

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

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

María Judith Ochoa ^{1,2,3}, Luis Rivera-López ³, Juan Florencio Gómez-Leyva ³

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

RESUMEN

La mancha negra del nopal; provocada por *Pseudocercospora opuntiae* es una enfermedad difundida entre los sistemas productivos de nopal. El proceso de patogénesis, comprende un período de incubación de 90 días y el desarrollo de los síntomas puede ocurrir en 25 días. Sin embargo, aún es limitada la información del patosistema de *P. opuntiae* en *Opuntia* sps. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de productos extracelulares y esporas de *P. opuntiae* sobre plántulas de nopal en condiciones *in vitro*. Se evaluó tres genotipos provenientes de embriones cigóticos y dos genotipos de selección a campo caracterizados como tolerante (T) y resistente (R) a *P. opuntiae*. Se inoculó plántulas de *Opuntia in vitro* con el extracto extracelular y una suspensión de 10⁸ conidios ml, se evaluó el daño a los 15, 30, 45 y 60 días posterior a la inoculación (dpi). Después de 60 dpi se presentaron los síntomas en explantes inoculados con el hongo puro, mientras los productos de excreción del hongo en medio líquido mostraron capacidad de provocar síntomas similares al inóculo fúngico. Estos resultados demuestran que *P. opuntiae* infecta explantes de *Opuntia* bajo condiciones de cultivo *in vitro*, lo que podría ser una herramienta importante en la selección de genotipos resistentes de *Opuntia* sps. a la mancha negra.

Palabras clave

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

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

ABSTRACT

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

Keywords

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

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

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

A dos semanas de su germinación los embriones fueron separados, los cigóticos de los somáticos de acuerdo con Vélez-Gutiérrez *et al.* (1996). Estos explantes de *Opuntia* se establecieron durante 60 días para su endurecimiento en medio MS sin reguladores de crecimiento; fueron denominados como: G₂, G₆, G₇ y los genotipos tolerante (T) y resistente (R), elegidos mediante selección a campo y pruebas de patogenicidad a *P. opuntiae* (13).

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

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

Material microbiológico

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

Obtención del extracto de *Pseudocercospora opuntiae*

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

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

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

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

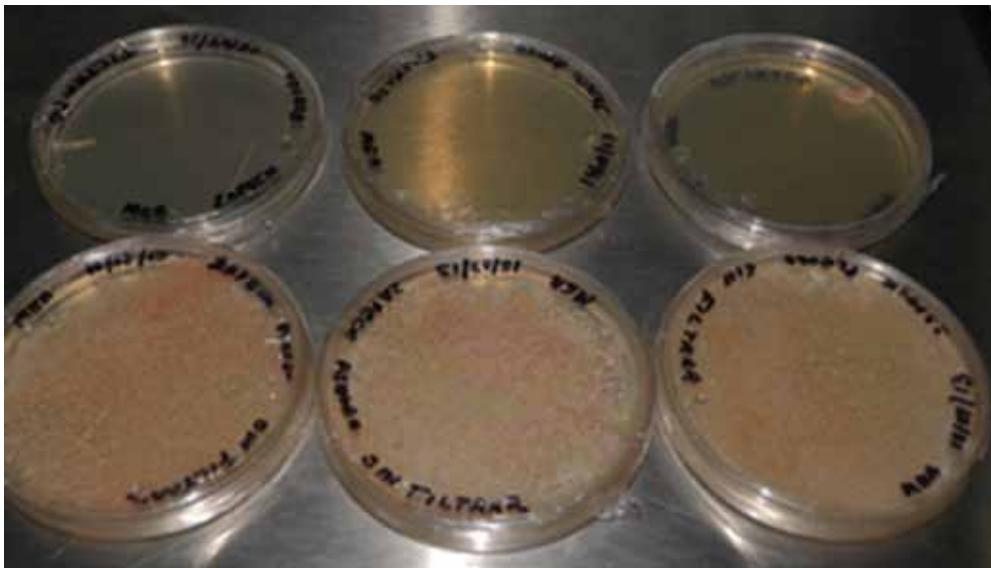


Figura 1. Evaluación de la efectividad del extracto de *P. opuntiae*: arriba filtrado, debajo sin filtrar.

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

Reacción de enzimas del extracto de *Pseudocercospora opuntiae*

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

Almidón

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

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

Proteasa

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

Reacción al azul de Comassie (20).

