

Etiology of black scab on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico

Etiología de la costra negra del nopal (*Opuntia ficus-indica*) en México

Bruno Laureano-Ahuelicán, ¹Postgrado en Fitosanidad-Fitopatología, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, Texcoco, Estado de México, CP 56230; **Mag-nolia Moreno-Velázquez, Lervin Hernández-Ramos**, ²Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Unidad Integral de Diagnóstico, Servicios y Constatación, Carretera Federal México-Pachuca Km 37.5, Tecámac, Estado de México, CP 55740; **Dionicio Alvarado-Rosales, Esther Martínez-Domínguez**, CONSULCERT Asociados S.C., Tercera Cerrada de la Noria, San Bernardino, Texcoco, México, CP 56260; **Luz de Lourdes Saavedra-Romero, Andrés Quezada-Salinas*.**

*Autor para correspondencia: andresqs@colpos.mx

Recibido: 18 de Enero, 2021.

Aceptado: 30 de Marzo, 2021.

Laureano-Ahuelicán B, Moreno-Velázquez M, Hernández-Ramos L, Alvarado-Rosales D, Martínez-Domínguez E, Saavedra-Romero LL and Quezada-Salinas A. 2021. Etiology of black scab on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 39(2): 329-338.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2101-3>

Primera publicación DOI: 12 de Abril, 2021.

First DOI publication: April 12, 2021.

Resumen. Para identificar el agente causal de la costra negra del nopal (*Opuntia ficus-indica*) se aislaron e identificaron morfológicamente los hongos asociados a la enfermedad. El estudio se realizó a partir de cladodios con síntomas característicos de la enfermedad colectados en la localidad de Santa Cecilia Clavijero, en el municipio de San Juan Ixcaquixtla, Puebla. Los hongos asociados a la

Abstract. To identify the agent of black scab on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), the fungi associated with the disease were isolated and morphologically identified. The study was carried out from cladodes with characteristic symptoms of the disease collected in the town of Santa Cecilia Clavijero, in the municipality of San Juan Ixcaquixtla, Puebla. The fungi associated with the disease were identified as: *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* and *Didymella glomerata*. To demonstrate their pathogenicity, the fungi were inoculated individually and in their combinations in six-month-old cladodes. Symptoms started 50 days after inoculation. The inoculation method that allowed the reproduction of the symptoms was the injection of a suspension at a concentration of 6×10^3 conidia mL⁻¹ of the mixture of the three fungi; cladodes inoculated with one and two fungi, did not result in the development of the disease. C.

enfermedad se identificaron como: *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* y *Didymella glomerata*. Para demostrar su patogenicidad, los hongos se inocularon individualmente y en sus combinaciones en cladodios de seis meses de edad. Los síntomas iniciaron 50 días después de la inoculación. El método de inoculación que permitió la reproducción de los síntomas fue la inyección de una suspensión a una concentración de 6×10^3 conidios mL^{-1} de la mezcla de los tres hongos; cladodios inoculados con uno y dos hongos, no resultó en el desarrollo de la enfermedad. *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata* son los agentes causales de la costra negra del nopal siendo este el primer reporte de estos patógenos en el cultivo del nopal.

Palabras clave: Patogenicidad, Postulados de Koch, inoculación, cladodios.

El nopal (*Opuntia* spp.) se encuentra ampliamente distribuido en el continente americano, principalmente en la parte central, pertenece a la familia Cactaceae en donde la especie más importante debido a su valor económico es *O. ficus-indica*, la cual se cultiva tanto para la producción de frutos (tuna), como para consumo de cladodios (nopalitos) (Caruso *et al.*, 2010). Los usos son diversos, en general se utiliza en la industria alimenticia, medicinal y química, presenta un alto valor ecológico y simbólico (Márquez-Berber *et al.*, 2012). A nivel mundial, México es el principal productor de nopal verdura (*O. ficus-indica*), con una superficie sembrada de 12,799 ha. Las principales entidades productoras son: Morelos con 4,107 ha, Ciudad de México con 2,482, Estado de México con 1,016 y Tamaulipas con 957 ha (SIAP, 2019). Sin embargo, como muchos otros cultivos, la productividad de este es afectada por varios factores, entre los

cladosporioides, *A. hesperidica* and *D. glomerata* are the causative agents of the nopal black scab, this being the first report of these pathogens in the nopal cultivation.

Key words: Pathogenicity, Koch's postulates, inoculation, cladodes.

