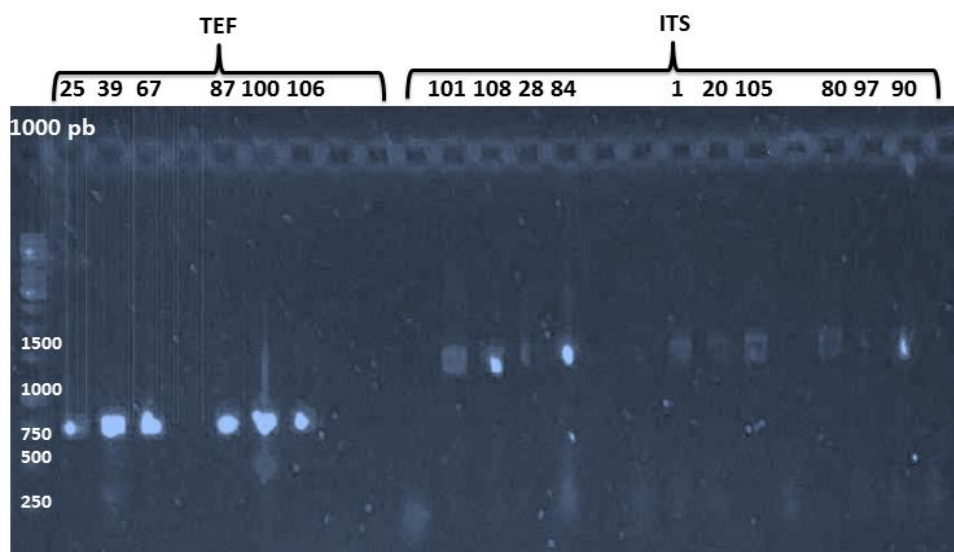


Figura 17. Dendrograma generado por PCR-ISSR con el iniciador (GGAT) 4. Grupo I (*Fusarium sp.*), grupo II (*Alternaria sp.*) y grupo III (*Montagnula sp.*).

### 6.3.5 Secuenciación

A partir de la separación que se realizó mediante el análisis RFLPs se seleccionaron tres muestras para *Fusarium* (87, 100 y 106), dos para *Alternaria* (20 y 84), dos para *Phoma* (80 y 101) y dos para *Montagnula* (105 y 108). Se amplificó la región TEF para el caso del *Fusarium*, esto sugerido por O'Donnell *et al.* (1998), obteniéndose fragmentos de un promedio de 750 pb, coincidiendo con lo reportado por Geiser *et al.* (2004), y la región ITS para *Alternaria*, *Phoma* y *Montagnula*, los cuales presentaron un promedio de 1300 pb (Figura 18).



**Figura 18. Gel de agarosa al 1.2% de productos amplificados de la región TEF e ITS.**

### 6.3.6 Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias de los genes se alinearon y compararon con especímenes reportados en el GenBank (Cuadro 12).



**Cuadro 12. Identificación de secuencias**

No. De muestra	Identificación	Especie de referencia * (Acceso NCBI)	Pares de bases (pb)	Porcentaje de similaridad (%)
20	<i>Alternaria alternata</i>	KJ082099	490	100
80	<i>Phoma sp.</i>	KF367550	503	100
84	<i>Alternaria alternata</i>	KJ082099	497	100
87	<i>Fusarium subglutinans</i>	FJ966229	588	100
100	<i>Fusarium oxysporum</i>	KC808225	500	100
101	<i>Phoma sp.</i>	KF367550	529	100
105	<i>Montagnula opulenta</i>	AF383966	520	100
106	<i>Fusarium subglutinans</i>	DQ837698	710	99
108	<i>Montagnula opulenta</i>	AF383966	429	100

\*Secuencias con las que fueron comparadas en el GenBank (NCBI).

*Fusarium subglutinans*. Sinónimos: *Fusarium* var *sacchari*. *Subglutinans*, *Fujikuroi* *Gibberella*. Fase Sexual: *Gibberella subglutinans* (Nelson *et al.*, 1981). Es un patógeno común de maíz domesticado (*Zea mays* sp. *mays*) y teocintle silvestre estrechamente relacionados (*Zea* sp.), en México y América Central (Desjardins *et al.*, 2000). Steenkamp *et al.* (2000) lo reporta para la malformación en mango. Hasan (2002) y además Kumar *et al.* (1993) y Mora (2000) mencionan que tanto *Fusarium oxysporum* y *Fusarium subglutinans* (*Gibberella moniliformis*) producen sustancias reguladoras de crecimiento (AIA, AG3), toxinas y enzimas. Ramírez (2013) aisló *F. subglutinans* de cladodios de nopal con y sin síntomas de engrosamiento.

*Fusarium oxysporum*. Es descrito como un complejo de especies (Michielse, 2009). Tiene una distribución en todo el mundo y es responsable de la marchitez vascular severa o

podrición de la raíz en una amplia gama de familias de planta está omnipresente en ambos suelos agrícolas y no agrícolas, y se encuentra generalmente en estrecha asociación con las raíces de las plantas. Las cepas se clasifican en más de 150 formas especiales (f. sp) en función de su hospedero (Lievens y Thomma, 2008; Enya *et al.*, 2008).

