

First report of *Alternaria alternata* causing the golden spot in xoconostle (*Opuntia matudae*) in Hidalgo, México

Primer reporte de *Alternaria alternata* causante de la mancha dorada en xoconostle (*Opuntia matudae*) en Hidalgo, México

David Montiel-Salero, Angélica Jiménez-Aguilar, Susana E. Ramírez-Sánchez, Daniel Ruiz-Juárez, Departamento de Producción Agrícola y Animal¹, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, México; Octavio Guerrero-Andrade, División de Ingeniería en Innovación Agrícola Sustentable, Instituto Tecnológico Superior de Huichapan, El Saucillo sn, Huichapan, 42411, Hidalgo; México; Eva Segundo-Pedraza¹, Javier L. Olivares-Orozco¹, Miguel Ángel Ramos-López, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Cerro de las Campanas S/N, Querétaro 76010, México; Antonio Flores-Macías^{1*}.

*Corresponding author: aflores981@gmail.com

Received: July 29, 2021.

Accepted: December 24, 2021.

Montiel-Salero D, Jiménez-Aguilar A, Ramírez-Sánchez SE, Ruiz-Juárez D, Guerrero-Andrade O, Segundo-Pedraza E, Olivares-Orozco JL, Ramos-López MA and Flores-Macías A. 2022. First report of *Alternaria alternata* causing the golden spot in xoconostle (*Opuntia matudae*) in Hidalgo, México. Mexican Journal of Phytopathology 40(1): 131-144.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2107-3>

First DOI publication: December 31, 2021.

Primera publicación DOI: 31 de Diciembre, 2021.

Abstract. The species *Opuntia ficus-indica* is affected by pests and diseases, one of the most important of these being golden spot. The latter has been reported in various countries, including Mexico. Symptoms similar to those of golden spot in *O. ficus-indica* have been observed in the

Resumen. La especie *Opuntia ficus-indica* es afectado por varias plagas y enfermedades, siendo una de las más importantes la mancha dorada. Ésta ha sido reportada en varios países, incluyendo México. Síntomas similares a los causados por la mancha dorada en *O. ficus-indica* se han observado en el cultivo de xoconostle (*Opuntia matudae* Scheinvar, cv. Rosa). El objetivo de este estudio fue aislar e identificar el agente causal que ocasiona en este cultivo, los síntomas que se asemejan a los de la mancha dorada en *O. ficus-indica*. Se realizó un muestreo (10 parcelas) simple al azar en campo sobre plantas de xoconostle que presentaban los síntomas descritos. Se realizaron cortes de tejido vegetal enfermo y se sembraron en cajas con medio PDA. El cumplimiento de los postulados de Koch demostró que el aislamiento (un aislado) de la especie obtenida de las muestras de campo, colonizó los cladodios después de las inoculaciones

xoconostle crop (*Opuntia matudae* Scheinvar, cv. Rosa). The objective of this study was to isolate and identify the causative agent that causes the symptoms, which resembled those of the disease described as golden spot in *O. ficus-indica*. Simple random sampling in the field (10 plots) was carried out on xoconostle plants that presented the described symptoms. Slices of diseased plant tissue were cut and placed in Petri plates with PDA medium. Compliance with Koch's postulates showed that the isolated (one isolated) of *Alternaria* sp. obtained from the field samples colonized the cladodes after inoculations in the greenhouse. Through taxonomic keys, *Alternaria* sp. was identified as the causative microorganism. Molecular characterization of the isolated *Alternaria* sp. was identified as *Alternaria alternata*. This is the first report worldwide of *Alternaria alternata* as the causal agent of golden spot in a xoconostle crop.

Key words: *Opuntia* spp., cladode, fruiting cladode, chlorotic spots.

The genus *Opuntia* is a natural resource that is used as live fencing and is also cultivated on commercial plantations as a source of fodder and as an edible vegetable for the nutritional value of cladodes and fruits (Griffith, 2004; Defelice, 2004; Sáenz *et al.*, 2006). It is a crop with high demand as a food worldwide, and it is exported to the U.S., Europe and Japan (Flores *et al.*, 2013). Among the species of the genus *Opuntia*, we find a set of wild cultivars generically known as xoconostles or acidic cactus pears, the name deriving from the Náhuatl (xoco = sour and nochtli = prickly pear) (Gallegos-Vázquez *et al.*, 2012). These species are considered of high ecological adaptability and their anatomy and morphology enable them to adapt to conditions of environmental stress, being considered valuable

en el invernadero. Mediante claves taxonómicas, se identificó a *Alternaria* sp. como microorganismo causante. La caracterización molecular del aislado de *Alternaria* sp. fue identificado como *Alternaria alternata*. Este es el primer reporte a nivel mundial de *A. alternata* como el agente causante de golden spot en el cultivo de xoconostle.

