# Avances en el conocimiento de la mancha negra de la tuna (*Pseudocercospora* sp.)

María Judith Ochoa

México superficie total de 100.000 ha  frutas, 10.500 ha para nopal verdura  1.000.000 ha para forraje (ganado vacuno, ovino y caprino).
SIAP 2010.

Las plagas, patógenos y malezas causan la pérdida de más del 40 % del suministro mundial de alimentos. FAO (2012)

El nivel de producción en los diferentes sistemas productivos de tuna es bajo:

- situaciones económicas y sociales precarias,
- calidad del germoplasma,
- alta incidencia de plagas y enfermedades.

## *Objetivos*

- Determinar si existe variabilidad en el agente causal en cuanto a su patogenicidad y tolerancia en especies hospederas.

- Seleccionar y multiplicar plantas de nopal resistentes o tolerantes a partir de evaluaciones de especies, variedades e individuos con aparente sanidad frente a "mancha negra del nopal".

- Incrementar la variabilidad en la tolerancia a "mancha negra del nopal" utilizando semilla producida bajo polinización abierta, variación somaclonal y mutagénesis inducida.

- Seleccionar y micropropagar plántulas provenientes de semilla, resistente o tolerantes hacia la mancha negra.

- Ajustar protocolos de micropropagación de los materiales vegetales seleccionados por su sanidad.

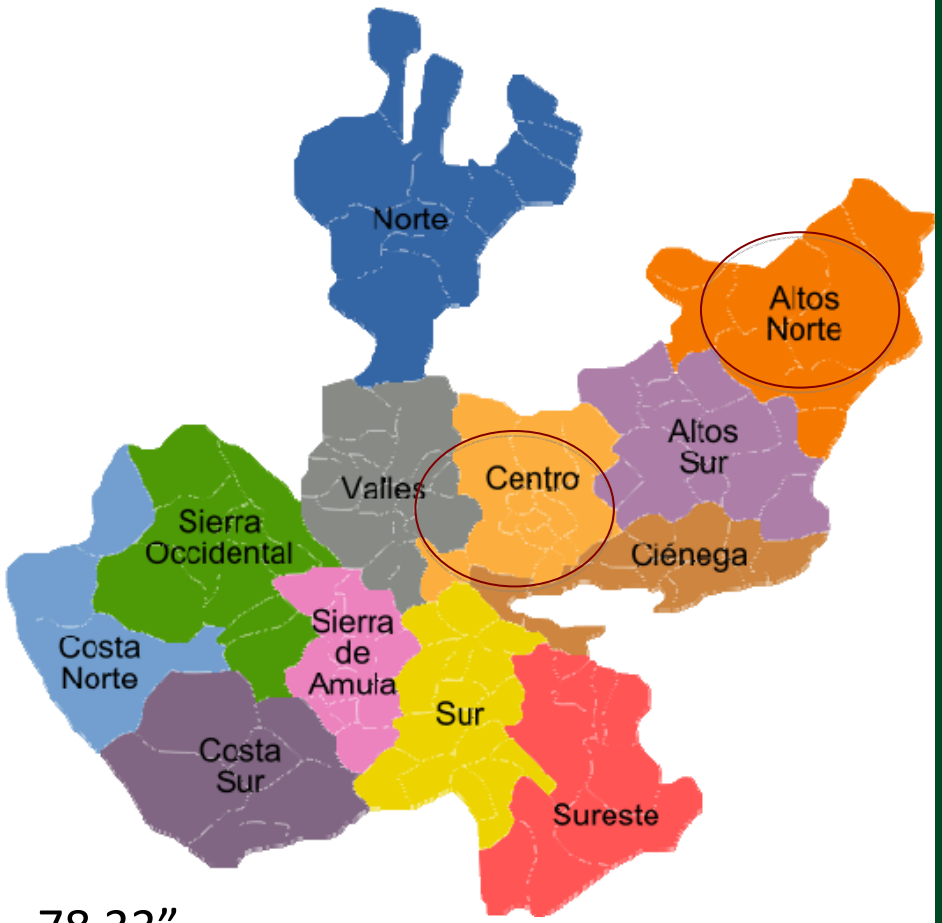
Mancha negra: *Pseudocercospora opuntiae*

❑ Determinar si existe variabilidad en el agente causal en cuanto a su patogenicidad y tolerancia en especies hospederas.

Ojuelos Lat. N 21° 43´ 41,8'' 2280 msnm (producción de tuna)

Estación húmeda y seca

2012 y 2013 se recolectaron cladodios con diferentes síntomas de la enfermedad.




San Esteban y Santa Lucia, Zapopan Lat. 20° 78 33" 1420 msnm (nopal verdura)

## *Pruebas de patogenicidad*

La patogenicidad y virulencia del hongo se probó: a) cladodios pre-cortados b) explantes *"in vitro"* y c) cladodios en condiciones de campo e invernadero. En otros hospederos se inocularon plantas de *Phaseolus vulgaris*.

La inoculación del material vegetal se realizó en todos los casos a una concentración de 8 x $10^{-3}$ conidios $mL^{-1}$ producidos en el medio MEA 2 % en 16/8 h luz/oscuridad a 27° C utilizando buffer fosfato pH 7 para asegurar la adherencia del conidio.

10 d cubiertas HR ⬆

Desinfección con alcohol

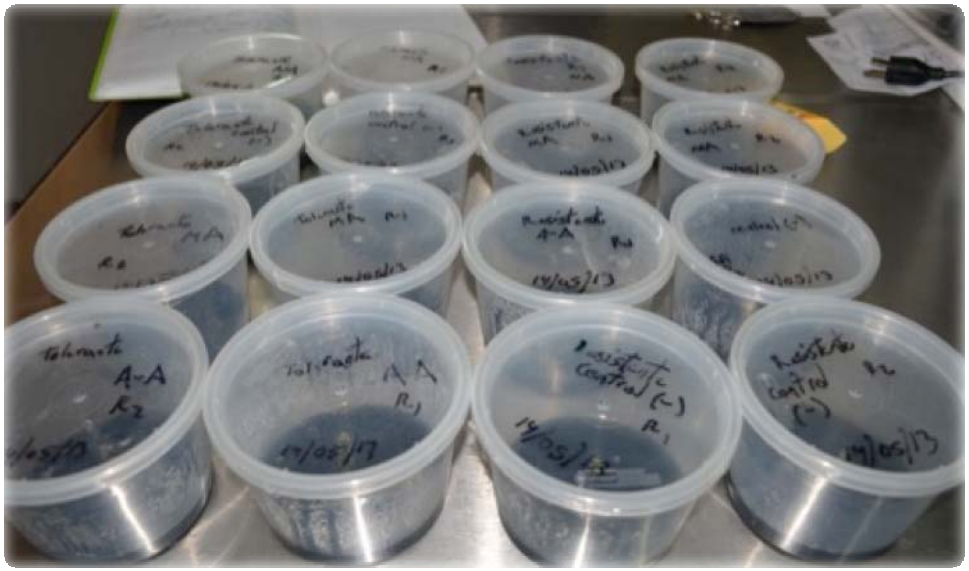
Asperción de la solución conoidal

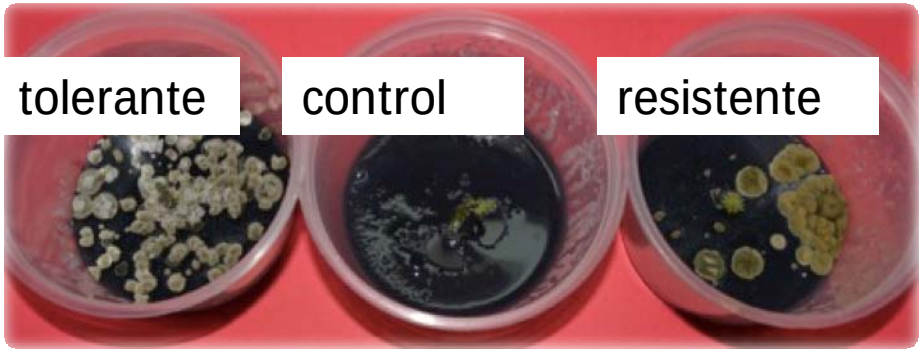
Evaluación semanal

A campo

# *Pruebas de patogenicidad “in vitro”*

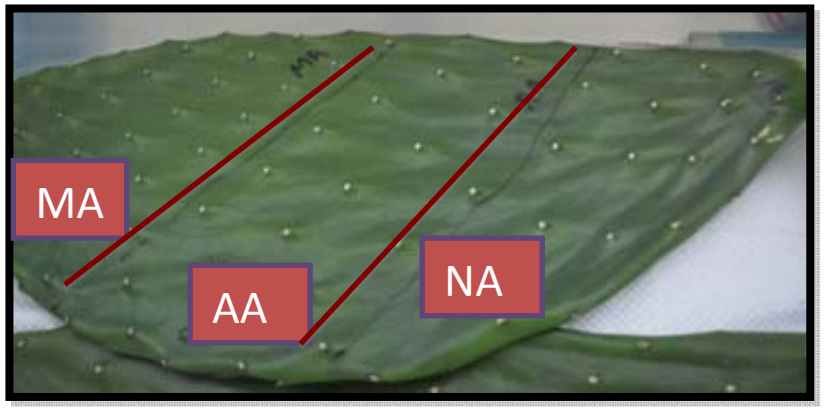
Inyección de 20 µL de suspensión conoidal