***Alternaria alternata***. Invade una gran variedad de plantas hospederas agronómicamente importantes tales como tabaco, cereales, plantas ornamentales, cultivos oleaginosos, verduras, algunos árboles frutales, fresa y algodón, causa la mancha marrón en el tabaco (Simmons, 1999). Se ha reportado como patogénico por primera vez mancha marrón en mandarina emperador en Australia en 1903 (Cobb, 1903), cítricos en China (Akimitsu *et al.*, 2003), en la mancha foliar de *Aloe vera*, en la india, (Kamalakaran *et al.*, 2008), del punto negro de persimonia en la provincia Cyeongnam, Corea en 2012 (Lee *et al.*, 2013). Flores (2012) y Ramírez (2013) lo reportaron para la mancha negra en cladodios de nopal y en cladodios con engrosamiento.

***Phoma* sp.** Es el anamorfo de múltiples *Pleosporales*, incluyendo *Didymella*, *Leptosphaeria* y *Pleospora* (Aveskamp *et al.*, 2008). *Phoma* es un género taxonómicamente difícil y no se entiende completamente. Es una forma única de picnidiales, que se encuentra en una amplia variedad de hospederos en particular de planta y el suelo (Rai y Rajak, 1983).

Además de varias especies saprófitas, *Phoma* también ha demostrado ser un importante género de hongos patógenos de plantas que se producen en cultivos de importancia económica. Varias especies de *Phoma* son también de importancia cuarentenaria, presenta graves problemas a las organizaciones que están involucrados en la regulación cuarentena fitosanitaria cuarentenaria (Aveskamp, 2008). Estos organismos de cuarentena incluyen, *P. andigena* y *P. tracheiphila* en las regiones europeas y mediterráneas (Smith *et al.*, 1992), *P. foveata* (también conocido como *P. exigua* var. *foveata*) en el sur de América (Mendes *et al.*, 2006), y *P. macdonaldii* en Australia (Miric *et al.*, 1999). En la zona del mediterráneo y Mar negro el principal hospedero es el limón (*Citrus limon*), Pero también el hongo ha sido reportado en muchos otros *Citrus* sp. (EPPO / CABI, 1997).

*Phoma* como patógeno se ha reportado en los tallos de las plantas (Saccardo, 1882), pero hoy en día el género comprende patógenos oportunistas. Aveskamp *et al.* (2009) identificó a *P. sancta* en cladodio de *Opuntia ficus-indica* en Argentina.

***Montagnula opulenta***. Sinónimos: *Didymosphaerella opulenta* (De Not.) *Sphaeria opulenta* De Not., Atti Accad. *Didymosphaeria opulenta* (De Not.) Sacc., (Barr, 2001).

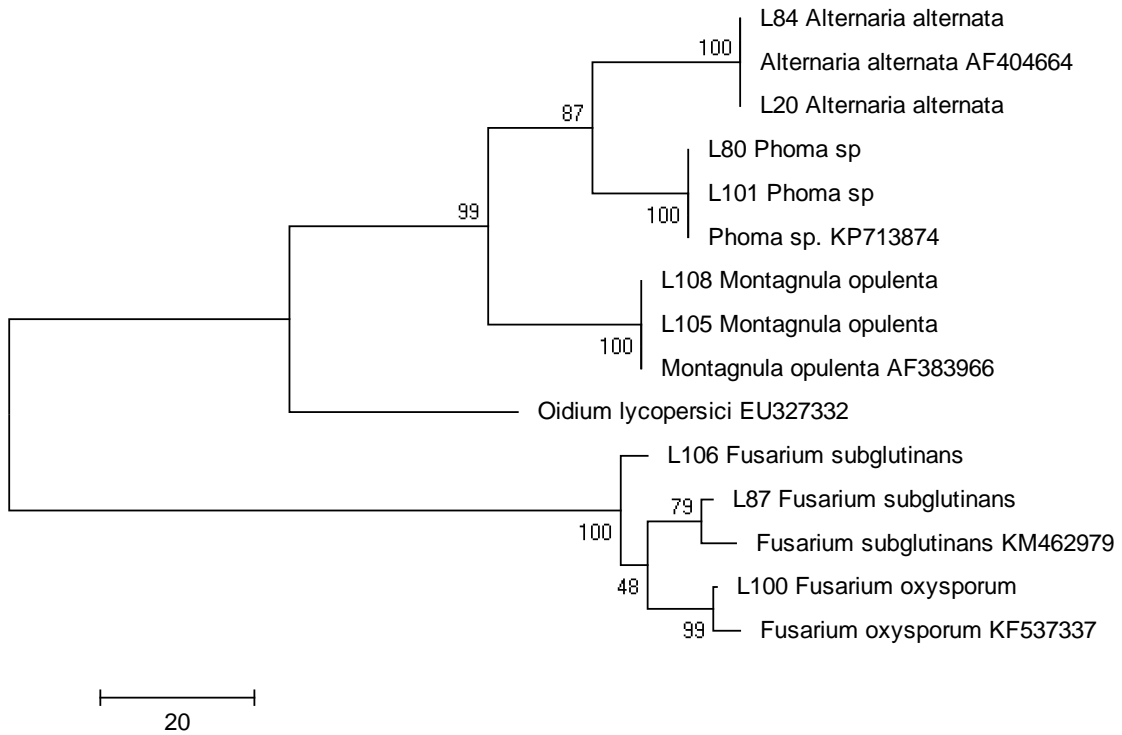
Este ascomiceto se reportó por primera vez en el género *Opuntia* en Sudáfrica, pero el informe es en *Opuntia stricta* Haw. y no en *O. ficus-indica* (Crous *et al.*, 2000, Barr, 2001).