Palabras clave: *Opuntia* spp., cladodio, fruto del cladodio, manchas cloróticas.

El género *Opuntia* es un recurso natural que se usa como cercado vivo, también se siembra en campos comerciales como fuente de forraje y como verdura comestible por el valor nutricional de sus cladidos y frutas (Griffith, 2004; Defelice, 2004; Sáenz *et al.*, 2006). Es un cultivo con alta demanda a nivel mundial y se exporta a EE.UU., Europa y Japón (Flores *et al.*, 2013). Entre las especies del género *Opuntia* se encuentran un conjunto de cultivares silvestres genéricamente conocidos como xoconostles o tunas ácidas, cuyo nombre proviene del náhuatl (*xoco* = agrio y *nochtli* = tuna) (Gallegos-Vázquez *et al.*, 2012). Estas especies son consideradas de alta adaptabilidad ecológica y, su anatomía y morfología les permite adaptarse a condiciones de estrés ambiental, siendo considerados alimentos vegetales valiosos en América Latina. Los cultivares del xoconostle poseen una cantidad importante de fibra y compuestos antioxidantes tales como ácido ascórbico, mientras que las semillas son fuente de fibra, fenoles, flavonoides, ácidos grasos poliinsaturados y tocoferoles (especialmente γ -tocoferol), que le proporcionan buena capacidad antioxidante (Morales *et al.*, 2012), así como compuestos bioactivos de alta calidad que se podrían incorporar en formulaciones alimenticias funcionales (Morales *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2015). Esto hace de la planta un cultivo ideal en zonas donde el desarrollo

vegetable foods in Latin America. Xoconostle cultivars possess an appreciable amount of soluble fiber and antioxidant compounds such as ascorbic acid, while the seeds are a source of fiber, phenolics, flavonoids, polyunsaturated fatty acids, and tocopherols (especially γ -tocopherol), which provide good antioxidant capacity (Morales *et al.*, 2012), as well as high-quality bioactive compounds that could be incorporated into functional food formulation (Morales *et al.*, 2014; Morales *et al.*, 2015). This renders the plant an ideal crop in zones where the growth of other species-of-agricultural-interest is a challenge (Sáenz *et al.*, 2006).

In common with *O. ficus-indica* and *O. monacantha*, the xoconostle species also present phytosanitary problems caused by different microorganisms that affect the quality and yield of the crop (Rodríguez *et al.*, 2001; Choueiri *et al.*, 2005). Among the most common of these problems in *Opuntia* we find golden spot (Quezada *et al.*, 2006), necrosis of the cladode (Swart and Kriel 2002), and golden spot produced by *Alternaria alternata* (Granata and Sidoti, 1997; Swart and Kriel, 2002). The symptoms of the latter disease have been described as an infection that begins in the areoles of the cladode, near the site of penetration, where a slight bump appears, with the tissue changing color from the original dark to light green until becoming golden (Méndez *et al.*, 2008).

Similar symptomatology to that of golden spots in *O. ficus-indica* has recently been observed on both faces of the cladodes of xoconostle (Personal observation). However, to our knowledge, there have been no reports of this disease in xoconostle. Therefore, the aim of this study was to perform a comparative analysis of the disease symptomatology in xoconostle with those reported in other *Opuntia* species and to identify the microorganism that cause this symptomatology.

de otras especies de interés agrícola representa un desafío (Sáenz *et al.*, 2006).