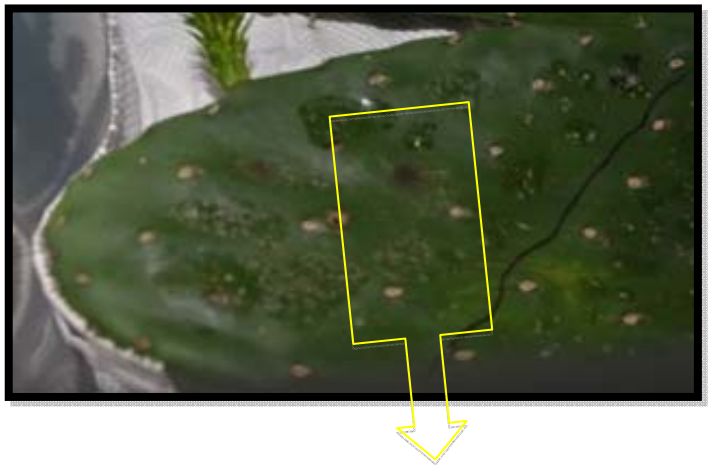




# *Pruebas de patogenicidad en cladodios individuales*

Fueron inoculados con 200 uL de la suspensión conoidal. Se colocaron en camaras humedas



*Materiales y métodos*

# *Resultados y Discusión*

## Síntomas encontrados en campo

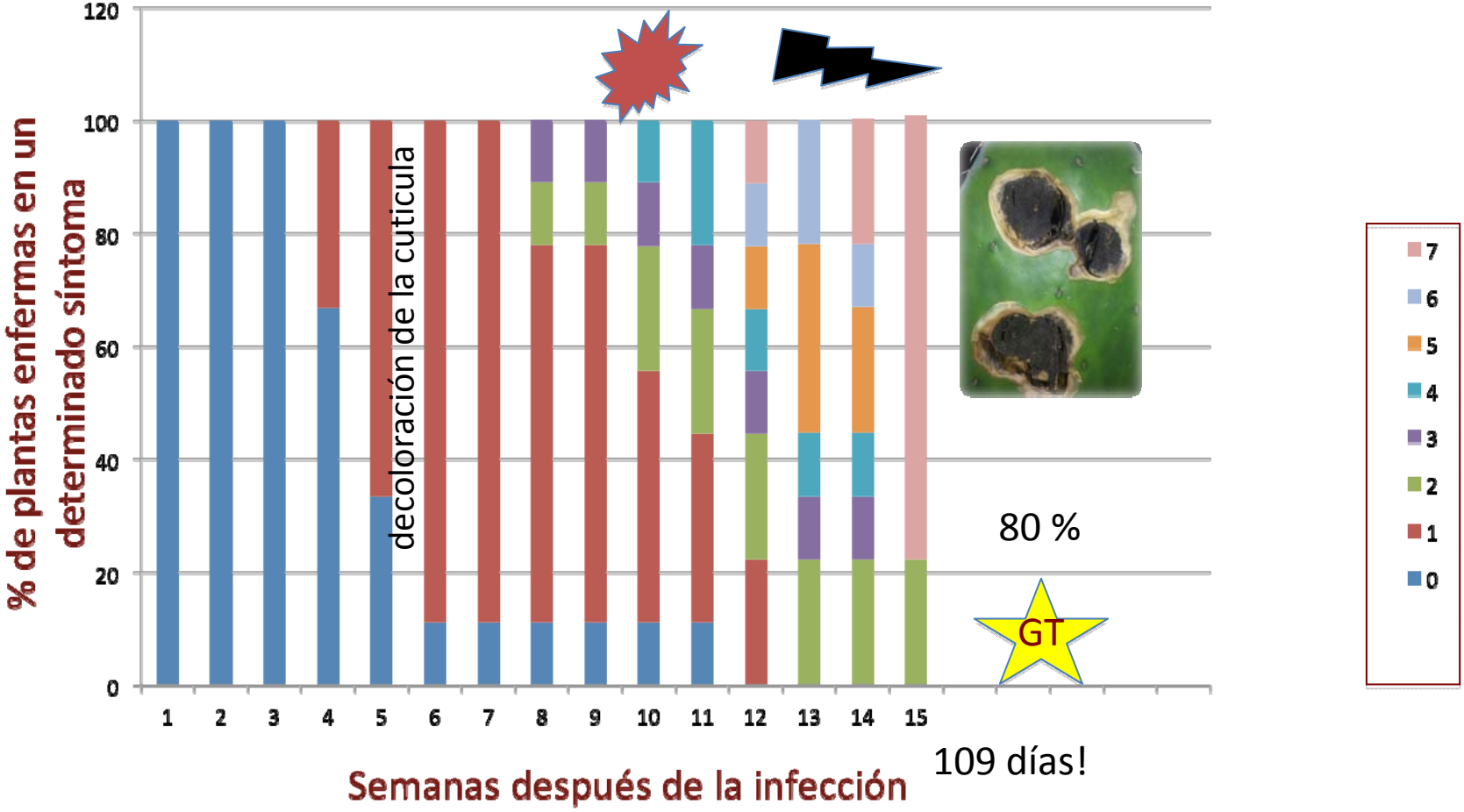
Síntomas en forma circular en un estado avanzado de la enfermedad, presentando una baja incidencia en verano y alta en otoño y principios del invierno. El ciclo de incubación del patógeno es muy lento 90 d después de que las plantas se infectaron, lo que concuerda con lo reportado por (Quezada-Salinas *et al*. 2006; Ayala-Escobar *et al*. 2006). Los distintos síntomas se pueden presentar simultáneamente en un mismo cladodio.

# *Caracterización morfológica*

Después de 60 d *Pseudocercospora* presenta una mejor producción de conidios en el medio MEA 2 %, en condiciones de 16/8 h luz/ obscuridad a 27° C. Estos resultados difieren con los de Ayala-Escobar *et al*. (2006) quienes encontraron el mejor desarrollo de *Pseudocercospora* en el medio NA.

| Medio | Ø de la colonia 30 d | Ø de la colonia 60 d | Color | Micelio | Conidios |
|---|---|---|---|---|---|
| **MEA 2 %** | 2.2 cm | 4.3 cm | Marrón/ verde olivo | Aéreo | conidios a los 30 d |
| **V8** | 2.7cm | 6.9 cm | Verde oscuro/ blanquecino | Aéreo | conidios a los 60 d |
| **NA** | 1.4 cm | 1.9cm | Verde oscuro/ blanquecino | Aéreo | Sin conidios |
| **AA** | 2.3 cm | 4.6 cm | Verde olivo | Inmerso | conidios a los 30 d |