*Montagnula aloe* ha sido reportada para la mancha negra en *Aloe* sp. en Sudáfrica, (Crous y Johannes, 2012).

Nuevas asociaciones fúngicas de nopal se han identificado pero no se han registrado. Enfermedades de cladodios que se han investigado en Sudáfrica durante los últimos cinco años tienen revelado la presencia de numerosos hongos. Tales como algunas especies de *Fusarium* y *Alternaria* clasificadas como endófitas, los cuales producen enzimas con actividad extracelular hidrolítica como parte de su mecanismo de resistencia en superación de las defensas del hospedero o contra la invasión microbiana y/o para obtener nutrientes del suelo (Tan y Zou, 2001; Swart y Swart, 2002). Estas enzimas incluyen esterases, pectinasas, celulasas, lipasas, proteasas y xilanasas (Petrini *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 2006; Suto *et al.*, 2002). Como una forma de establecer el papel funcional de los hongos endófitos, se estableció la necesidad de detectar la actividad extracelular en la producción de enzimas (Carroll y Petrini, 1983). *Fusarium lateritium* Nees (Celulosa y xilanasas), *Phoma tropica* R. Schneid. & Boerema (Xilanasas y proteasas) han sido reportados como hongos endófitos en cladodios de nopal en Brasil (Bezerra *et al.*, 2012).

### **6.3.7 Análisis filogenético**

El análisis se realizó a partir de la amplificación de la región TEF para el caso de *Fusarium*, y de la región ITS para *Alternaria*, *Phoma* y *Montagnula*. Se generó un árbol en el cual se separó en un clado al género *Fusarium* junto con las accesiones de estos géneros reportados en el GenBank, mientras que en el otro clado se agruparon formando más nodos separando claramente cada una de las especies secuenciadas con las respectivas accesiones reportadas. En este mismo clado se agrupó la especie fuera de grupo *Oidium lycopersicy*.



**Figura 19. Árbol filogenético por Máxima Parsimonia obtenido del análisis del alineamiento de secuencias de la región TEF (*Fusarium*) e ITS (*Alternaria*, *Phoma* y *Montagnula*).**

## VII. CONCLUSIONES

A partir de la morfología de los aislamientos se ubicaron cuatro grandes géneros, y se detectaron diferencias principalmente en color de las colonias.

Los perfiles polimórficos obtenidos a partir de las enzimas de restricción de la región ITS, y la secuenciación (ITS-TEF) nos permitieron corroborar la identificación de los cuatro géneros de hongos aislados de cladodios de nopal con engrosamiento: *Fusarium*, *Alternaria*, *Phoma* y *Montagnula*.

El análisis RFLP e ISSR mostraron variabilidad dentro de cada género, sin embargo esta variabilidad dentro de cada género no significa que se traten de especies diferentes, dado que pueden existir mutaciones, recombinación genética, etc., por lo que es necesario recurrir a la secuenciación de las regiones ITS, TEF,  $\beta$ -tubulina, Actina entre otras, que nos permitan diferenciarlo.

La alta incidencia y severidad de engrosamiento de cladodio en nopal en la zona de estudio coincidió con la mayor presencia de *Fusarium*, correspondiendo a los géneros *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, causantes de desbalances hormonales en otras especies.

La presencia de hongos endófitos pertenecientes a *Fusarium*, *Phoma*, *Alternaria* y *Montagnula*, tienen una actividad enzimática en relación a su hospedero, planta-patógeno, pero al igual la interacción entre patógenos en un mismo hospedero tienen un comportamiento diferente, y dado que las relaciones fúngicas no han sido estudiadas se desconocen sus efectos en el hospedero.

## VIII. LITERATURA CITADA

- Aguilar R., J. 2003. Uso de nuevas técnicas en la detección y análisis genético de fitopatógenos de importancia cuarentenaria. *In: Memorias del evento de aprobación para signatario de laboratorio de diagnóstico fitosanitario; Tomo II: Base Técnica.* Chapingo, México.
- Akimitsu K, Peever T., L, Timmer L., W. 2003. Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding *Alternaria* diseases of citrus. *Molecular Plant Pathology.* 4:435-446.
- Anaya P., M. A. 2001. History of the use of *Opuntia* as forage in México. *In: J, Mondragon C. Y Perez G. (eds). Cactus (Opuntia spp.) as Forage.* FAO. Plant Production and Protection. Paper 169, pp. 5-12.
- Anaya P., M. A. 2001. History of the use of *Opuntia* as forage in Mexico. FAO .Plant Production and Protection. Paper (FAO) 169. pp. 5-12.
- Anderson I., C. y Cairney J. W. G. 2004. Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques. *Environ. Microbiol.*6: 769-779.
- Aptroop A. 1995. Redisposition of some species excluded from *Didymosphaeria* (Ascomycotina). *Nova Hedwigia* 60: 325-379.
- Ariyawansa H., A. Camporesi E, Thambugala K., M, Mapook A, Kang J., C, Alias S., A, Chukeatirote E, Thines M, Mckenzie E., H. C, Hyde K., D. 2014b. Confusion