Al igual que con *O. ficus-indica* y *O. monacantha*, la especie del xoconostle también presentan problemas fitosanitarios causados por diferentes microorganismos que afectan la calidad y el rendimiento del cultivo (Rodríguez *et al.*, 2001; Choueiri *et al.*, 2005). Entre los problemas más comunes de este tipo en *Opuntia* se encuentran la mancha dorada (Quezada *et al.*, 2006), necrosis del cladodio (Swart y Kriel 2002), y la mancha dorada producida por *A. alternata* (Granata y Sidoti, 1997; Swart y Kriel, 2002). Los síntomas de esta última enfermedad han sido descritos como una infección que comienza en las areolas del cladodio, cerca del sitio de penetración, donde aparece una ligera protuberancia, en la que el tejido cambia de color de un verde oscuro original a un verde claro hasta volverse dorado (Méndez *et al.*, 2008).

Una sintomatología similar a la mancha dorada en *O. ficus-indica* ha sido observado recientemente en ambos lados del cladodio del xoconostle (observación personal). Sin embargo, no conocemos reportes de esta enfermedad en el xoconostle. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue realizar un análisis comparativo de la sintomatología de la enfermedad en xoconostle con aquellas reportadas en otras especies de *Opuntia* e identificar al microorganismo que causa esta sintomatología.

El estudio se llevó a cabo durante los años 2017-2018 en Chapantongo (2017-2018) en Hidalgo, México (20° 17' N y 99° 24' O, a 2,120 metros sobre el nivel del mar) en un área agrícola establecida en suelos tipo Phaeozem y Vertisol. El clima es templado-subhúmedo con una precipitación anual promedio de 550 mm y una temperatura anual promedio de 18 °C. Los sitios de estudio presentan una inclinación de 7% norte-sur (INEGI, 2009); los sitios fueron previamente ocupados por pastizales y

The study was conducted during the years 2017-2018 in Chapantongo (2017-2018) in Hidalgo, Mexico (20° 17' N and 99° 24' W, at 2,120 meters above sea level) in an agricultural area established in Phaeozem and Vertisol soil types. The climate is temperate-subhumid with an annual average precipitation of 550 mm and an average annual temperature of 18 °C. The study sites feature a north-south slope of 7% (INEGI, 2009), the sites were previously occupied by pastureland, and present an arable layer of up to 20 cm in depth.

Field sampling. Simple random sampling was performed from a field crop established in 10 plots on one-hectare with 13 rows containing 1,250 *O. matudae* cv. Rosa plants. A total of 200 plants were sampled with symptoms that resembled those of the disease described as golden spot in *O. ficus-indica* were found. Of these, 100 samples were randomly selected for isolation and purification of the pathogen causing the disease. The symptoms on the cladodes of the infected plants of *O. ficus-indica* are chlorotic spots around the spines. The spots develop into round and prominent golden yellow scabs, then the center necrotized leaving a yellowish halo. The disease caused by *A. alternata* in *O. ficus-indica* is also seen on the fruits, which often presents the same symptoms observed on the pads (Granata and Sidoti, 1997). Cladodes of *O. matudae* cv. Rosa plants presenting symptoms of the disease were collected, wrapped in sterile paper, and stored at 4 °C until their analysis. Plant samples were identified and deposited in the culture collection in the Laboratory of Phytopathology of the Xochimilco Metropolitan Autonomous University.

Isolation and purification of fungus. The plant material was washed with potable water and 2 cm² of tissue were disinfected during 3 min with a solution

presentan una capa arable con una profundidad de hasta 20 cm.

Muestreo en campo. Un muestreo aleatorio simple se llevó a cabo en un campo establecido en 10 parcelas que ocupaban una hectárea de superficie, con 13 hileras que contenían 1,250 plantas de *O. matudae* cv. Rosa. Un total de 200 plantas fueron muestreadas con síntomas que se asemejaban a los de la enfermedad descrita como mancha dorada en *O. ficus-indica*. De estas, 100 muestras fueron seleccionadas al azar para realizar el aislamiento y la purificación del patógeno causante de la enfermedad. Los síntomas de los cladidos de las plantas infectadas de *O. ficus-indica* son manchas cloróticas alrededor de las espinas. Las manchas se desarrollan hasta convertirse en costras redondas de color amarillo dorado, luego el centro se necrotiza dejando un halo amarillento. La enfermedad causada por *A. alternata* en *O. ficus-indica* también se observa en las frutas, que con frecuencia presenta los mismos síntomas que se observan en los cladidos (Granata y Sidoti, 1997). Cladidos de plantas de *O. matudae* cv. Rosa con síntomas de la enfermedad fueron recolectados, envueltos en papel estéril y almacenados a 4 °C hasta su análisis. Se identificaron muestras de plantas y se depositaron en la colección de cultivos del Laboratorio de Fitopatología de la Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco.