# *Pruebas de patogenicidad a campo*

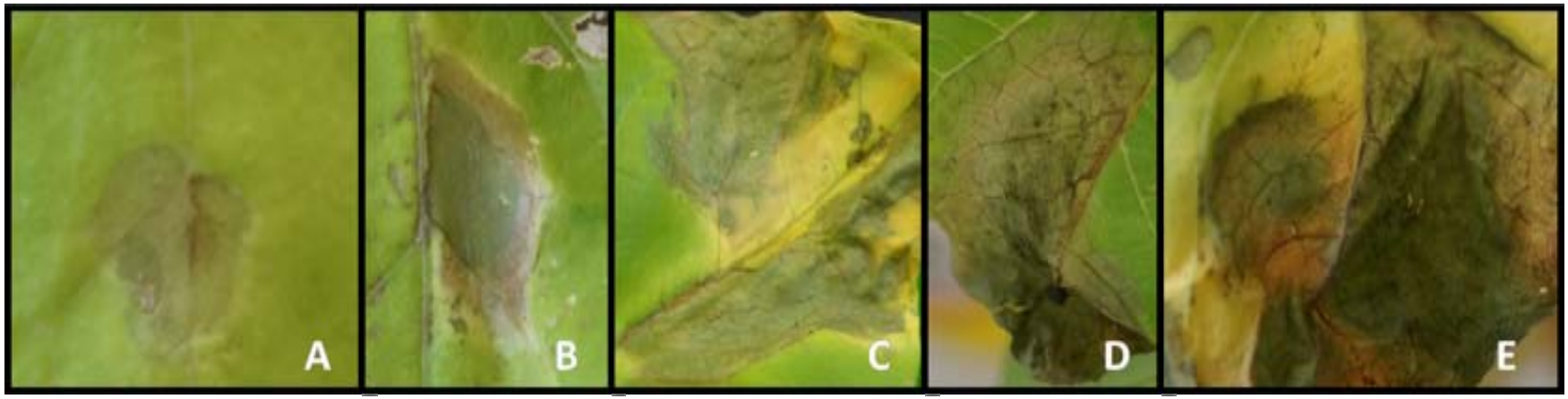



Evolución de los síntomas después de la inoculación

*Resultados*

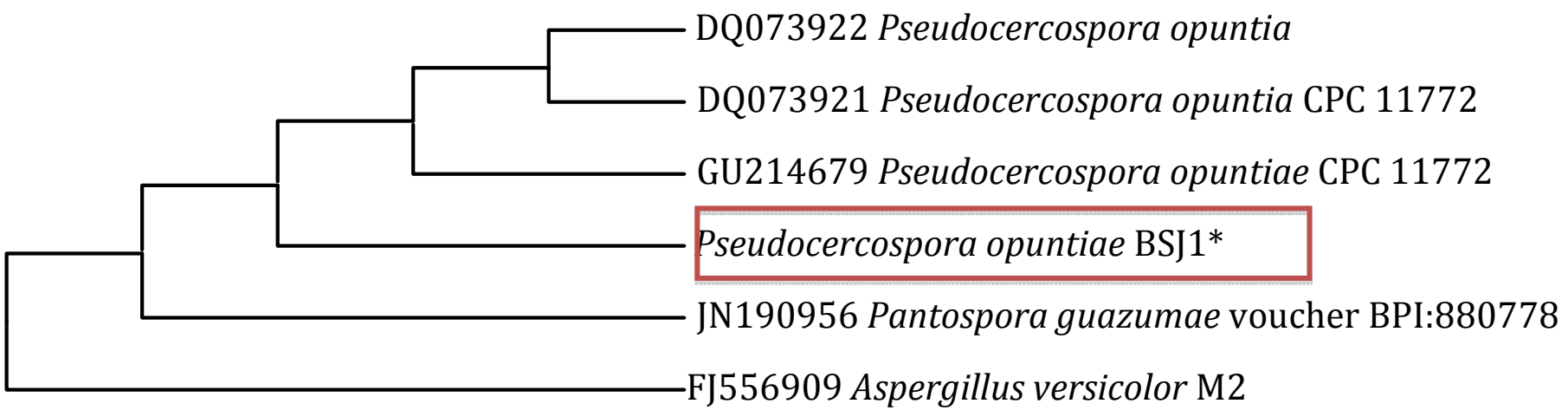
## *Phaseolus vulgaris*

Los síntomas son similares a los encontrados en cladodios de nopal. Con esto se comprueba que la cepa de *Pseudocercospora opuntiae* aislada de nopal, tiene la capacidad de infectar otras especies de importancia económica. Además de que la cepa conserva su patogenicidad y virulencia.




Evolución de los síntomas causados por *Pseudocercospora opuntiae* aislada de cladodios de *Opuntia* en *P. vulgaris.*

# *Caracterización Molecular: Resultados aportados por el CNRG y COLPOS*




Dendrograma basado en los ITS (espaciador transcribible interno) secuencias de la región 1 y 2 de la cepa de *Pseudocercospora* identificada en este estudio. Las secuencias de referencia se obtuvieron de la base de datos GenBank.

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

El agente causal de la “mancha negra” en los sistemas productivos de fruta y verdura en el estado de Jalisco, México, se identificó morfológica y molecularmente como *Pseudocercospora opuntiae*

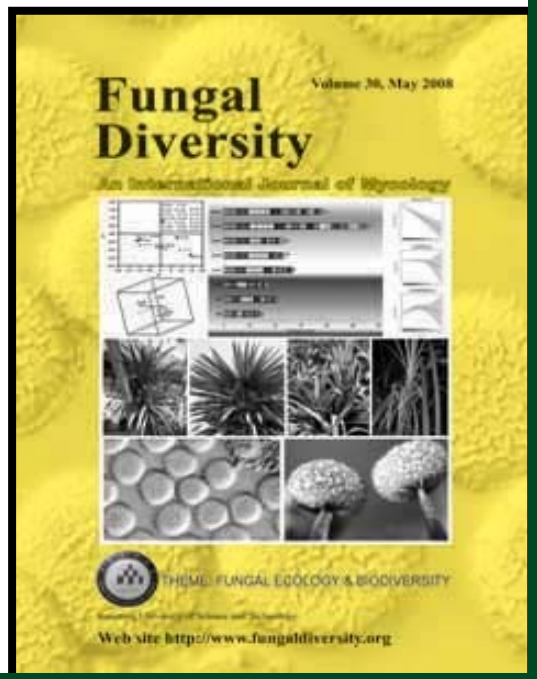
*Articulo terminado y enviado*

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

# "Black spot” caused by *Pseudocercospora opuntiae* in productive systems of nopal in Jalisco, Mexico

María Judith Ochoa[1,2], Luis Ángel Rivera[3], Arteaga-Garibay R[4], Martínez Pena, M. D[4]., Javier Ireta M[3], Liberato Portillo[2]

[1]-Facultad de Agronomía-UNSE, Argentina,[2]-Universidad de Guadalajara[3]-INIFAP-Tepatlitán, [4]CNRG-INIFAP.




Publica artículos de todos los aspectos del campo de la micología, biodiversidad, filogenia molecular y sistemática

## *Conclusiones*

✓El agente causal de la “mancha negra” en los sistemas productivos de fruta y verdura en el estado de Jalisco, México, se identificó morfológica y molecularmente como *Pseudocercospora opuntiae.*

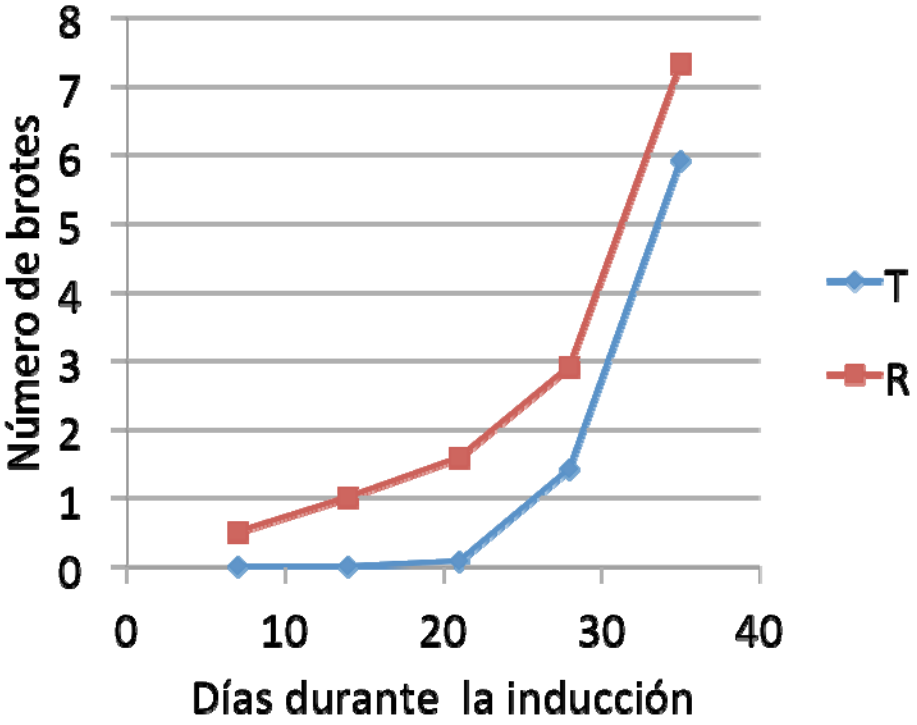
✓La evolución de los síntomas observados en las pruebas de patogenicidad mostraron que los aislamiento de *P. opuntiae* no presentan variabilidad de virulencia en cladodios sanos .

✓Las observaciones de los síntomas encontrados en campo mostraron que *P. opuntiae* tiene una mayor incidencia en la época húmeda, presentando un largo periodo de incubación, lo que permitió hacer recomendaciones practicas de manejo que reduzcan el inoculo e infección de los hospedantes.

✓A partir de las pruebas de patogenicidad se identificaron plantas de *Opuntia ficus indica* con tolerancia *P. opuntiae*

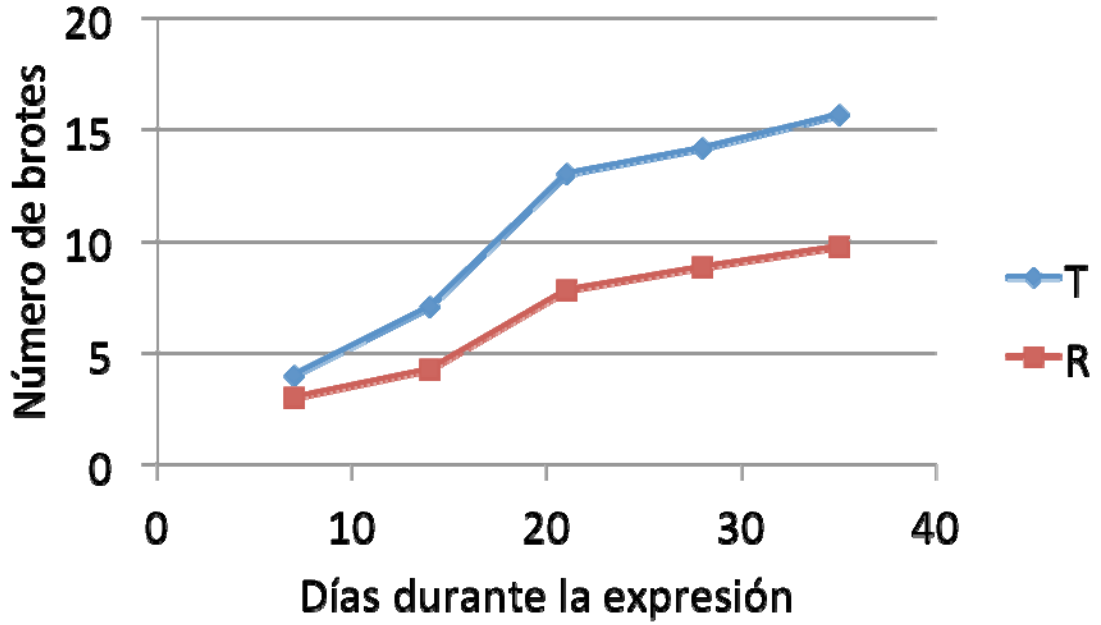
- Seleccionar y multiplicar plantas de nopal resistentes o tolerantes a partir de especies, variedades e individuos con aparente sanidad frente a “mancha negra del nopal”.