The prickly pear (*Opuntia* spp.) is widely distributed throughout the American continent, mainly in the central area. It belongs to the Cactaceae family, in which the most important species due to its economic value is found: *O. ficus-indica*, which is planted for its fruit (tuna), as well as for its cladode (nopal) (Caruso *et al.*, 2010). Its diverse uses include production for the food, medical and chemical industries, and it has a high environmental and symbolic value (Márquez-Berber *et al.*, 2012). Mexico is the main producer of prickly pear (*O. ficus-indica*), with a surface of 12,799 ha planted with this crop. The main producing areas are Morelos, with 4,107 ha; Mexico City, with 2,482; State of Mexico, with 1,016 ha and Tamaulipas, with 957 ha (SIAP, 2019). However, like many other crops, its productivity can be affected by several factors, including phytosanitary factors. In the municipality of San Juan Ixcaquixtla, Puebla, the cladodes have been reported with symptoms of dark brown to black spots, which only affect the surface (cuticle, epidermis and part of the parenchyma). At the end of the cycle of the disease, the affected areas can be detached, showing scars and deformities on the cladode. This disease has been called black scab, and it causes deformities and a reduction of the photosynthetic area of the prickly pear; its incidence was of approximately 60%. Similar symptoms, cause by tissue necrosis, are caused by different pathogens in the prickly pear, including

que se encuentran los de índole fitosanitaria. En el municipio de San Juan Ixcaquixtla, Puebla se ha reportado la presencia de cladodios con síntomas de manchas de color café oscuro a negro, las cuales únicamente afectan la parte superficial (cutícula, epidermis y parte del parénquima); al término del ciclo de la enfermedad, las partes afectadas pueden desprenderse dejando ver cicatrices y deformaciones sobre el cladodio; dicha enfermedad se ha denominado como costra negra, la cual causa deformación y reducción del área fotosintética del nopal, con incidencia de alrededor del 60%. Síntomas similares, debidos a necrosis de tejido son causados por diferentes patógenos en nopal entre los que se incluyen a *Fusarium sporotrichioides*, *Lasioidiplodia theobromae*, asociados a la necrosis de cladodios (Swart y Kriel, 2002); *Pseudocercospora opuntiae*, agente causal de la mancha negra del nopal (Ayala-Escobar *et al.*, 2006; Quezada-Salinas *et al.*, 2006); *Fusarium lunatum* (Flores-Flores *et al.*, 2013) y *Pectobacterium* spp. (Torres-Bojórquez *et al.*, 2016). Los síntomas observados en San Juan Ixcaquixtla no coinciden con ninguno de los reportados por lo que el objetivo de esta investigación fue identificar el agente causal de la costra negra del nopal.

En la localidad de Santa Cecilia Clavijero, municipio de San Juan Ixcaquixtla (18° 26' 25.80" N, 97° 47' 35.63" O) Puebla, durante 2018-2020 se recolectaron cladodios con diferentes grados de avance de la enfermedad denominada costra negra. De tejido sintomático se cortaron trozos de 1 cm² de la zona de transición tejido enfermo-sano (conjunto cutícula-epidermis-colénquima). Los trozos se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaOCl) a 1% durante 1 min, se lavaron dos veces con agua destilada esterilizada, se secaron sobre papel secante estéril y se sembraron en cámara húmeda y en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) para ser incubados a 25±2 °C durante cinco días.

Fusarium sporotrichioides, *Lasioidiplodia theobromae*, related to the necrosis of cladodes (Swart and Kriel, 2002); *Pseudocercospora opuntiae*, causal agent of the black scab on prickly pear (Ayala-Escobar *et al.*, 2006; Quezada-Salinas *et al.*, 2006); *Fusarium lunatum* (Flores-Flores *et al.*, 2013) and *Pectobacterium* spp. (Torres-Bojórquez *et al.*, 2016). The symptoms observed in San Juan Ixcaquixtla do not coincide with any reports, therefore the aim of this investigation was to identify the causal agent on black scab on prickly pear.

In the town of Santa Cecilia Clavijero, in the municipality of San Juan Ixcaquixtla (18° 26' 25.80" N, 97° 47' 35.63" W) Puebla, during 2018-2020, cladodes were collected with different degrees of progress of the disease called black scab. Pieces of tissue with symptoms, 1 cm² in size, were cut from the diseased-healthy tissue transition (cuticle-epidermis-collenchyma). The pieces were disinfested with a 1% sodium hypochlorite (NaOCl) solution for 1 min, washed twice with sterilized distilled water, dried on sterilized drying paper, and planted in a wet chamber in a potato-dextrose-agar (PDA) medium and later incubated at 25±2 °C for five days. The fungal cultures developed and the structures formed in the chamber were transferred to a potato-dextrose-agar medium (natural: potato 200 g, dextrose 14 g, agar 18 g, water 1 L) with added lactic acid (1.5 mL at 10%) and incubated under continuous white fluorescent light at 25±2 °C.