Aislamiento y purificación de hongos. El material vegetal se lavó con agua potable y se desinfectaron 2 cm² de tejido durante 3 min con una solución de 5% de hipoclorito de sodio y 50% de alcohol. Después de enjuagarse tres veces con agua destilada estéril, fueron colocados sobre papel estéril para retirar el exceso de agua y después se colocaron fragmentos de 0.5 cm² en cincuenta cajas con Papa Dextrosa Agar (PDA) y otros cincuenta con Agua y

of 5% of sodium hypochlorite and 50% alcohol. After washed three times with sterile distilled water they were placed on sterile paper to remove residual water, and then 0.5 cm² fragments were placed onto fifty plates containing Potato Dextrose Agar (PDA) and fifty containing Water Agar (WA). They were randomly placed and incubated at 28 ± 2 °C for five days. The fungi were identified using specific keys (Simmons, 2008). The same amount was used during purification.

The strains identified as *Alternaria* sp. were isolated with the hyphal tip technique in WA media and PDA and incubated at 28 ± 2 °C until sporulation was confirmed. The spores were collected, placed in an Eppendorf tube with 1 mL of Tween 20 solution (0.5%), and then stirred for 1 min. The samples were centrifuged for 30 s and then the supernatant was removed. Sterile distilled water was added to resuspend the spores. From this spore suspension 10⁻⁴ dilutions were prepared, 0.5 mL was placed on PDA and WA plates, and were incubated at 28 ± 2 °C. After 24 h a fragment of the culture medium containing germinated spores was cut out and placed on PDA and WA plates and incubated at 28 ± 2 °C until sporulation (Montiel *et al.*, 2016). Fragments of monosporic cultures in Rose Bengal Agar culture media, Czapek Dox-agar and Sabouraud Agar plates were incubated at 28 ± 2 °C for 24 h. The spores were identified morphologically with taxonomic keys (Simmons, 2008).

Morphological and molecular identification.

A fragment of two pure *Alternaria* colony were placed in PDA medium and incubated at 28 °C until maximum development; the mycelium developed was macerated with liquid nitrogen until a fine powder was obtained. From this colony genomic DNA extraction was performed with 0.5 g of powdered mycelium (Shure *et al.*, 1983),

Agar (WA). Fueron colocados de manera aleatoria e incubados a 28 ± 2 °C por cinco días. Los hongos fueron identificados mediante el uso de claves específicas (Simmons, 2008). Las mismas cantidades se usaron para la purificación.

Las cepas identificadas como *Alternaria* sp. se aislaron mediante la técnica de punta de hifa en los medios WA y PDA y se incubaron a 28 ± 2 °C hasta que se confirmó la esporulación. Las esporas se colectaron, y se colocaron en un tubo Eppendorf con 1 mL de solución Tween 20 (0.5%) y se agitaron por 1 min. Las muestras se centrifugaron por 30 s y el sobrenadante se descartó. Se agregó agua estéril destilada para resuspender las esporas. De esta suspensión de esporas se prepararon diluciones al 10⁻⁴, 0.5 mL se colocaron en cajas con PDA y WA y se incubaron a 28 ± 2 °C. Después de 24 h se cortó un fragmento del medio de cultivo con esporas germinadas y se colocó en cajas con PDA y WA y se incubó a 28 ± 2 °C hasta la esporulación (Montiel *et al.*, 2016). Se incubaron fragmentos de cultivos monospóricos en un medio de cultivo Agar Rosa de Bengala, agar modificado Czapek Dox y Agar Sabouraud a 28 ± 2 °C por 24 h. Las esporas se identificaron morfológicamente mediante claves taxonómicas (Simmons, 2008).

Identificación morfológica y molecular. Un fragmento de dos cultivos puros de *Alternaria* se colocaron en un medio PDA y se incubaron a 28 °C hasta alcanzar su desarrollo máximo; el micelio desarrollado se maceró con nitrógeno líquido hasta obtener un fino polvo. A partir de este cultivo se realizó una extracción de ADN genómico con 0.5 g of de micelio en polvo (Shure *et al.*, 1983), se verificó con la técnica de electroforesis en gel de agarosa a 0.8%, se tiñió con bromuro de etidio y la concentración se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop 1000. El ADN fúngico se usó para la amplificación del gen ARN 18S ribosomal.

verification was performed with the technique of electrophoresis in 0.8% agarose gel, stained with ethidium bromide and the concentration was determined with the NanoDrop 1000 spectrophotometer. The fungal DNA extracted was used for the amplification of the ribosomal RNA 18S gene.