# *Proliferación de yemas T y R*




BA: T1: 1,1 mg/L, T2: 2,2 mg/L, T3: 3,3 mg/L medio de inducción. Luego se pasan a medio de expresión MS

Las dosis de BA no tienen incidencia en las etapas de inducción y de expresión. el genotipo si, mostrándose mejor el R en la etapa de inducción y el T en la etapa de expresión

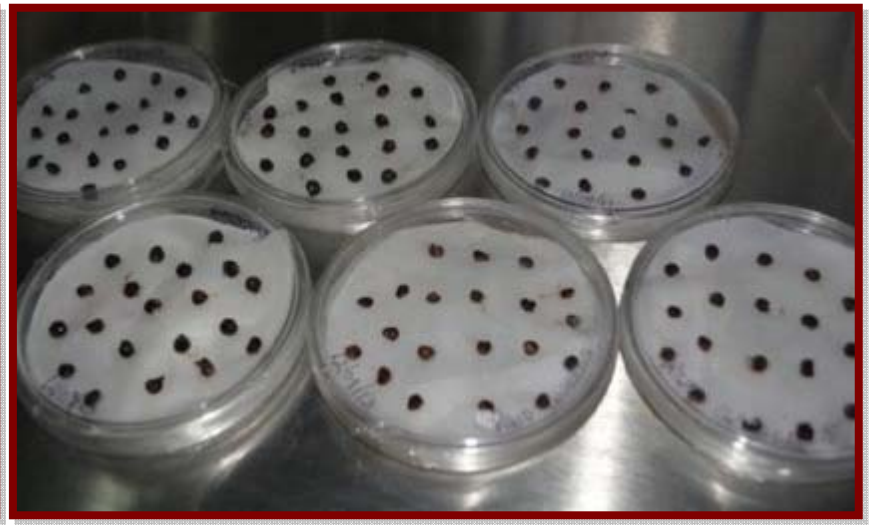


*Propagación de los genotipos seleccionados como tolerantes a Pseudocercospora opuntiae.* Felker (com.pers.2013)

20% prendimiento

vermiculita

- Incrementar la variabilidad en la tolerancia a “mancha negra del nopal” utilizando semilla producida bajo polinización abierta, variación somaclonal y mutagénesis inducida.

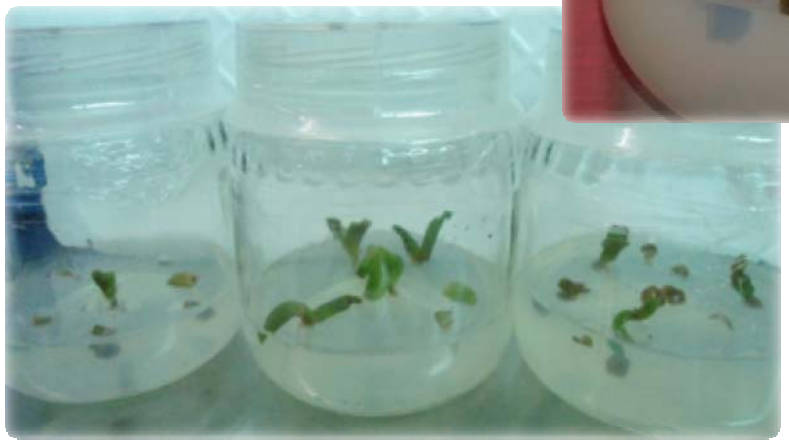


## Estimulación de la germinación

Altare *et al*. (2006)

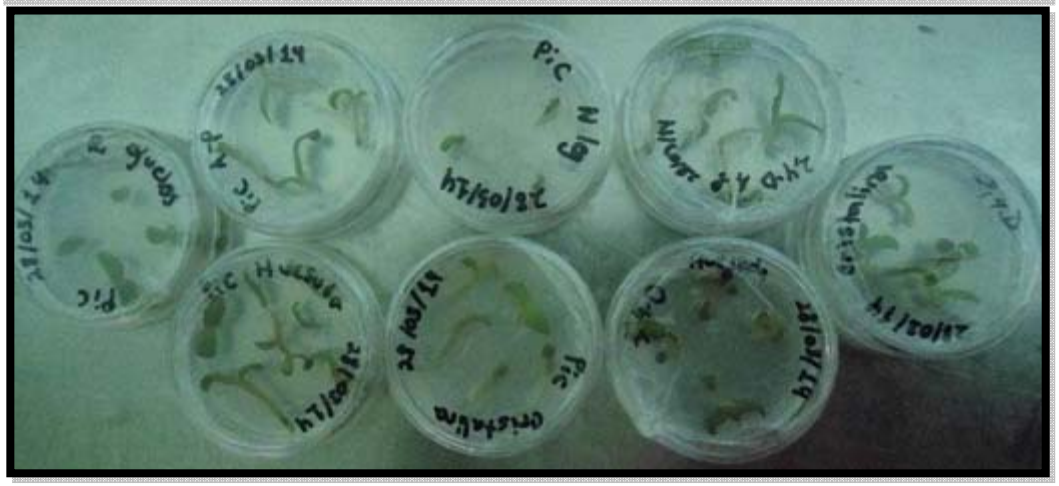
| Cultivar | Germinadas |
|---|---|
| Cristalina | 2 |
| Copena Torreoja | 2 |
| Rojo Ojuelos | 3 |
| Reyna | 12 |
| Amarilla Plátano | 9 |
| Pico Chulo | - |
| Huesona | - |

B5 medium (Gamborg et *al*., 1968.-



Samantha Pinheiro da Costa *et al* 2001

## OTROS PROTOCOLOS

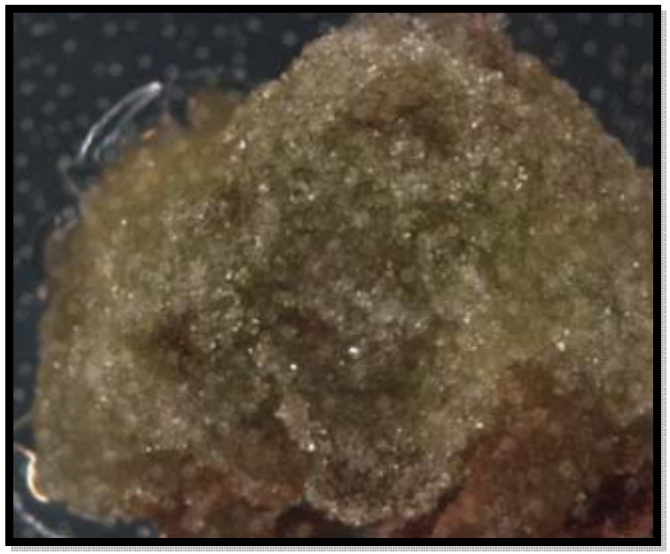


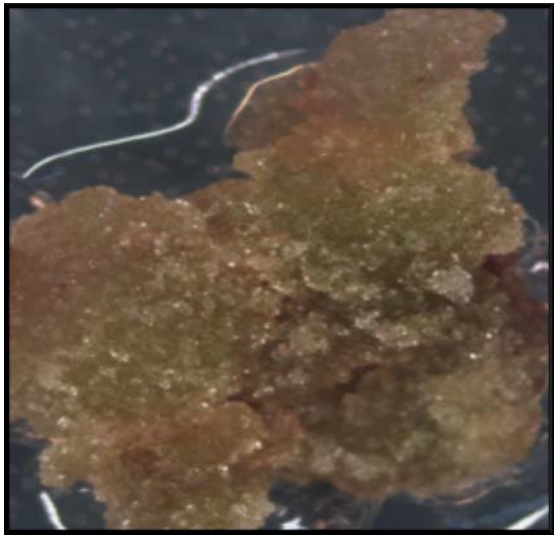
Callos de los diferentes genotipos cigóticos. Influencia de diferentes facores sobre la ES:
PEG, sacarosa, hidrolizado de caseína, Sin resultados hasta el momento.

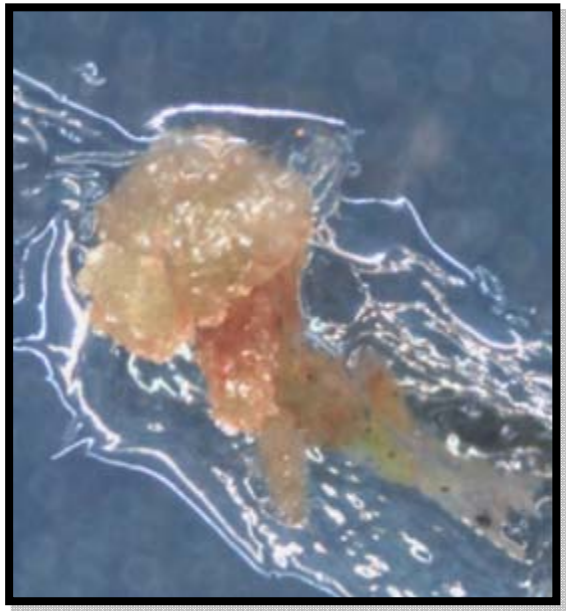
| Genotipo | Producción de callo |
|---|---|
| G 1 | Medio |
| G 2 | Bajo |
| G 3 | Alto |
| G 4 | Medio |
| G 5 | Medio |
| G 7 | Bajo |
| G 8 | Bajo |

# *Raíces y fragmentos de explantes de genotipos cigóticos a inducción de callo*

Gomes *et al.* (2006)







Estereomicroscopio Stemi 2000 C zeiss®

# Análisis proteico

**SDS – PAGE**

Estimar el peso molecular de las proteínas excretadas al medio por el hongo *Pseudosercospora opuntiae*