The fungi were purified with monoconidial cultures in water-agar at 2% (W/V). The induction of reproductive structures was carried out in PDA at 25±2 °C. The identification and morphological description of the isolations was carried out with temporary and permanent preparations which helped observe the morphology and the size of 100 spores of each isolation under a compound microscope at a magnification of 40X. To determine the species,

Las colonias de hongos desarrolladas y las estructuras formadas en cámara húmeda se transfirieron a medio papa-dextrosa-agar (natural: papa 200 g, dextrosa 14 g, agar 18 g, agua 1 L) adicionado con ácido láctico (1.5 mL al 10%), y se incubaron bajo luz blanca fluorescente continua a 25 ± 2 °C.

Los hongos se purificaron mediante cultivos monoconidiales en agua-agar al 2% (W/V). La inducción de estructuras reproductivas se llevó a cabo en PDA a 25 ± 2 °C. La identificación y descripción morfológica de los aislamientos se realizó con preparaciones temporales y permanentes que se observaron bajo microscopio compuesto (Virtue-N), la morfología y tamaño de 100 esporas de cada uno de los aislamientos a una magnificación de 40X. Para la determinación de la especie se siguieron claves taxonómicas y comparación con reportes existentes en la literatura científica (Boerema, 1993; Bensch *et al.*, 2010; Bensch *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015; Nam *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2018; Mapook *et al.*, 2020).

Se plantaron cladodios sanos en macetas con suelo estéril y se conservaron durante seis meses en un invernadero del Colegio de Postgraduados, México; a una temperatura de 24 ± 3 °C y 70% de humedad relativa. Debido a que de manera consistente se aislaron tres hongos: *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* y *Didymella glomerata* de los mismos trozos sembrados en medio de cultivo, la inoculación se realizó mediante dos métodos: por aspersión e inyección de conidios. Con la cámara de Neubauer se prepararon suspensiones a una concentración de 2×10^3 , 3×10^3 y 6×10^3 conidios mL^{-1} para cada uno de los tres hongos aislados. La aplicación se realizó con aspersores manuales previamente desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5% y tres lavados con agua destilada estéril; y jeringa hipodérmica estéril, a cladodios previamente lavados con agua destilada estéril por triplicado. Los tratamien-

taxonomic keys were followed and comparisons were made with reports from scientific literature (Boerema, 1993; Bensch *et al.*, 2010; Bensch *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2015; Nam *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2018; Mapook *et al.*, 2020).

Healthy cladodes were planted in sterilized soil and kept for six months in a greenhouse in the Colegio de Postgraduados, Mexico, at a temperature of 24 ± 3 °C and a relative humidity of 70%. Three fungi (*Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* and *Didymella glomerata*) were consistently isolated from the pieces planted in the culture medium and inoculation was carried out following two methods, by sprinkling and injection of conidia. With a Neubauer chamber, suspensions were prepared at a concentration of 2×10^3 , 3×10^3 and 6×10^3 conidia mL^{-1} for each of the three fungi isolated. Manual sprinklers, previously disinfected with a 1.5% hypochlorite solution, were used to apply the suspension, along with a sterilized hypodermic syringe, on cladodes previously washed three times with sterilized distilled water. The inoculated treatments consisted of *C. cladosporioides* at 6×10^3 conidia mL^{-1} ; *A. hesperidica*, 6×10^3 conidia mL^{-1} ; *D. glomerata*, 6×10^3 conidia mL^{-1} ; *C. cladosporioides*, 3×10^3 conidia mL^{-1} + *A. hesperidica*, 3×10^3 conidia mL^{-1} ; *C. cladosporioides*, 3×10^3 conidia mL^{-1} + *D. glomerata*, 3×10^3 conidia mL^{-1} ; *A. hesperidica*, 3×10^3 conidia mL^{-1} + *D. glomerata*, 3×10^3 conidia; *C. cladosporioides*, 2×10^3 conidia mL^{-1} + *A. hesperidica*, 2×10^3 conidia mL^{-1} + *D. glomerata*, 2×10^3 conidia mL^{-1} ; sterilized distilled water.