Celulosa

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

de agar y 1 gota de CaCl₂ 1M, se calentó en microondas durante 1 min para disolver el agar y se esterilizó a 121°C y 1,1 kg cm por 15 min. Luego, se realizó el vaciado en cajas Petri en condiciones estériles bajo campana de flujo laminar. Reacción en UV (Entela 8W Model UVLms-38), se sometió a la luz UV - 365 nm con Calco Fluor Stain (Sigma-Aldrich) (21).

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

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

Inoculación de explantes *in vitro*

Se realizó dos experimentos por separado en los cuales se evaluó la patogenicidad del hongo puro y su extracto en los explantes de los genotipos G₂, G₆ y G₇ (provenientes de semilla), R y T (seleccionados a partir de pruebas de patogenicidad. Los mismos se establecieron en dos sustratos inertes 1: arena, 2: perlita. Los explantes fueron inoculados con 50µl del extracto fúngico y 50µl de suspensión conoidal 1x10⁻⁸ ml; la inoculación se realizó en la parte media de cada explante utilizando una aguja hipodérmica, las plantas control se inocularon con agua destilada estéril.

La patogenicidad del hongo y del extracto se evaluó a los 15, 30, 45 y 60 d, mediante el seguimiento de una escala arbitraria de severidad de la enfermedad (figura 2, pág. 27).

Se utilizó un diseño completamente al azar.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Reacción de enzimas del extracto de *P. opuntiae*

Referente a la actividad enzimática del extracto extracelular de *P. opuntiae* obtenido a partir del medio PDB, se observó la degradación *in vitro* de los sustratos preparados, por las enzimas amilasa, celulasa y proteinasa en todas las concentraciones probadas (20, 50, 100µl) (figura 3, pág. 27).

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

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

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

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

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

Inoculación de explantes *in vitro*

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

Tabla 1. Análisis estadístico multifactorial de sustratos, inóculos y genotipos. T: Tolerante, R: Resistente, G_{2,6,7}: Genotipos cigóticos.

Table 1. Multifactorial statistical analysis of substrates, inoculum and genotypes. T: Tolerant, R: Resistant, G_{2,6,7}: zygotic genotypes.

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

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

* Different letters show statistical differences between treatments Tukey HSD $p \leq 0.05\%$.



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

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

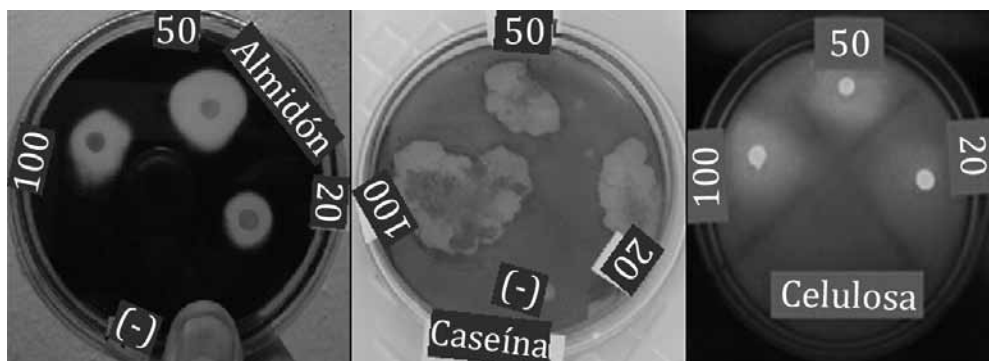


Figura 3. Actividad enzimática de *P. opuntiae* a) almidón, b) caseína, c) celulosa.

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

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

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

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

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

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

Por otra parte, se observa que el extracto fúngico tiene la capacidad de generar patogenicidad en explantes de *Opuntia* (figura 3, pág. 27), lo cual concuerda con otros estudios sobre la patogenicidad de extractos de hongos fitopatógenos (18).

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

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

Respecto de los genotipos evaluados, los denominados como R, T y G₆ después de 60 días después de la inoculación (ddi) mostraron el menor índice de severidad de la enfermedad tanto con el inóculo proveniente del extracto, como con el hongo puro. Por lo cual son genotipos seleccionados para su propagación como resistentes a *P. opuntiae*.

Los genotipos G₂ y G₇ mostraron los índices más altos en la severidad de la enfermedad por los que se consideran genotipos susceptibles a *P. opuntiae* (figura 4, pág. 29).