- surrounding *Didymosphaeria* — phylogenetic and morphological evidence suggest *Didymosphaeriaceae* is not a distinct family. *Phytotaxa* 176(1):102–119.
- Aveskamp M., M, Gruyter J de, Crous P., W. 2008. Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity*. 31: 1–18.
- Aveskamp M., M., de Gruyter J., Crous P., W. 2009. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties *Mycologia*, 101(3), 2009, pp. 363–382.
- Balbás P., 2002. *De la biología molecular a la biotecnología*. Trillas. México. 301p.
- Barbera, G., Carimi, F., Inglese, P. 1992. Past and Present role of the Indian-fig prickly pear (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). *J.S . Afr. Soc. Hort. Sci.* 3:9-10.
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota: Burgess Publishing Company. 241p.
- Barr M., E. 2001. *Montagnulaceae*, a new family in the *Pleosporales*, and lectotypification of *Didymosphaerella*. *Mycotaxon*. 77: 193–200.
- Becker, J.M., Cadwell G.A., Zachago E.A.. 1997. *Biotechnology. A Laboratory Course*. 2nd. Ed. Academic Press. New York, pp. 141-156.
- Bezerra J., D. P. Santos M., G. S. Svedese V. M. Lima D. M. M. Fernandez M., J. S. Paiva L. M. Souza-Motta C. M. 2012. Richness of endophytic fungi isolated from



- Opuntia ficus-indica* Mill. (*Cactaceae*) and preliminary screening for enzyme production World J. Microbiol Biotechnol. 28:1989–1995
- Boke, N. H. 1980. Developmental morphology and anatomy in Cactaceae. Bioscience. 30(9): 605-610.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey. England. 237 p.
- Borrego, E. F. N., Burgos, V. 1986. El Nopal. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Coahuila, México. 202 pp..
- Bowers J., E. 1996. More flowers or new cladodes? Environmental correlates and biological consequences of sexual reproduction in a Sonoran Desert prickly pear cactus *O. engelmannii*. Bull. Torrey. Bot. Club. 123:34-40.
- Bravo-Hollis. H. 1978. Las cactáceas de México. Universidad Autónoma de México. Segunda Edición. Vol. 1: 719 p.
- Burgess LW, Summerell BA, Bullock S, Gott KP, Backhouse D. 1994. Laboratory manual for *fusarium* research, 3rd edn. Department of Crop Science, University of Sydney/Royal Botanic Gardens, 134 p
- Callejas, J. N. 2007. Situación actual y perspectivas de mercado para la tuna, el nopalito y sus derivados en el estado de Mexico, 2006. Tesis Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. Mexico. 98pp.

- Cano C., I. M.; H.A. Ocaña M.; O. Vázquez Z.; J. Olivares O.; R. Calderón A.; F. Payán C.; L. Scheinvar y A. Chimal H. 1999. "Comercialización del fruto de xoconostle en el Valle de México". En: J.R. Aguirre R. y J. A. Reyes A., Eds. Memorias del VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y aprovechamiento del Nopal. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P., México. pp 52-53.
- Cano, H. R. 2012. Estudio de aspectos bióticos y fisiológicos relacionados al engrosamiento de cladodios del nopal (*Opuntia ficus-indica*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo. 89 pp.
- Cantwell, M. I. 1995. "Post-harvest management of fruits and vegetable stems". En: G, Barbera, P. Inglese y E. Pimienta., eds. Agro-Ecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO Plant Production and Protection Paper 132: 120-136.
- Cárdenas, A., Arguelles, W.M., Goycoolea, F.M. 1998. On the possible role of *Opuntia ficus-indica* mucilage in lime mortar performance in the protection of historical building. Journal of the Professional Association for Cactus Development. 3:1-8.
- Carroll G, Petrini O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. Mycologia 75:53-63
- Carbone, I. y Khon, L.M. 1999. A method for designing primer sets for especiation studies in filamentous ascomycetes. Mycologia, 91:553-556.
- Castellanos C., P.; I.E. López Ch.; J.M. de Luna E. y C. A. Flores V. 1999. "Costos de producción y comercialización de tuna (*Opuntia spp.*) en la región de San Martín de

- las Pirámides”. En: J.R. Aguirre R. y J. A. Reyes A., Eds. Memorias del VIII Congreso Nacional y VI Internacional sobre el Conocimiento y aprovechamiento del Nopal. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, S.L.P., México. pp 360-389.
- Chande A., G. J. Kövics · S. S. Sandhu · M. K. Rai. 2010. Morphological and genetic differentiation among four pigment producing Indian species of *Phoma* (Saccardo, 1899). *Indian J Microbiol.* 50:S110–S116
- Chapman B., J. J., Mondragon, R.A., Campbell, R.C. 2002. Breeding and biotechnology. *In: Cacti Biology and uses.* P.S. Nobel (eds). University of California Press. USA. pp: 255-271.
- Chávez A., A.M.; R.I. Madrid y S. N. Aragón. 1981. “Incidencia de enfermedades del nopal tunero *Opuntia spp.* En la zona de San Martín de las Pirámides, Edo. De México”. *En: Resúmenes del III Congreso Nacional de Fruticultura.* Guadalajara, Jal. p.165.
- Chessin, M., Lesemann D. 1972. Distribution of cactus viruses in wild plants. *Phytopathology* 62:97-99.
- Claros D., G. 1998. Marcadores moleculares: que son, como se obtienen, y para que valen. *Encuentros en la Biología* 49. Universidad de Málaga. Consultado en: 2011-11-20. Disponible en: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>
- Cobb N., A. 1903. Letters on the diseases of plants *Alternaria* of the citrus tribe. *Agricultural Gazette NSW.* 14: 955-986.