The injection method consisted in injecting 1 mL of each treatment subepidermally, whereas for sprinkling, 4 mL of inoculant were sprinkled on both sides of the cladode. Each treatment consisted of three repetitions (three cladodes) with a completely random design. The experiment was carried out twice. The inoculated cladodes were kept in a

tos inoculados fueron: *C. cladosporioides* a 6×10^3 conidios mL^{-1} ; *A. hesperidica* 6×10^3 conidios mL^{-1} ; *D. glomerata* 6×10^3 conidios mL^{-1} ; *C. cladosporioides* 3×10^3 conidios mL^{-1} + *A. hesperidica* 3×10^3 conidios mL^{-1} ; *C. cladosporioides* 3×10^3 conidios mL^{-1} + *D. glomerata* 3×10^3 conidios mL^{-1} ; *A. hesperidica* 3×10^3 conidios mL^{-1} + *D. glomerata* 3×10^3 conidios; *C. cladosporioides* 2×10^3 conidios mL^{-1} + *A. hesperidica* 2×10^3 conidios mL^{-1} + *D. glomerata* 2×10^3 conidios mL^{-1} ; agua destilada estéril.

El método de inyección consistió en inyectar de manera subepidermal 1 mL de cada tratamiento, mientras que para el método de aspersión se asperjaron 4 mL de inóculo por ambas caras del cladodio. Cada tratamiento consistió de tres repeticiones (tres cladodios) con un diseño completamente al azar. El experimento se realizó por duplicado. Los cladodios inoculados se mantuvieron en invernadero en el Colegio de Postgraduados a una temperatura de 24 ± 3 °C y 70% de humedad relativa hasta el desarrollo de síntomas. Los organismos que indujeron los síntomas de costra negra fueron reaisolados para verificar su identidad y cumplir con los Postulados de Koch. De cladodios inoculados con síntomas similares a los observados en campo, se cortaron trozos de tejido de 0.5 cm, se lavaron tres veces con agua destilada esterilizada, se secaron y se sembraron en cajas de Petri con medio PDA natural para ser incubados bajo luz blanca fluorescente continua a 25 ± 2 °C.

En campo, los síntomas causados por la costra negra, se caracterizaron por el desarrollo de manchas de 1 a 4 cm de diámetro, inicialmente de color café claro, las cuales con el tiempo se tornan de color café oscuro a negro, de consistencia húmeda y delimitada por tejido muerto de color claro. Cuando las manchas coalescieron, se desarrollaron áreas de gran tamaño que abarcaron, en algunos casos, hasta el 70% de la superficie de la cara de un clado-

greenhouse in the Colegio de Postgraduados at a temperature of 24 ± 3 °C and a relative humidity of 70% until symptoms developed. The organisms that induced the black scab symptoms were re-isolated to verify their identity and comply with Koch's postulates. Pieces of 0.5cm in size were cut from the cladodes inoculated with symptoms similar to those observed on the field, they were washed three times with sterilized distilled water, dried, planted in Petri dishes with a natural PDA medium, and incubated under continuous white fluorescent light at 25 ± 2 °C.

On the field, the symptoms caused by black scab were characterized by the development of spots, 1 to 4 cm in diameter, initially light brown in color and which turn dark brown to black in time, with a moist consistency and surrounded by dead light brown tissue. When the spots coalesced, large areas developed which, in some cases, covered up to 70% of the surface of the face of a cladode. The lesions only affected the cuticle and epidermis, but not any internal tissues (collenchyma, chlorenchyma, storage parenchyma cells, vascular system and medulla). In advanced stages, the affected part detaches and falls to the ground, and this causes deformities and damages in the superficial photosynthetic area.

Out of the total of isolations obtained from symptoms of the black scab, three fungus species were identified and morphologically characterized: 1) *Cladosporium cladosporioides* developed maroon-olive green cultures on the front, and almost black on the reverse; mainly immersed mycelia, but also aerial mycelia; lone conidiophora, cylindrical, pale to maroon-olive green in color, micronematous, smooth, occasionally warty, arising terminally from ascending hyphae and not branched, or occasionally branched, one of the top septa slightly darkened, where ramoconidia are formed; conidia in long, branched chains that

dio. Las lesiones únicamente afectaron a la cutícula y epidermis sin afectar a los tejidos internos (colénquima, clorénquima, células del parénquima de almacenamiento, sistema vascular y médula). En estados avanzados, la parte afectada se desprende y cae al suelo, esto provoca deformaciones y daños en el área superficial fotosintética.