The fungal DNA extracted was used for the amplification of the ribosomal RNA 18S gene using the oligonucleotides NS5 / NS6, and the intergenic region ITS1 (ITS5 / ITS2) and ITS2 (ITS5 / ITS4) of the genes that encode for ribosomal RNAs 18S, 5.8S and 28S, respectively (White *et al.*, 1990). The amplification of the fragments (ITS1 was a length of 234 bp and ITS2 was a length of 565 bp) was done with the PCR technique (30 μ L of a reaction mixture: JumpStart™ Reaction mix 2x, 50 ng of fungal gDNA and 10 pM μ L⁻¹ of oligonucleotides). The mixture was placed in the TC-5000 Techne® thermal cycler according to the program (denaturalization at 94 °C, 160/35 s, 35 cycles; alignment at 55 °C, 35 cycles; extension at 72 °C, 45 s, 35 cycles and final extension at 72 °C, 300 s 35 cycles) (White *et al.*, 1990). The PCR products were separated by electrophoresis in agarose gel at 0.8% and purified with the Sigma® GenElute Gel extraction kit. The purified PCR products were bound in pGEM T-Easy vector (Promega), transformed into competent cells of *Escherichia coli* strain DH5 α , re-sowed in liquid medium LB with ampicillin, incubated at 37 °C with constant movement during 24 h. From the obtained colonies the plasmid DNA was purified with Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit of GE Healthcare and the digestion was done with the restriction enzymes EcoRI and PstI; the digestion was separated by electrophoresis in agarose gel at 0.8% with ethidium bromide, photo-documented on the BIO-RAD Fluor-S® Max Multi Imager and quantified on the NanoDrop 1000

El ADN fúngico extraído se usó para la amplificación del gen ARN 18S ribosomal mediante los oligonucleótidos NS5 / NS6, y la region intergénica ITS1 (ITS5 / ITS2) y ITS2 (ITS5 / ITS4) de los genes que codifican para los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S, respectivamente (White *et al.*, 1990). La amplificación de los fragmentos (ITS1 fue de un largo de 234 bp y ITS2, de 565 bp) se llevó a cabo con la técnica PCR (30 μ L de una mezcla de reacción: JumpStart™ Reaction mix 2x, 50 ng de gADN fúngico y 10 pM μ L⁻¹ de oligonucleótidos). La mezcla se colocó en el termociclador TC-5000 Techne® de acuerdo con el programa (desnaturalización a 94 °C, 160/35 s, 35 cycles; alineamiento a 55 °C, 35 ciclos; extensión a 72 °C, 45 s, 35 ciclos y extensión final a 72 °C, 300 s 35 ciclos) (White *et al.*, 1990). Los productos PCR se separaron por electrophoresis en gel de agarose a 0.8% y se purificaron con el kit de extracción Sigma® GenElute Gel. Los productos de PCR purificados fueron unidos en pGEM T-Easy vector (Promega), transformados en células de *Escherichia coli* cepa DH5 α , re-plantados en medio líquido LB con ampicilina, e incubados a 37 °C con movimiento constante durante 24 h. De los cultivos obtenidos, el ADN plásmido se purificó con Illustra plasmidPrep Mini Spin Kit de GE Healthcare y la digestión se realizó con las enzimas de restricción EcoRI y PstI; la digestión se separó por electroforesis en gel de agarosa a 0.8% con bromuro de etidio, se fotodocumentó en el BIO-RAD Fluor-S® Max Multi Imager y se cuantificó en el espectrofotómetro NanoDrop 1000. Las secuencias se llevaron a cabo en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se editaron mediante FinchTV y fueron identificadas como Altal-ITS1 y Altal-ITS2. Para determinar sus especies se usó la herramienta BLAST de la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) database