**Bradford**

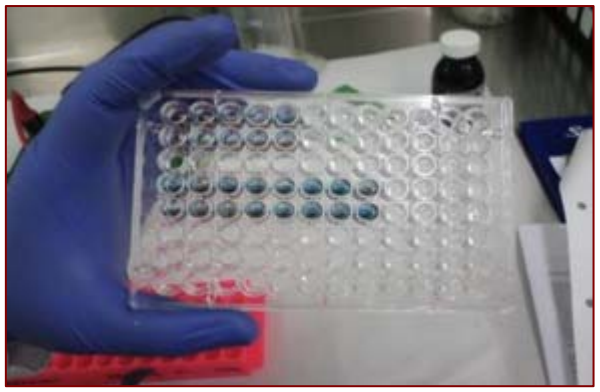
Cuantificar la concentración de proteínas, utilizando curva patrón de albumina sérica bovina

# BIORAD

Extracto hongo liofilizado

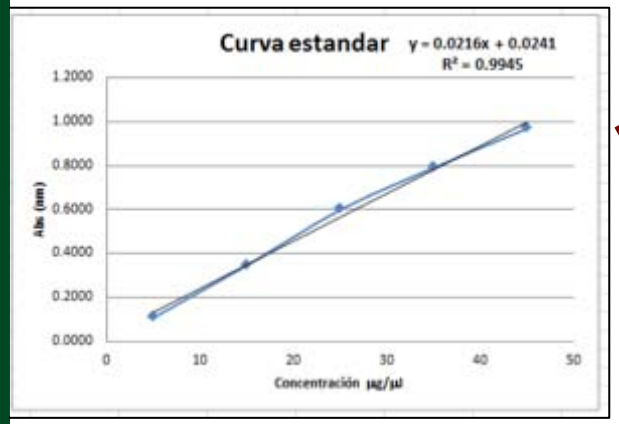
Dilución 1:5, 1:10, 1:20 por triplicado

Agitación en BORTEX



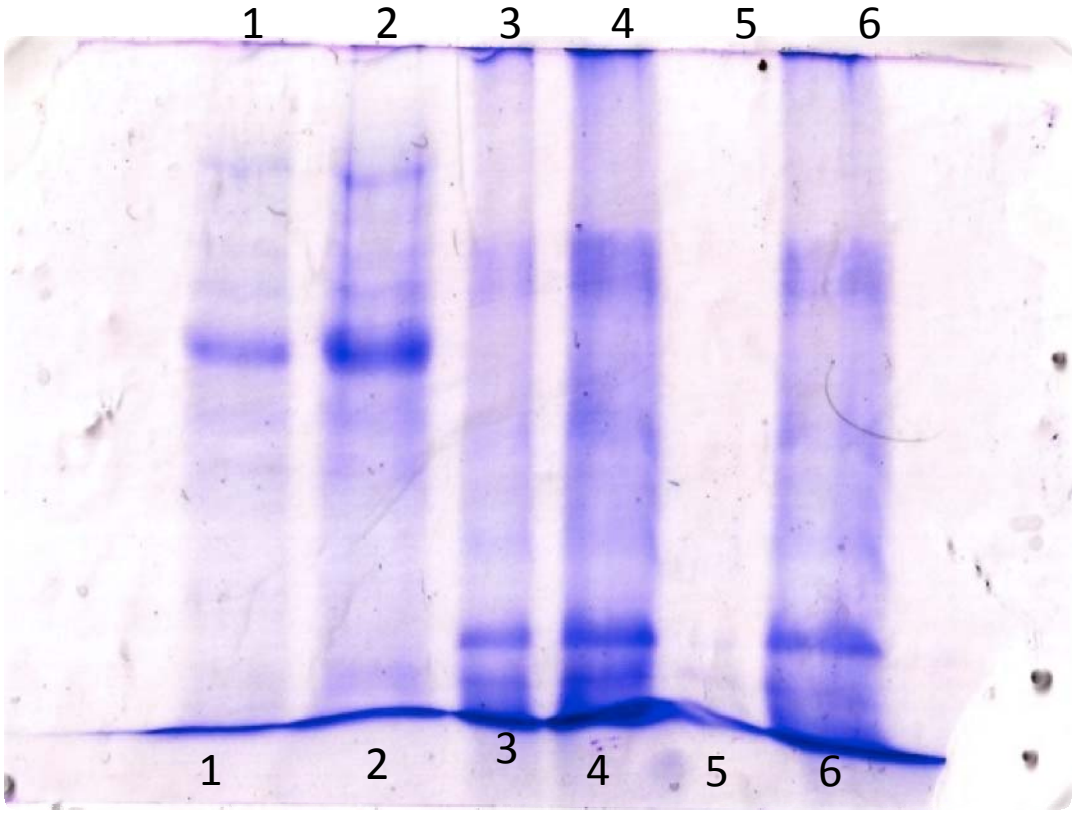
En cada pozo 160 µL muestra y 40 µlL colorante BIORAD

Se lee absorbancia a 589nm




Concentración proteica µg / µL

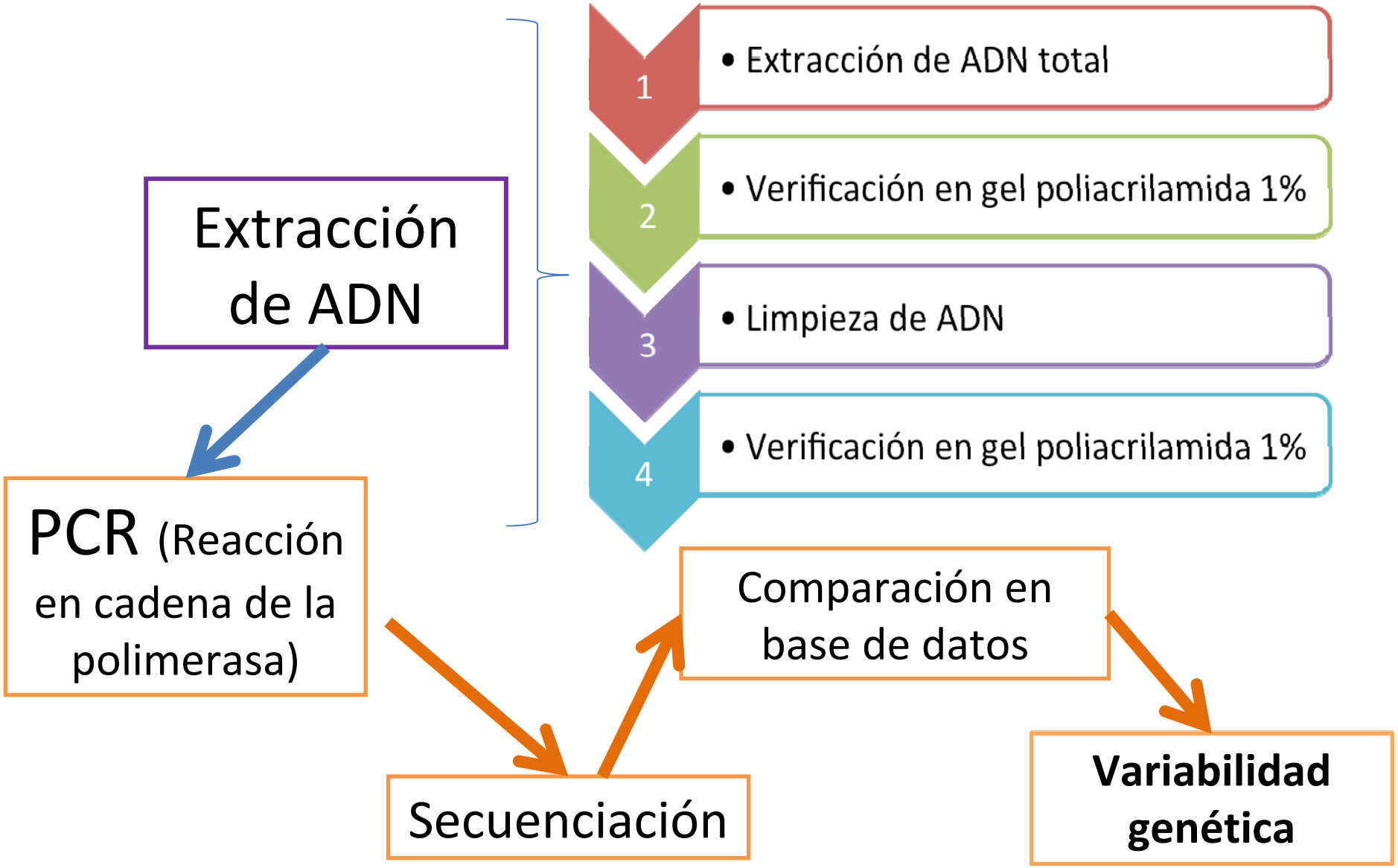
# Analisis del Filtrado, Proteinas Totales: Perfil Proteico SDS-Page (Duodecil sulfato de sodio)




Teñido con azul de comassie

Gel de poliacrilamida mostrando las proteínas excretadas al medio por el Hongo *Pseudosercospora opuntiae*. 1-2: Medio Zapeck, 3-4 Medio V8, 5-6 PDA