Del total de aislamientos obtenidos de síntomas de la costra negra, se identificaron y caracterizaron morfológicamente tres especies de hongos: 1) *Cladosporium cladosporioides* desarrolló colonias de color marrón-olivo por el frente y casi negras por el reverso; micelio inmerso principalmente, pero también aéreo; conidióforos solitarios, cilíndricos, de color pálido a marrón olivo, micronematosos, lisos, ocasionalmente verrugosos, surgiendo terminalmente de hifas ascendentes y no ramificados u ocasionalmente ramificados, uno de los septos superiores ligeramente oscurecido, donde se formaron los ramoconidios; conidios en cadenas largas y ramificadas que se desarticulan fácilmente, en su mayoría aseptados, elípticos a limoniformes, pálidos a marrón olivo y lisos, de $3.0\text{-}5.5 \times 2.5\text{-}3.0 \mu\text{m}$, estas características fueron consistentes con las reportadas por Bensch *et al.* (2010), Bensch *et al.* (2012) y Nam *et al.* (2015). 2) *Aplosporella hesperidica* formó colonia con micelio ligeramente elevado, con hifas aéreas blancas en la superficie, extendiéndose desde el centro, anverso de la colonia de color blanco. Conidiomata de $398 \times 516 \mu\text{m}$, semi-inmerso, erumpente, uniloculado, en grupos, globoso, marrón oscuro. Conidióforos reducidos a células conidiogénicas. Células conidiogénicas hialinas, holoblásticas, oblongas o cilíndricas a ampuliformes. Conidios $18 \times 12 \mu\text{m}$, de color marrón, aseptados, elipsoides a ovalados. Las características corresponden con las reportadas para esta especie por Mapook *et al.* (2020). 3) En *Didymella glomerata*, las colonias inicialmente fueron de color blanco, posteriormente se tornaron de color

disarticulate easily, mostly unseptated, elliptical to lemon-shaped, pale to maroon-olive green and smooth, sized $3.0\text{-}5.5 \times 2.5\text{-}3.0 \mu\text{m}$, these characteristics were consistent with reports by Bensch *et al.* (2010), Bensch *et al.* (2012) and Nam *et al.* (2015). 2) *Aplosporella hesperidica* showed culture with slightly elevated mycelia, with white aerial hyphae on the surface, extending from the center, obverse of the white culture. Conidiomata, sized $398 \times 516 \mu\text{m}$, semi-immersed, eruptive, uniloculate, in groups, globose, dark maroon. Conidiophores reduced to conidiogenic cells. Conidiogenic hyalin cells, holoblastic, oblong or cylindrical to bulbous. Conidia sized $18 \times 12 \mu\text{m}$, maroon, septated, ellipsoidal to oval. Characteristics correspond to those reported for this species by Mapook *et al.* (2020). 3) In *Didymella glomerata*, cultures were initially white in color but later became olive green to dark maroon in color. Conidia, developed in ostiolate pycnidia, ellipsoid, unicellular, hyaline, sized $5.0 \times 3.0 \mu\text{m}$. Pycnidia, dark brown in color, sized $70 \times 90 \mu\text{m}$. These morphological characteristics coincided with reports by Boerema (1993), Chen *et al.* (2015) and Pan *et al.* (2018).

Symptoms began appearing in the cacti 50 d after inoculation. The only cladodes with symptoms were those inoculated with the method of conidia injection and with the combination of all three fungi, namely *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* and *D. glomerata*. Neither the cladodes inoculated with one and the combination of two fungi nor the control presented any symptoms. These began with the appearance of light brown lesions, 2 to 6 mm in diameter (Figure 1A). For the next two weeks, the lesions acquired a dark brown to black color, and were surrounded by dead, light colored tissue (Figure 1B and C); these symptoms corresponded to those observed on the field in the municipality of San Juan Ixcaquixtla, Puebla. The reisolations

verde olivo a marrón oscuro. Conidios, desarrollados en picnidios ostiolados, de forma elipsoide, unicelulares, hialinos, de $5.0 \times 3.0 \mu\text{m}$. Picnidios de color café oscuro, de $70 \times 90 \mu\text{m}$. Estas características morfológicas coincidieron con lo reportado por Boerema (1993), Chen *et al.* (2015) y Pan *et al.* (2018).