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

Respecto de la evolución de la severidad de la enfermedad en el tiempo se observó que el genotipo G₂ a los 15 ddi, el 50% de las plantas infectadas presentaban tejido acuoso sin translocación (síntoma 2), el 50% restante presentó necrosis total (síntoma 3). Estos síntomas se mantuvieron los primeros 30 d. A partir de los 45 d todas las plantas presentaron necrosis total (figura 4 A, pág. 29).

El genotipo G₆ desde los primeros 15 ddi, el 100% de las plantas infectadas presentó tejido necrosado en el punto de inoculación, este síntoma se mantuvo hasta los 60 d (figura 4 C, pág. 29).

El genotipo G₇ a los 15 ddi no presentó síntomas de enfermedad en el 50% de las plantas infectadas, mientras que el restante 50% presentó necrosis total (síntoma 3). A los 60 ddi todas las plantas presentaron necrosis total (figura 4 E, pág. 29).

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

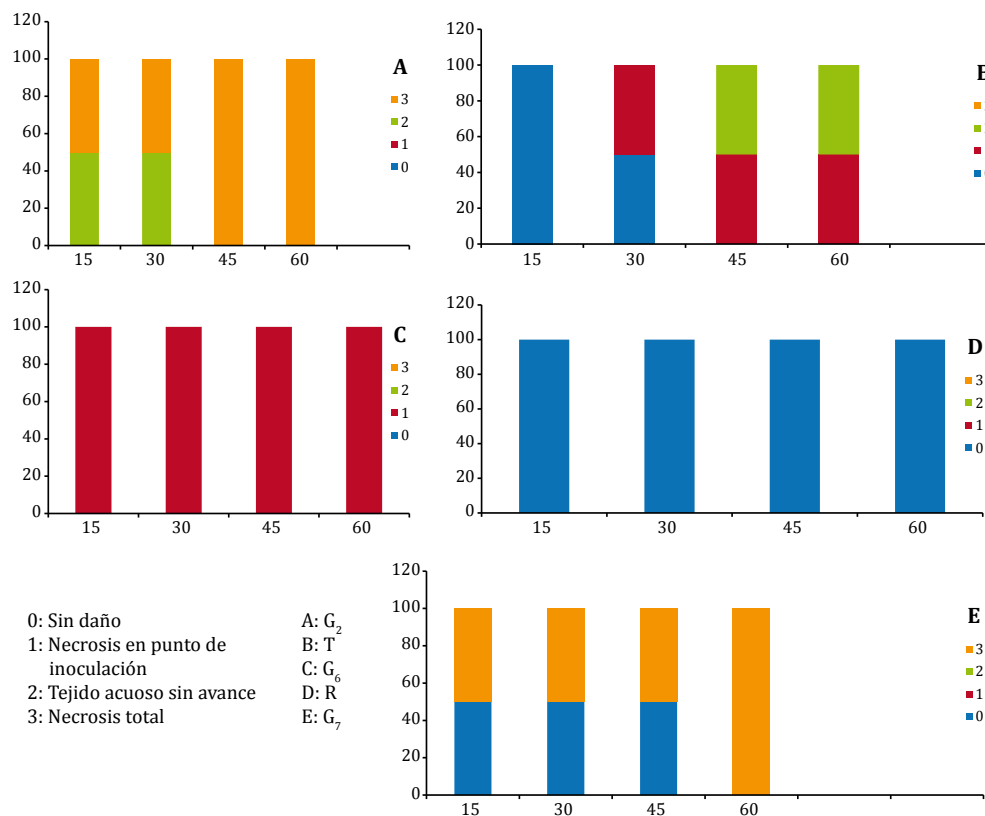


Figura 4. Evolución de los síntomas respecto del tiempo 15, 30, 45 y 60 días después de la inoculación de cada uno de los genotipos evaluados A: G_2 , B: T (tolerante), C: G_6 , D: R (Resistente), E: G_7 .

Figure 4. Symptoms evolution over time 15, 30, 45 and 60 days after inoculation of each of genotypes A: G_2 , B: T (tolerance), C: G_6 , D: R (resistant) E: G_7 .

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

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

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

CONCLUSIONES

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

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

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

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

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

Respecto de los genotipos evaluados, los denominados R, T y G₆ después de 60 ddi, mostraron menor índice de severidad de la enfermedad tanto con el inóculo proveniente de extracto, como con el hongo puro, por lo que sugiere tienen resistencia frente a *P. opuntiae*.

BIBLIOGRAFÍA

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

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