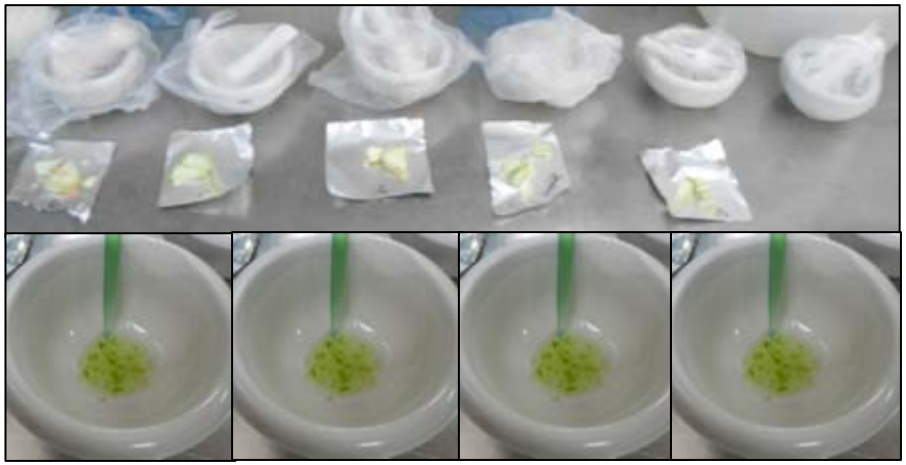
# Análisis genómico



# Extracción de ADN total

Liofilización de muestras

Se pesa 0.1 g de muestra



Morteros previamente esterilizados; muestra más 1mL buffer de extracción (Tris-HCl 100mM, EDTA 20mM, CTAB 4%, NaCl 1.4 mM, β-mercaptoetanol 2%)

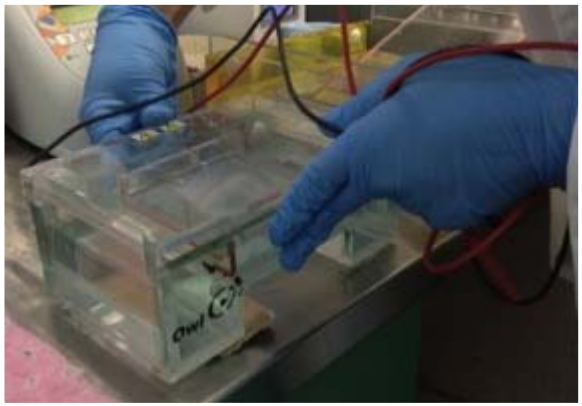
Incubar en tubos eppendorf 1.5 mL a 60° C por 60 min

Adición de un volumen de fenol:cloroformo y centrifugación a 14000 rpm , 15 min

Se transfiere fase acuosa a nuevo tubo mas un volumen de isopropanol frio incubando a -20° C por 15 min

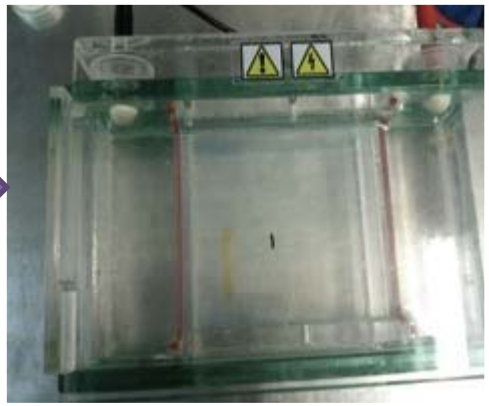
Lavado de pellet con etanol al 70%, eliminar etanol y resuspender en tris-HCL 10mM pH 8

# Gel de poliacrilamida

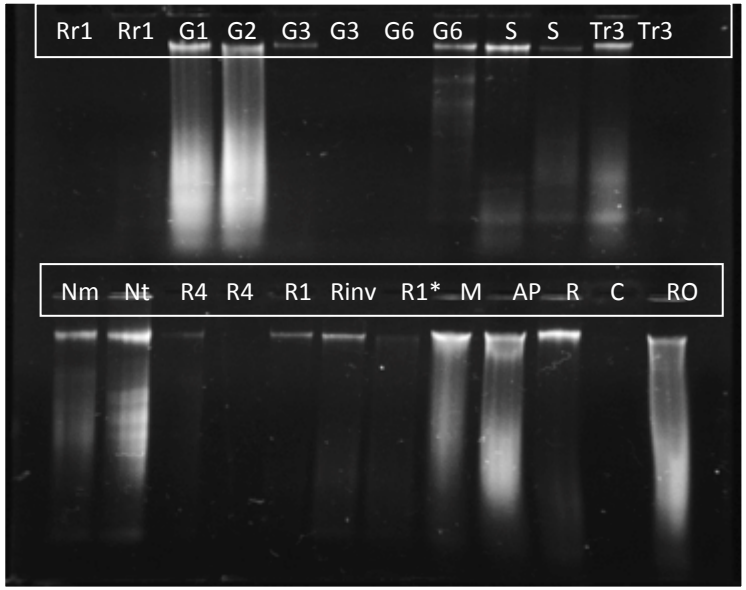


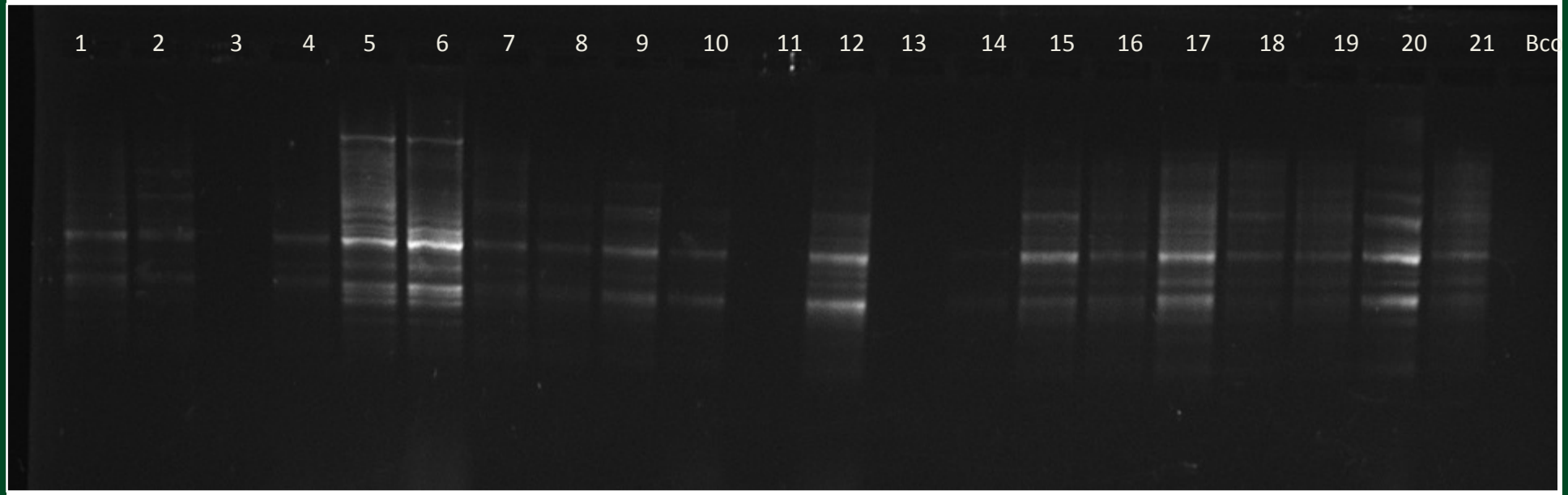
Preparación de gel de poliacrilamida al 1% (0.6 g de agarosa , 60mL buffer SB 1X, 3μL de bromuro de etidio)