En las plantas de nopal inoculadas, la aparición de síntomas se inició a los 50 d después de la inoculación. Los cladodios que presentaron síntomas fueron únicamente aquellos inoculados mediante el método de inyección de conidios y mediante la combinación de los tres hongos, es decir, *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata*. Los cladodios inoculados con uno y la combinación de dos hongos, así como el testigo no presentaron síntomas. Los síntomas iniciaron con la aparición de lesiones de color café claro de 2 a 6 mm de diámetro (Figura 1A). Durante las siguientes dos semanas, las lesiones adquirieron un color de café oscuro a negro y delimitadas con tejido muerto de color claro (Figura 1B y C); estos síntomas correspondieron a los observados en campo en el municipio de San Juan Ixcaquixtla, Puebla. Los reaislamientos obtenidos de plantas inoculadas coincidieron con las características culturales y morfológicas de los aislamientos de plantas colectadas en campo, demostrándose así que *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata* son los agentes causales de la costra negra en cladodios de nopal.

Cladosporium cladosporioides es el agente causal de la necrosis floral, pudrición y caída de frutos juveniles del papayo (*Carica papaya*) en México (Vásquez *et al.*, 2012); la mancha de hollín en mandarina (*Citrus reticulata*) en Japón (Tashiro *et al.*, 2013) y la pudrición del fruto en zapote mante (*Pouteria campechiana*) en México (Nabor-Romero *et al.*, 2018). Por otra parte, *A. hesperidica* ha sido reportado como saprófito en ramas muertas de *Citrus aurantium* en India (Rao, 1969) y en ta-

obtained from inoculated plants coincided with the cultural and morphological characteristics of the isolations of plants gathered from the field, thus showing that *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* and *D. glomerata* are the causal agents of black scab in prickly pear cladodes.

Cladosporium cladosporioides is the causal agent of floral necrosis, rotting and loss of young fruits in papaya tree (*Carica papaya*) in Mexico (Vásquez *et al.*, 2012); sooty mold in tangerines (*Citrus reticulata*) in Japan (Tashiro *et al.*, 2013) and the rotting of fruits in zapote mante (*Pouteria campechiana*) in Mexico (Nabor-Romero *et al.*, 2018). On the other hand, *A. hesperidica* has been reported as a saprophyte in dead *Citrus aurantium* branches in India (Rao, 1969) and dead *Chromolaena odorata* stalks (Mapook *et al.*, 2020), and as a pathogen causing the early rot of the stem of *Citrus sinensis* in Zimbabwe (Yang *et al.*, 2017). Finally, *D. glomerata*, has been reported as a pathogen, causing leaf smut in pistachio (*Pistacia vera*) in the United States (Moral *et al.*, 2018) and black stain on kiwifruit (*Actinidia chinensis*) in China (Pan *et al.*, 2018), showing the impact of these pathogens on different economically important species. No reports have yet been found on the interaction of these three fungi on the development of the disease on prickly pear or on any other host. Only *C. cladosporioides* was reportedly found to infect cladodes in Brazil (Souza *et al.*, 2010). Due to this, according to scientific literature, this is the first report on *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* and *D. glomerata* as causal agents of black scab in cacti in Mexico.

The pathogens that coexist in one same host can affect each other through antagonism or benefit through synergy, and in the latter, different interactions have been reported. In *Pisum sativum*, the development of smut increases with the coinfection of *Mycosphaerella pinodes* and *Phoma*



Figura 1. Pruebas de patogenicidad de *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* y *Didymella glomerata* en nopal (*Opuntia ficus-indica*), en condiciones de invernadero. A) Síntomas iniciales, lesiones de color café claro, B) Desarrollo posterior de síntomas, manchas de color café oscuro a negro y delimitadas con tejido muerto de color claro, C) Cladodio con desarrollo de síntomas, cada lesión pertenece a un punto de inoculación mediante la inyección de conidios.

Figura 1. Pathogenicity tests for *Cladosporium cladosporioides*, *Aplosporella hesperidica* and *Didymella glomerata* on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*), under greenhouse conditions. A) Initial symptoms, light brown lesions, B) Later development of symptoms, light brown to black spots, surrounded by dead light-colored tissue, C) Cladode with symptoms, each lesion represents a point of inoculation with the injection of conidia.

llos muertos de *Chromolaena odorata* (Mapook *et al.*, 2020); y como patógeno causando la pudrición temprana del tallo de *Citrus sinensis* en Zimbabue (Yang *et al.*, 2017). Por último, en el caso de *D. glomerata*, este ha sido reportado como patógeno causando el tizón de la hoja en pistacho (*Pistacia vera*) en Estados Unidos de Norteamérica (Moral *et al.*, 2018) y la mancha negra en kiwi (*Actinidia chinensis*) en China (Pan *et al.*, 2018), evidenciándose el impacto de estos patógenos en diferentes especies