- Coleman, A. W. 2003. ITS2 is a double edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends in Genetics*, 19:370-375.
- Collins A., Okoli C., A. N., Parry D., Edwards S.G. y Barbara D., J. 2003. Isolates of *Verticillium dahlia* pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types. *Phytopathology*, 93:364-376.
- Crous, P.W., Philips, A.J.L., Baxter, A.P., 2000. *Phytopathogenic fungi from South Africa*. Univ. of Stellenbosch, Dept. of Plant Pathology Press, Stellenbosch, South Africa. 358 pp.
- Crous W., P. & Johannes Z., G. 2012. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands.
- Cruz H., P. 1982. Guía para cultivar nopal tunero en el estado de Puebla. Folleto Técnico núm. 4. Campo Agrícola Experimental Tecamachalco. CIAMEC, INIA, SHAR, Tecamachalco, Pue., México 26p.
- De Boer et al., 1995. S.H. De Boer, L.J. Ward, X. Li, S. Chittaranjan Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO *Nucleic Acids Res.*, 23 (1995), pp. 2567–2568
- Desjardins A., E., Plattner R., D., Gordon T., R., 2000. *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. *Mycol. Res.* 104, 865–872.

- Enya J, Togawa M., Takeuchi T., Yoshida S., Tsushima S., Arie T. 2008. Biological and phylogenetic characterization of *Fusarium oxysporum* complex, which causes yellows on *Brassica spp.*, and proposal of *F. oxysporum f. sp. rapae*, a novel forma specialis pathogenic on *B. rapa* in Japan. *Phytopathology*. 98:475–83.
- EPPO/CABI. 1997. *Deuterophoma tracheiphila*. Quarantine Pests for Europe , 2nd edn, pp. 733–736.
- Estrada L., A. A, M. Torres A. J. de J. Martínez H. 1994. “Micropropagación de nopal”. En: G. Esparza F. y S. de J. Méndez G., eds. Aportaciones Técnicas y experiencias de la producción de tuna en Zacatecas (Memorias). CREZAS-C.P. CECCCAM. Morelos. Zac. México. Pp. 60-65
- Felker P., Bunch R. 2009. Progreso en la identificación del agente causal de “engrosamiento del cladodio o macho” In. VIII Simposium-Taller Nacional y 1er Internacional “Producción y Aprovechamiento del Nopal”. UANL. Escobedo, Nuevo León, México
- Flores V. C; Luna E. J. M. y Ramírez M. P. P. 1995. Mercado Mundial del nopalito. Universidad Autónoma Chapingo. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM).
- Flores V., C.A.; P.P. Ramírez M.; J.M. de Luna E. y P. Ponce J. 1997. Diagnóstico y programa de desarrollo del Sistema producto Tuna. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y

- Tecnológicas de la Agroindustria y de la agricultura Mundial, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 49p.
- Flores V. C. A. 2004. Discurso de bienvenida. *In: Memorias del X Congreso Nacional y VIII Congreso Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal y otras Cactáceas de Valor Económico.* Universidad Autónoma Chapingo.
- Flores, F. R. 2012. Identificación de Hongos Asociados a la Mancha Negra en Nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill.) y su Sensibilidad al Quitosano. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec, Morelos. 66 pp.
- García, E., R.1967. Estudio sobre posibles enfermedades virosas del nopal. Gen. *Opuntia*. Universidad Nacional Autónoma de México. 33pp.
- García, V. A., Grajeda G. J.E. 1991. Cultive nopal para verdura. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 18p.
- Guadet J., J. Julien, J. Francois. 1989. Phylogeny of some *Fusarium* species, as determined by large-subunit rRNA sequence comparison. *Molecular Biology Evolution* 6:227-242
- Geiser DM, Jimenez-Gasco M, Kang S, Makalowska I, Veeraraghavan N, Ward TJ, Zhang N, Kuldau GA, O'Donnell K . 2004. FUSARIUM-ID v. 1.0: A DNA sequence database for identifying Fusarium. *Eur J Plant Pathol* 110:473–479

- González D. A; Riojas M. E. y Arreola H. J. 2001. El género *Opuntia en Jalisco*. Guía de campo. Universidad de Guadalajara. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la biodiversidad.
- Granados D. D. y Castañeda A. 1991. El nopal. Historia, fisiología e importancia frutícola. Editorial Trillas. México. D.F.
- Granata G. 1995. Biotic and abiotic diseases. Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear. *FAO Plant Production and Protection*, 132, 109–119.
- Granata G., Paltrinieri S., Botti S. y Bertaccini A. 2006. Aetiology of *Opuntia ficus-indica* malformations and stunting disease. *Annals of Applied Biology*. *Ann Appl Biol*. 149: 317–325.
- Gruyter J., Aveskamp M., M. Woudenberg J., H. C. Groenewald J., Z. Verkley G., J. M, Crous P., W. 2009. Molecular phylogeny of *Phoma* and allied anamorph genera: Towards a reclassification of the *Phoma* complex. *Mycological Research*. 113: 508–519.
- Glass N., L. y Donaldson G., C. 1995. Development of primers set designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Appl. Environ. Microbiol*. 61:1323-1330.
- Guevara E. V. 2007. Aislamiento, caracterización e identificación de Microorganismos tipo Levadura asociados a *Ustilago maydis*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Chapingo. México, Texcoco.