Inyección de muestras en gel; 3μL colorante naranja 6X y 7 μL de

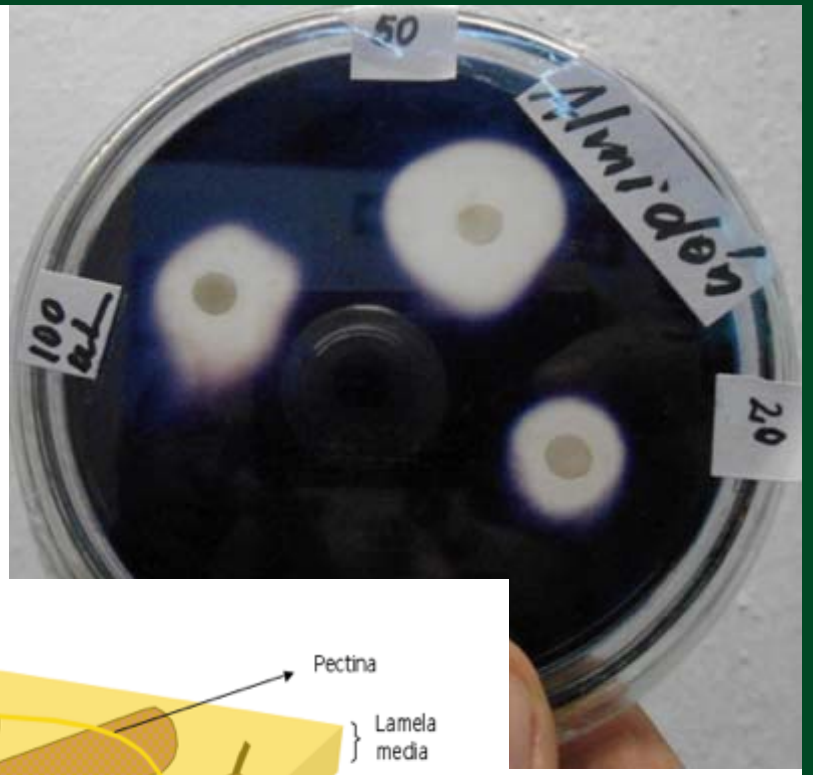


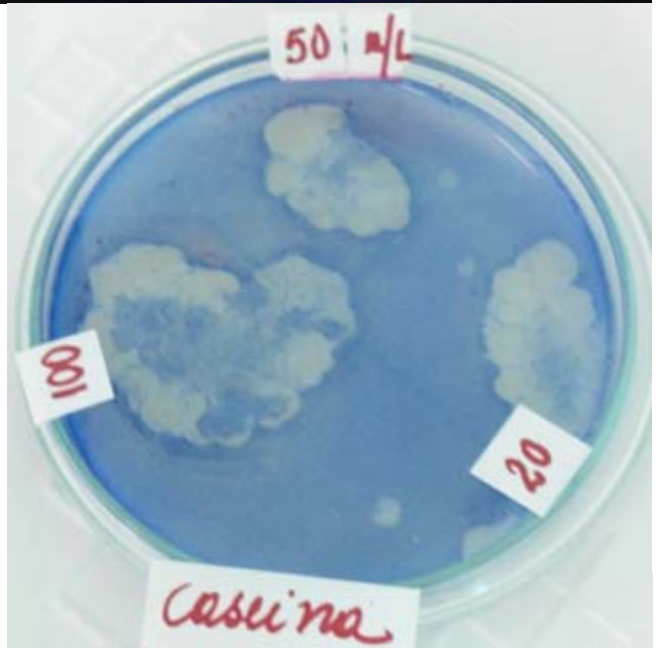
Condiciones de corrida: 120 v, 400 mA, 60 min.

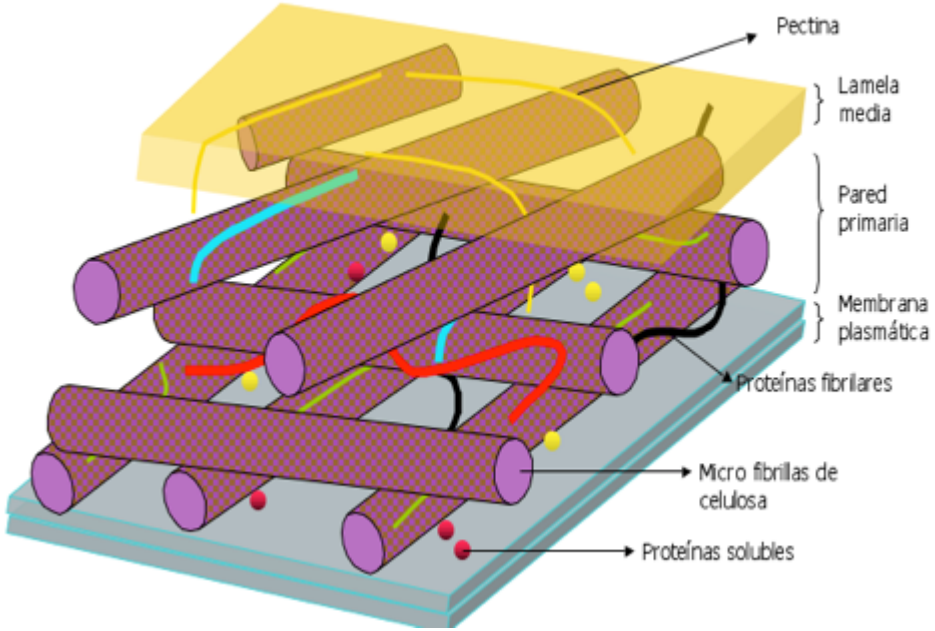





- 1:Rojo ojuelos, 2:Reyna, 3:Morada, 4:Nopalea, 5:Nopalea(madura), 6:Nopalea(tierna), 7:G1, 8:G2, 9:G3, 10:G6, 11:Tr3, 12:Tr3, 13,14 y15: R1, 16: R*, 17:Rinv, 18:R4, 19:S, 20:S1, 21:S2, 22:Blanco




Reacción enzimatica del filtrado de *Pseudocercospora*

# Selección de genotipos resitentes in vitro con *Pseudocercospora* puro y filtrado del mismo

A partir del hongo cultivado en medio Czapeck 30 d en agitación constante, se centrifugó dos veces 3000 rpm durante 15 min., se recuperó el sobrenadante y se filtró con una membrana de 0.22 µm.

Para realizar la selección de plantas resistentes al hongo aplicando directamente este filtrado a las plantas

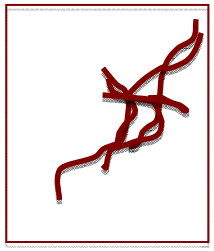
20 $\mu$ L inoculo puro se repite la prueba para el filtrado

Selección de genotipos tolerantes de una segunda prueba de patogenicidad

Propagación por proliferación de yemas

Material para liberar tolerante a mancha negra

Hipocótilos

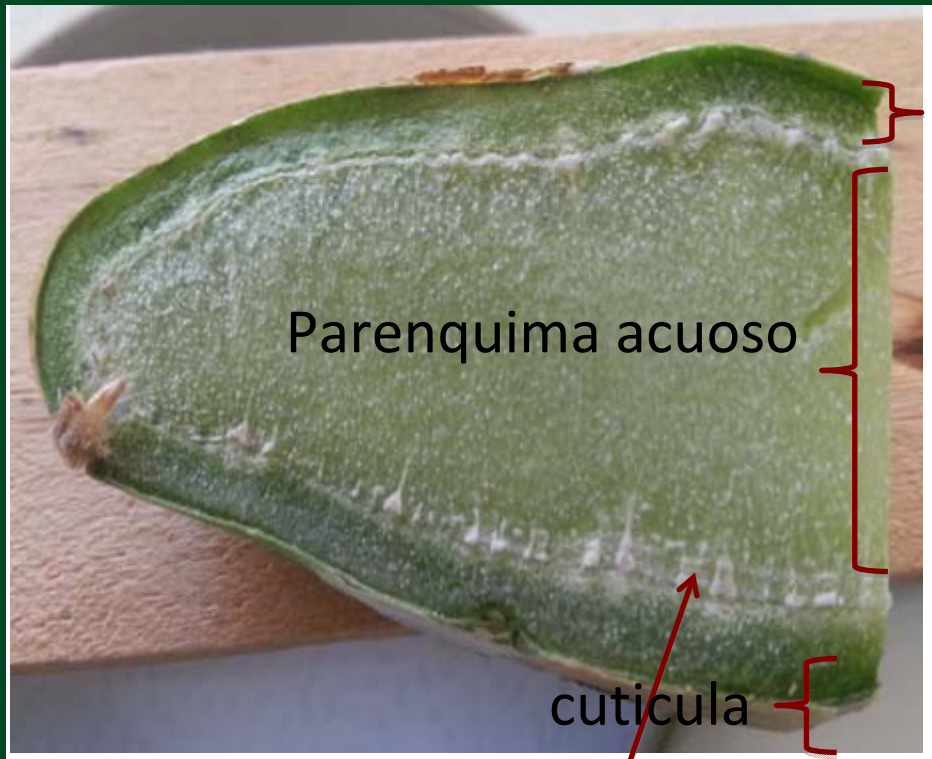


Raíces

Obtención de callos friables y suspenciones celulares

Selección por exposición directa del filtrado de *Pseudocercospora*

Regeneración a través de organogénesis?




Haces vasculares

## Mecánico

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

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

### Organización entre Productores.

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

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

**ZAPOPAN UNIDO**


**Más información:** M. Sc. Judith Ochoa, Biól. Luis Rivera y Dr. Liberato Portillo.

**Departamento de Botánica y Zoología,**
CUCBA, Universidad de Guadalajara.
**judith@unse.edu.ar**
**luis_tastuan@hotmail.com**
**portillo@cucba.udg.mx**

**Dirección de Desarrollo Agropecuario**
con la Ing. Patricia Ortiz Silva en el
**Tel.** 3818-2200 **Ext.** 3240 y 3242
**portiz@zapopan.gob.mx**


# MANEJO DEL HONGO PATÓGENO DEL NOPAL

***(Pseudocercospora Opuntiae)***

## La Mayoría de las Enfermedades del Nopal

Se ven **favorecidas por la presencia de humedad** en el cladodio o penca y sobre todo, **por heridas causadas** por insectos, roedores, aves así como por daños mecánicos que **provoca el mismo hombre** en su manejo.

**Algunas de las principales** causas por las que las enfermedades **han proliferado en este género** son:

- El **método de propagación** y multiplicación del nopal.
- La **poca diversidad genética** con la cual se inició **la expansión del cultivo.**
- El deficiente **manejo agronómico** de los huertos.
- El **desconocimiento de síntomas** (confusión de daños, sinonimia y agentes causales) y estrategias de control.

## Sintomas

En campo se pueden apreciar **dos tipos diferentes de síntomas** provocadas por este patógeno, **la mancha negra en forma circular o bien en forma de mapa.**

La mancha circular **se inicia con la decoloración de la cutícula** cambiando a un blanco transparente con puntos pequeños color olivo; **después se tornan de color café-oscuro** y aumentan de tamaño.

Las manchas **atraviesan el cladodio**, y cuando las lesiones **alcanzan un diámetro de 3 a 4 cm,** presentan un margen y la parte afectada se hunde, para después desecarse, **permaneciendo el tejido leñoso** que a veces se desprende dejando agujeros en las pencas.