medicaginis var. *pinodella* (Le May *et al.*, 2009); the foliar stain of eucaliptus is caused by numerous species of fungi of the genus *Teratosphaeria* (Crous *et al.*, 2009), and in South Africa, two species -*Teratosphaeria juvenalis* and *T. verrucosa*-coexist on the same leaves, and even on a same stain, causing infection (Crous *et al.*, 2009). In this study, results show that the presence of all three pathogens in the same organ of the plant at the same time leads to the development of the disease and its

de importancia económica. A la fecha no se encontraron reportes de la interacción de estos tres hongos en el desarrollo de enfermedad en nopal ni en algún otro hospedante; únicamente se reporta a *C. cladosporioides* infectando cladodios de nopal en Brasil (Souza *et al.*, 2010). Por lo anterior, de acuerdo a la literatura científica, este es el primer reporte de *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata* como agentes causales de la costra negra en nopal en México.

Los patógenos que coexisten en un mismo hospedante pueden afectarse entre sí a través del antagonismo o beneficiarse con el sinergismo, en este último se han reportado diferentes interacciones, en *Pisum sativum* el desarrollo de tizón se incrementa con la coinfección de *Mycosphaerella pinodes* y *Phoma medicaginis* var. *pinodella* (Le May *et al.*, 2009); la mancha foliar del eucalipto es un complejo causado por numerosas especies de hongos del género *Teratosphaeria* (Crous *et al.*, 2009), en Sudáfrica se presentan dos especies *Teratosphaeria juvenalis* y *T. verrucosa* que coexisten en las mismas hojas e incluso en una misma mancha causando infección (Crous *et al.*, 2009). En este estudio los resultados mostraron que la presencia de los tres patógenos en el mismo órgano de la planta y en el mismo tiempo propicia el desarrollo de la enfermedad y su reproducción. Como ya se mencionó anteriormente, los tres hongos son responsables de causar síntomas similares; es decir pudrición y necrosis, síntomas que también son característicos en la enfermedad de la costra negra del nopal. En subsecuentes trabajos se sugiere evaluar el intervalo de tiempo en la inoculación, con el objetivo de determinar si es indispensable la inoculación simultánea o cuales son los intervalos de tiempo en la cual se mantienen el carácter infectivo de los hongos *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* y *D. glomerata*. Debido a que la costra negra representa una amenaza potencial para la producción de fruta

reproduction. As mentioned earlier, the three fungi cause similar symptoms, that is, rot and necrosis, symptoms that are also typical of the black scab disease in prickly pears. In later works, we suggest an evaluation of the time intervals in inoculation, in order to determine if simultaneous inoculation is crucial or which are the time intervals in which the infectious feature of the fungi *C. cladosporioides*, *A. hesperidica* and *D. glomerata* are maintained. Due to the fact that black scab is a potential threat to the production of prickly pears and nopal, it is necessary to evaluate different control strategies that help develop management plans. In addition, it is worth highlighting the need for complementary molecular studies to corroborate the identity of the causal agents described in this investigation.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

y nopal verdura es necesario evaluar diferentes estrategias de control que permitan el desarrollo de planes de manejo. Asimismo, cabe señalar que es de importancia realizar estudios moleculares complementarios para corroborar la identidad de los agentes causales descritos en esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Ayala-Escobar VB, Yanez-Morales MJ, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. 2006. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. Fungal Diversity 21:1-9. <https://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/21-1.pdf>
- Bensch K, Braun U, Groenewald JZ and Crous PW. 2012. The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology 72:1-401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Bensch K, Groenewald JZ, Dijksterhuis J, Starink-Willemsse M, Andersen B, Sumerell BA, Shin HD, Dugan FM, Schroers HJ, Braun U and Crous PW. 2010. Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides*