- Gutiérrez, L. 1992. Plagas y enfermedades del nopal en Mexico. Reporte de Investigación CIESTAAM, Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Mexico. 53 pp.
- Hasan H., A. H. 2002. Gibberellin and auxin production by plant root-fungi and their biosynthesis under salinity-calcium interaction. Egy pt. Rostlinná výroba, 48, (3): 101–106.
- Higuera R., G.L. 1996. “El proceso de producción y comercialización de la tuna en dos comunidades del estado de Puebla”. Tesis de Maestría. Instituto de Socioeconómica, Estadística e Informática, Colegio de Postgraduados. Puebla, Pue. México. 106p.
- Kamalakannan A., Gopalakrishnan C., Renuka R., Kalpana K., Ladha-Lakshmi D., Valluvaparidasan V. 2008. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Aloe barbadensis* in India. Australas Plant Dis. Notes. 3:110–111.
- Kiesling R. 1999. Domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. J. Prof. Assoc. for Cactus Dev. 3: 50-59
- Kumar J., Singh U., S. and Beniwal, S., P. S. 1993. Mango malformation: one hundred years of research. Annu. Rev. Phytopathol. 31, 217–232.
- Lee H., J. Kim., J. Youn-Sig K. 2013. First Report of Black Spot Disease Caused by *Alternaria alternata* on Sweet Persimmon Fruits Mycobiology. 41(3): 167-169.
- Leslie, J. F., and Summerell, B. A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing, Ames, IA.



- Lievens B., Thomma B., P. 2008. Mini-review recent developments in the molecular discrimination of formae speciales of *Fusarium oxysporum*. Pest Management Science. 64, 781–8.
- López S., D. 2000. Contribución al estudio de los ascomicetes bitunicados de Cataluña. Contribution to the study of Bitunicate Ascomycetes in Catalonia (NE Spain). Acta Botanica Barcinonensia. 50: 5-434.
- Llanderal, C. y R. Nieto. H. 1999. Características biológicas de la grana cochinilla de nopal *Dactylopius coccus* Costa. 23-30. En: Cría de la grana cochinilla del nopal para la producción de su pigmento. (Eds.) Llanderal C. y R. Nieto H. Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 140 pp.
- Mendes, M.A.S., Urben, A.F., Oliviera, A.S. and Marinho, V.L.A. 2006. Interceptação de *Phoma exigua* var. *foveata*, praga exótica e quarentenária para o Brasil, em germoplasma de batata procedente da França. Fitopatologia Brasileira 31: 601-603.
- Méndez G., S. de J.; L.A. Tarango A.; M. González G. 2004. Preliminary analysis of cochineal insects (*Dactylopius coccus* Costa) with high performance liquid chromatography (HPLC). In: G. Esparza F., R. D. Valdez C. y S. de J. Mendez G. (eds). El nopal. Tópicos de actualidad. Universidad Autonoma Chapingo- Colegio de Postgraduados. Pp.223-234
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Pérez-Artés, E., & Jiménez-Díaz, R. M. 2001. Detection of the nondefoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. Plant Pathology, 50(5), 609-619.

- Michielse C., B. 2009. Rep M. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Mol Plant Pathol. 10, 311–24.
- Miric, E., Aitken, E.A.B. and Goulter, K.C. 1999. Identification in Australia of the quarantine pathogen of sunflower *Phoma macdonaldii* (Teleomorph: *Leptosphaeria lindquistii*). Australian Journal of Agricultural Research 50: 325- 332.
- Mondragón J. C, Pérez GS. 1994. Reyna' (syn. 'Alfajayucan') is the leading cactus pear cultivar in Central México. Fruit Varieties J. 48: 134-136.
- Mora A., J. A. 2000. Patogénesis y epidemiología de la “Escoba de Bruja” del mango (*Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum*) en Michoacán, Mexico. Tesis de Doctorado, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.
- Nelson P., E, Horst R., K, Woltz S., S. 1981. *Fusarium* diseases of ornamental plants. In: Nelson P., E, Toussoun T., A, Cook R., J. (eds.) *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press, University Park, PA, USA, pp 121–128.
- Nelson, E. P., Toussoun, T. A. & Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification, The Pennsylvania State University Press, USA, 193p.
- Nerd A., Mizrahi, Y. 1995. Reproductive biology. In: G. Barbera Inglese & E. Pmienta-Barrios (eds). Agroecology, cultivation and uses of cactus pear. FAO. Plan Production and Protection. Paper 132. pp.49-57.

- Nei, M., & Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(10), 5269-5273.
- Nei, M., y Kumar, S. 2000. *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press. 339pp.
- Nery E., A.; A. González M., Pineda M.; L. González C., A. Bernardino N. 2006. Obtencion de dulces a partir de nopal (*Opuntia robusta* Wesndl). *Salud Publica y Nutrición..* 7 (4):22
- Nobel, P. S. 1999. *Physicochemical and environmental plant physiology*. Academic press. 461p.
- Nobel, P. S. 1995. *Enviromental Biology*. 36-48. *In: Agro.ecology, cultivation and uses of cactus pear*. (Eds.) G. Barbera, P. Inglese and E. Pimienta-Barrios. FAO. *Plant Production and Protection Paper 132*. Rome. 216pp.
- Nobel, P. S., Barrera E., Beilman D. W., Doherty, J.H., Zutta, B.R. 2002. Temperature limitations for cultivation of edible cacto in California. *Madroño*. 49 (4): 228-236.
- Ochoa de C. M. 1997. Estado actual del nopal en la República de Argentina. *In: Memorias del VII Congreso Nacional y v Internacional sobre conocimiento y Aprovechamiento del nopal*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Pp. 21-27.
- O'Donnell K, Kistler H. C, Cigelnik E and Ploetz R C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from

- nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 2044–2049.
- O'Donnell K.. 1993. Fusarium and its near relatives. In The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics. Edited by: Reynolds DR, Taylor J. W. Wallingford: CAB International; 1993:225-233.
- Osorio A., F. 1989. “Estudio sobre el engrosamiento de cladodios en nopal (*Opuntia spp*)”. Tesis de Maestría. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. De Méx. 76pp.
- Osorio A., F. y A. Soto E. 1994. “Enfermedades del nopal tunero”. En: G. Esparza F., y S. J. Méndez G., eds. Aportaciones Técnicas y Experiencias de la Producción Tuna en Zacatecas (Memorias). Morelos, Zac. México. pp 46-48.
- Pallás, V., Escobar C., Rodríguez P. P., Marcos J.F. 2008. Herramientas biotecnológicas en fitopatología. Mundi-Prensa. 464p.
- Parker P., G., A. Snow A., M. Schug, D., G. Booton, C. y A. Fuerst, A. 1998. What molecules can tell us about population: choosing and using a molecular marker. Ecology 79:361-382.
- Patrick, G. M. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (*Cactaceae*); new molecular evidence. American Journal of Botany. 91 (11): 1915-1921.

- Pérez M., F. 1998. Tecnología para el procesamiento del nopal. Equipo para el desespinado del nopal verdura. *Industria Alimentaria*: 20:10-11.
- Petrini O, Stone J, Carroll F., E .1992. Endophytic fungi in evergreen shrubs in western Oregon: a preliminary study. *Can J Bot* 60:789–796
- Pimienta, B. E. 1974. Estudios de las causas que producen engrosamiento de cladodios de nopal (*Opuntia spp.*) en la zona de Chapingo. Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Fitopatología. Colegio de Postgraduados. 67 p.
- Pimienta E. 1988. El nopal tunero: Descripción botánica, uso e importancia económica. IN GERMEN, SOMEFI. N° 7. Texcoco, México. Pp. 10-12.
- Rai M., K. 2000. *Phoma* research in India: A review, *In: Integrated management of plant resources*, Scientific Publisher, Jodhpur, India. 337–371
- Rai M., K., Rajak R., C. 1983. Studies on two species of *Phoma* from aquatic environment. *Geo-bios New Reports* 2(28):135
- Saccardo, P.A. 1880. Conspectus generum fungorum Italiae inferiorum nempe ad Sphaeropsideas, Melanconieas et Hyphomyceteas pertinentium systemate sporologico dispositorum. *Michelia* 2: 1-38.
- Ramírez, A. N.A. 2013. Factores Bióticos y Abióticos relacionados al engrosamiento del cladodio de nopal (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo. Estado de México. 99 pp.
- Reyes A., J.A., Aguirre R., J.R, Carlín C., F. 2004. Análisis preliminar de la variación morfológica de 38 variantes mexicanas de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller *En:*

- Esparza F.G, Valdez Z.R.D., Méndez S.J.G. El nopal, tópicos de actualidad. Univ. Autónoma Chapingo y Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp. 21-47
- Riethmüller, A., Voglmayr, H., Göker, M., Weiß, M., & Oberwinkler, F. 2002. Phylogenetic relationships of the downy mildews (Peronosporales) and related groups based on nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. *Mycologia*, 94(5), 834-849.
- Ríos, J., y Quintana, V. 2004. Manejo general del cultivo de nopal. Universidad Autónoma de Chapingo, 19-21.
- Rotem J. 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. St Paul, MN, USA: The American Phytopathological Society Press.
- Rotem J. 1994. The genus *Alternaria*: biology, epidemiology, and pathogenicity. St Paul, MN, USA: The American Phytopathological Society Press.
- Saccardo, P.A. 1880. *Conspectus generum fungorum Italiae inferiorum nempe and Sphaeropsideas, Melanconieas et Hyphomyceteas pertinentium systemate sporologico dispositorum*. *Michelia* 2: 1-38.
- Sáenz, C. 2004. Compuestos funcionales y alimentos derivados de *Opuntia spp.* In: G. Esparza F., R. D. Valdés C. & S. de J. Méndez G. (eds). El nopal Tópicos de actualidad. Universidad Autónoma Chapingo-Colegio de Postgraduados. pp: 211-222.

- Sáenz, C. 2006. Producción industrial de productos no alimentarios. *In: Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de Servicios Agrícolas. FAO. Plant Production and Protection. Paper 162: pp.121-134.*
- Sáenz, C. 2002. Cactus pear fruits and cladode: a source of functional components for foods. *Acta Horticulturæ. 58:253-263.*
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B. And Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science 239:487-491.* Steenkamp E., Britz, H., Coutinho, T., Wingfield, B., Marasas, W., and Wingfield, M. 2000. Molecular characterization of *Fusarium subglutinans* associated with mango malformation. *Mol. Plant Pathol. 1:187-193.*
- Sánchez S., M. 2006. Comunicado de prensa. Coordinación General de Comunicación social y Divulgación. IPN. 3p.
- Scheinvar L. 1995. Taxonomy of utilized *Opuntias*. In: G. Barbera, P. Inglese and E. Pimienta B. Agroecology, cultivation and uses a Cactus pear. FAO plant Production and Protection Paper 132. Rome, Italy.
- Schoch C., L. Crous P., W. Groenewald J., Z. Boehm E., W. A. 2009. A class- wide phylogenetic assessment of Dothideomycetes. *Stud Mycol 64:1-15.*
- Seifert, K. A. E. Cereal, E Cereal, E Cereal. 1996. Fuskey: Fusarium interactive key. Agriculture & Agri-Food Canada, Research Branch, Eastern Cereal & Oilseed Research Centre.