En cambio **la mancha negra en forma de mapa se caracteriza** por la invasión parcial o total de la penca sin una forma definida. **Las pencas enfermas predominan en parcelas** localizadas en lomeríos, con temperaturas frescas y humedad relativa alta.

## Medidas Preventivas

Esta enfermedad **ha mostrado un gran avance y daño** en las plantaciones de Jalisco.

## Control Cultural

- Cada **productor debe estar consciente** que es el primer involucrado y beneficiario de evitar la propagación de esta enfermedad **dentro de su parcela, por lo que las revisiones periódicas son importantes,** para detectar los inicios de la enfermedad.

- Al momento de **establecer una nueva plantación** se debe de tomar en cuenta la utilización de **pencas sanas y libres de enfermedades** y plagas.

- **Detectar plantas que presenten resistencia** o menor severidad al daño de la mancha negra; **con el objetivo de utilizarlas en plantaciones** nuevas.

- Realizar **podas de formación de manera preventiva** para mantener una ventilación adecuada de la planta y podas **sanitarias una vez que se encuentren los primeros síntomas y signos de la mancha negra.** Se deben destruir las pencas enfermas, se **recomienda que se entierren aplicándoles cal o bien que se quemen** totalmente las plantas afectadas. Estas prácticas de preferencia se deben **realizar fuera de la parcela** en la que se encuentra el cultivo.

- **Evitar la utilización de fungicidas** sin previa recomendación, ya que **aumenta la perdida de sensibilidad del hongo,** además de su virulencia. por otro lado provoca **contaminación en el ambiente y problemas en la salud** humana.

# *Bibliografía*


Alexopulos, C., J., Mims, C., W. 1987 Introductory micology, 3 Edition, Ed Wiley. United States of America, pp 562-567.

Alonso Barrera B. 2011. Etiologia de un syndrome fungoso y viral en cladodios de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica*). Tesis de maestría en ciencias colegio de Posgraduados, Motecillo Texcoco, Edo de México

Amaya Robles, Julio E. "EL CULTIVO DE TUNA" 2009 *Opuntia ficus índica*. Gerencia Regional Agraria La Libertad, Trujillo-Perú., 18p.

Ayala-Escobar V., Yañez-Morales, M.J.; Braun, U.,Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. 2006. Pseudocercospora opuntiae sp. Nov., the causal organism of cactus leaf spot in México. Fungal Diversity 21: 1-9

Galtier N, Gouy M, Gautier C: SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Applic Biosci* 1996, 12:543–548.

Gouy M, Guindon S, Gascuel O: SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 2010, 27:221–224.

Inglese, P. 2010: Cactus *pear Opuntia ficus*-- indica for fruit production: An overview. In: Nefzaoui, A., P. Inglese, and T. Belay (eds.), pp. 82--92. Improved utilization of cactus pear for food, feed, soil and water conservation and other products in Africa. Proceedings of International Workshop, Mekelle (Ethiopia), 19--21 October, 2009. Newsletter issue 12 .

Ochoa, M J. 2013: Black spot: an important disease for fodder, fruit, nopalitos cactus plantation, in: Proceeding of the second meeting for Integral use of cactus pear XIII Newsletter Cactusnet FAO-ICARDA 63p

Quezada-Salinas J., Sandoval Islas S., Alvarado Rosales D. y Cardenas Soriano E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal ( opuntia ficus-indica Mill) en Tlanepantla, Moreles, Mexico. Agrociencia 40: 641-653.

Rosselló-Mora R and Amann R: The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 2001, 25:39–67.

Saparrat M. C., G. E. Fermoselle,S. A. Stenglein, M. B. Aulicino, P. A. Balatti. 2009.Pseudocercospora griseola causing angular leaf spot on Phaseolus vulgaris produces 1,8- Dihydroxynaphthalene melanin. Mycopathologia. 168: 41-47.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4 0. *Mol Biol Evol* 2007, 24:1596–1599.

**Mancha negra en Bolivia, examen preliminar de la enfermedad**

## La enfermedad no es sistemica

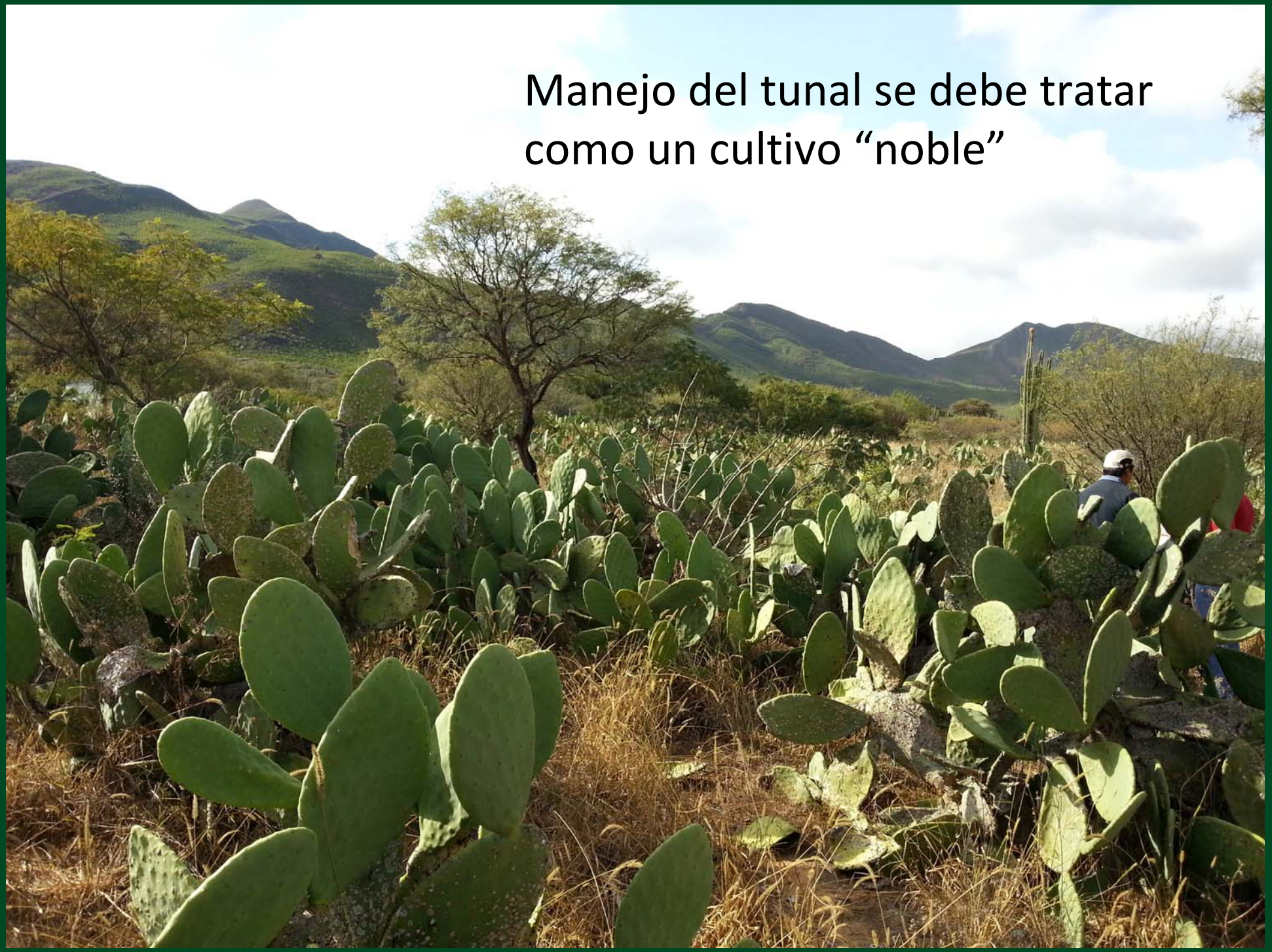
Cladodios sanos, nuevos menos de un año

Cladodios enfermos mas de un año

Planta con mutación ambas con y sin espinas enfermas, siempre los cladodios mas viejos.

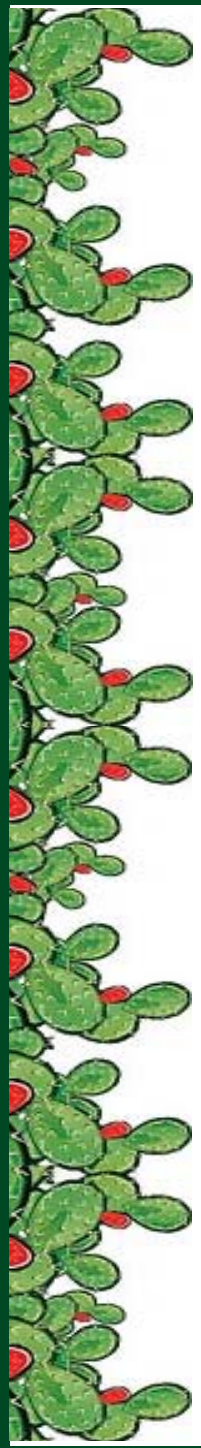
# Manejo fitosanitario de tunal

Manejo del tunal se debe tratar como un cultivo “noble”



# Poda sanitaria: Robles

Capacitación



# Recomendaciones

- La enfermedad no es sistemica, el contagio es por salpicaduras (lluvia) o insectos.
- Utilizar solo material sano para nuevas plantaciones.
- Realizar manejo del tunal.
- Realizar podas sanitarias en el caso de plantaciones muy enfermas (caso Robles).
- Para conversion de plantaciones de fruta a forraje se “convivira” con la enfermedad por lo antes mencionadas.
- Capacitacion de la gente!!!!