- complex (Davidiellaceae, Capnodiales). Studies in Mycology 67(1):1-94. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>
- Boerema GH. 1993. Contributions towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) - II. Section Peyronellaea. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi 15(2):197-221. <https://repository.naturalis.nl/pub/531839>
- Caruso M, Currò S, Las Casas G, La Malfa S and Gentile A. 2010. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *Opuntia ficus indica* cultivated genotypes and their relation with related species. Plant Systematics and Evolution 290: 85-97. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0351-9>
- Chen Q, Jiang JR, Zhang GZ, Cai L and Crous PW. 2015. Resolving the *Phoma* enigma. Studies in Mycology 82:137-217. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2015.10.003>
- Crous PW, Groenewald JZ, Summerell BA, Wingfield BD and Wingfield MJ. 2009. Co-occurring species of Tera-tosphaeria on Eucalyptus. Persoonia 22:38-48. <https://doi.org/10.3767/003158509X424333>
- Flores-Flores R, Velázquez-del Valle MG, León-Rodríguez R, Flores-Moctezuma HE and Hernández-Lauzardo AN. 2013. Identification of Fungal Species Associated with Cladode Spot of Prickly Pear and Their Sensitivity to Chitosan. Journal of Phytopathology 161(7-8): 544-552. <https://doi.org/10.1111/jph.12104>
- Le May C, Potage G, Andrivon D, Tivoli B and Outreman Y. 2009. Plant Disease Complex: Antagonism and Synergism Between Pathogens of the Ascochyta Blight Complex on Pea. Journal of Phytopathology 157: 715-721. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2009.01546.x>
- Mapook A, Hyde KD, McKenzie EHC, Jones EBG, Bhat DJ, Jeewon R, Stadler M, Samarakoon MC, Malaithong M, Tanunchai B, Buscot F, Wubet T and Purahong W. 2020. Taxonomic and phylogenetic contributions to fungi associated with the invasive weed *Chromolaena odorata* (Siam weed). Fungal Diversity 101: 1-175. <https://doi.org/10.1007/s13225-020-00444-8>
- Márquez-Berber SR, Torcuato-Calderón C, Almaguer-Vargas G, Colinas-León MT, Gardezi AK. 2012. El sistema productivo del nopal tunero (*Opuntia albicarpa* y *O. megacantha*) en Axapusco, Estado de México. Problemática y alternativas. Revista Chapingo Serie horticultura 8:81-93. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1027-152X2012000100006&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1027-152X2012000100006&lng=es&tlng=es).
- Moral J, Lichtemberg PSF, Papagelis A, Sherman J and Michailides TJ. 2018. *Didymella glomerata* causing leaf blight on pistachio. European Journal of Plant Pathology 151(4): 1095-1099. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1422-y>
- Nabor-Romero O, Silva-Valenzuela M, Rojas-Martínez RI and Garza-García R. 2018. First report of *Cladosporium cladosporioides*, a fungus that causes rot in zapote mante fruits in Mexico. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2): 356-362. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1712-1>
- Nam MH, Park MS, Kim HS, Kim TI and Kim HG. 2015. *Cladosporium cladosporioides* and *C. tenuissimum* Cause Blossom Blight in Strawberry in Korea. Mycobiology 43(3): 354-359. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.354>
- Pan HMY, Chen L, Deng Z, Wang P, Li L and Zhong CH. 2018. First Report of *Didymella glomerata* Causing Black Spot Disease of Kiwifruit in China. Plant Disease 102(12): 2654. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0583-PDN>
- Quezada-Salinas A, Sandoval-Islas JS, Alvarado-Rosales D y Cárdenas-Soriano E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. Agrociencia 40(5): 641-653. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/496/496>
- Rao VG. 1969. Fungi on Citrus from India. Sydowia 23:215-224. [https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia\\_23\\_0215-0224.pdf](https://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_23_0215-0224.pdf)
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2019. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. (consulta, diciembre de 2020).
- Souza A, Cordeiro L, Araujo E, Lopes E, Souto F. 2010. Ocorrência e identificação dos agentes etiológicos de doenças em palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.) no seminário paraibano. Biotemas 23: 11-20. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2010v23n3p11>
- Swart WJ and Kriel WM. 2002. Pathogens associated with necrosis of cactus pear cladodes in South Africa. Plant Disease 86(6): 693. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.6.693D>
- Tashiro N, Noguchi M, Ide Y and Kuchiki F. 2013. Sooty spot caused by *Cladosporium cladosporioides* in Postharvest Satsuma mandarin grow in heated greenhouses. Journal of General Plant Pathology 79: 158-161. <https://doi.org/10.1007/s10327-013-0430-1>
- Torres-Bojórquez AI, Cervantes-Díaz L, Núñez-Ramírez F, Morales-Maza A y Samaniego-Gómez BY. 2016. Primer reporte de *Pectobacterium* spp. asociada a *Opuntia ficus* en Baja California, México. Idesia 34(4): 69-71. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292016005000015>
- Vásquez-López A, Hernández-Castro E, Mora-Aguilera JA, Nava-Díaz C, Sánchez-García F. 2012. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. Agrociencia 46: 757-767. <https://agrociencia-colpos.mx/index.php/agrociencia/article/view/991/991>
- Yang T, Groenewald JZ, Cheewangkoon R, Jami F, Abdollahzadeh J, Lombard L and Crous PW. 2017. Families, genera, and species of Botryosphaeriales. Fungal Biology 121(4): 322-346. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>