- SIAP. 2014. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SAGARPA. Acceso en Enero 2015.
- Silva R., L. O, Luz J., S, Silveira E., B, Cavalcante UMT. 2006. Fungos endofíticos en *Annona spp.*: aislamiento, caracterización enzimática e promoción do crecimiento em mudas de pinha (*Annona squamosa* L.). *Acta Bot Bras* 20:649–655.
- Simmons E., G. 1999. *Alternaria* themes and variations (236–243) host-specific toxin producers. *Mycotaxon*. 70:325–369.
- Simmons, E. G. 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. C.B.S Fungal Biodiversity Centre. Utrecht, Netherlands.
- Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R. and Harris, K.M. 1992. Quarantine Pests for Europe. Data Sheets on Quarantine Pests for the European Communities and for the European and Mediterranean Protection Organization. CABI Publishing, United Kingdom & OEPP/EPPO, France.
- Stephen, G. R.; E. Arias J. 2001. General background on *Opuntia*. FAO .Plant Production and Protection. Paper (FAO) 169. pp 1-4.
- Suto M, Takebayashi M, Sait K, Tanaka M, Yokota A, Tomita F .2002. Endophytes as producers of xylanase. *J Biosci Bioeng* 93:88–90.
- Swart, W. J. and Kriel, W .M. 2002. Pathogens Associated with Necrosis of Cactus Pear Cladodes in South Africa. *Plant Dis*. 86:693.



- Tan R., X, Zou W., X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Nat Prod Rep* 18:448–459
- Taralova EH, 2008. Online 3D L-systemfungus generator focused on *Alternaria*. <http://vision.cs.arizona.edu/taralove/lssystem.html>.
- Torres M., A, Jones J., D. G, Dangl J., L. 2006. Reactive oxygen spesiesn signalling in response to pathogens. *Plant Physiol* 141:373–378.
- Torres, M. S., White Jr, J. F., Cazares, G., Bergen, M., Bischoff, J.F. and Sullivan, R.F. 2005. A new species and its phylogenetic placement in the *Didymella/Phoma* complex (Phaeosphaeriaceae, Pleosporales). *Mycotaxon* 93: 297-308.
- Tsuge T., Harimoto Y., Akimitsu K., Ohtani K., Kodama M., Akagi Y., Egusa M., Yamamoto M., Otani H. 2013. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews* 37: 44–66
- Typas M., A. Griffen A., M. Bainbridge, B. W. y Heale J. B. 1992. Restriction fragment length polymorphisms in mitochondrial DNA and ribosomal RNA gene complexes as an aid to the characterization of species and sub-species populations in the genus *Verticillium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 95:157-62.
- Valadez, M. E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas, teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa. D.F., México. 147pp.

- Valadez M, E., Kahl, G., Ramser, J., Hüttel, B., y Rubluo-Islas, A. 2001. Técnicas moleculares para la caracterización de genomas vegetales (garbanzo) y algunas aplicaciones potenciales. *Rev. Fitotec. Mex*, 24(1), 103-120.
- Valadez, M. E., & Kahl, G. 2005. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teorías y protocolos de laboratorio) .Editorial Mundi-prensa. México, DF 147p.
- Varga J., Coth B., Riog K., Teren J., Hoekstra R.F., y Kozakiewicz Z. 2000. Phylogenetic analysis of *Aspergillus* based of the internal transcribed spacer regions and the 5.8 S rRNA gene. *Fungal Genet. Biol.* 30: 71-80.
- Vázquez A., A. 1981. El nopal. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales-Comisión Nacional de Zonas Áridas. México. 85p.
- Wang L., Yokohama K., Yacahasi H., Kase N., Hanya Y., Yashiro K., Miyji M. y Mishimura, K. 2001. Identification of species in *Aspergillus* section *Flavi* based on sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene. *Int. J. Food Microbiol.* 71:75-86.
- Wang X., Felker P., Paterson. 1997. Enviromental influences on cactus pear fruit yield, quality and cold hardiness, and development of hybrids with improved cold hardiness. *Journal of the Professional Association for Cactus Development.* 2:48-59.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 485 p.
- Webster, J., & Weber, R. 2007. Introduction to fungi. Cambridge University Press. 817p.

Weising, K., Nybom, H., Pfenninger, M., Wolff, K., & Kahl, G. 2005. DNA fingerprinting in plants: principles, methods, and applications. CRC press.

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, 18, 315-322.

Wijnand J., S. Vaughn R., S., 2003. An Overview of Research on Diseases of Cactus Pear in South Africa J. PACD

Wolfe, A. D. 2005. ISSR techniques for evolutionary biology. Methods in enzymology, 395, 134-144.

Zhang Y., Fournier J., Crous P., W, Pointing S., B, Hyde K., D. 2009. Phylogenetic and morphological assessment of two new species of *Amniculicola* and their allies (Pleosporales). *Persoonia* 23:48–54 .

Zhang Y, Crous P., W, Schoch C., L, Hyde K., D. 2012. Pleosporales. *Fungal Divers* 52:1–225.

Zietkiewicz, E., Rafalski, A., y Labuda, D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.

<http://www.aserca.gob.mx/Documents/Mexbest.pdf>. Consultado en enero del 2015.

<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2011B371.aspx> (datos de exportación). Consultado en enero del 2015.