spectrophotometer. The sequences were performed in the DNA Synthesis and Sequencing Unit of the Biotechnology Institute of UNAM. The obtained sequences were edited on FinchTV and identified as Altal-ITS1 and Altal-ITS2. To determine their species, the BLAST tool was used in the National Center Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). To determine the sequence identity of the Altal-ITS1 and Altal-ITS2 (234 and 565 bp respectively), the isolates used were *Alternaria alternata* isolate wxm90 (GenBank: HM051066.1); *Alternaria* sp. ZH7-C2 (GenBank: FJ037737.1); Uncultured fungus clone AA45-2 (GenBank: GU065589.1); *Septoria lycopersici* isolate NW574B (GenBank: EU520171.1); *Alternaria* sp. ALT3 (GenBank: HM114272.1); *Alternaria alternata* strain KHF-5 (GenBank: MN173818.1); *Alternaria alternata* isolate Altal-ITS1 (GenBank: MW092952.1); Altal-ITS2 (GenBank: MW092953); *Alternaria* sp. JM-1 (GenBank: GQ389617.1); *Alternaria azukiae* strain wxm133 (GenBank: HM037984.1); *Alternaria alternata* (GenBank: LC269969.1) and *Alternaria alternata* isolate R1-1 (GenBank: FJ827039.1). The Altal-ITS1 and Altal-ITS2 sequence was aligned with the previous sequences and the phylogenetic tree was constructed using Unipro UGENE v. 41.0 (Okonechnikov *et al.*, 2012).

Pathogenicity test. Field evaluation was carried out under greenhouse conditions, in which mature cladodes of xoconostle (*O. matudae* cv. Rosa) were obtained from healthy plants. Prior to performing the seeding, twenty cladodes were washed with sterilized water and disinfected with a solution of 5% sodium hypochlorite; these cladodes were left in the shade during 20 days for scarring of the cut. Later, they were established in 35 x 35 cm plastic bags filled with a mixture of tezontle (volcanic

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Para determinar la identidad de la secuencia de Altal-ITS1 y de Altal-ITS2 (234 y 565 bp respectivamente), los aislados usados fueron *Alternaria alternata* aislado wxm90 (GenBank: HM051066.1); *Alternaria* sp. ZH7-C2 (GenBank: FJ037737.1); Clon fúngico no-cultivado AA45-2 (GenBank: GU065589.1); *Septoria lycopersici* aislado NW574B (GenBank: EU520171.1); *Alternaria* sp. ALT3 (GenBank: HM114272.1); *Alternaria alternata* cepa KHF-5 (GenBank: MN173818.1); *Alternaria alternata* aislado Altal-ITS1 (GenBank: MW092952.1); Altal-ITS2 (GenBank: MW092953); *Alternaria* sp. JM-1 (GenBank: GQ389617.1); *Alternaria azukiae* cepa wxm133 (GenBank: HM037984.1); *Alternaria alternata* (GenBank: LC269969.1) y *Alternaria alternata* isolate R1-1 (GenBank: FJ827039.1). Las secuencias de Altal-ITS1 y Altal-ITS2 se alinearon con las secuencias previas y se contruyó un árbol filogenético mediante el uso de Unipro UGENE v. 41.0 (Okonechnikov *et al.*, 2012).

Prueba de patogenicidad. Se realizó una evaluación de campo bajo condiciones de invernadero, en la que se utilizaron cladodios maduros de xoconostle (*O. matudae* cv. Rosa) de plantas sanas. Antes de realizar la siembra, se lavaron 20 cladodios con agua esterilizada y se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 5%. Estos cladodios se dejaron a la sombra durante 20 días para dejar cicatrizar los cortes. Luego, se sembraron en bolsas de plástico de 35 x 35 cm llenas con una mezcla de tezontle (piedra volcánica) y arena de sílice (2:1).

Antes de la inoculación llevada a cabo en el invernadero, se realizó la activación de un aislado de forma separada en matraces de 250 mL con un medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Después de 8 días de incubación a 28 ± 2 °C, se agregaron a cada matraz 20 mL adicionales de Tween 80 a 0.05%, y éstos se colocaron bajo agitación orbital

rock) and silica sand (2:1).

Prior to the inoculation carried out at the greenhouse, activation of one isolated was performed separately in 250 mL flasks in Potato Dextrose Agar (PDA) culture medium. After 8 days of incubation at 28 ± 2 °C, an additional 20 mL of Tween 80 at 0.05%, was added to each flask and these were placed under orbital shaking during 1 min. The solution obtained from the shaking was passed through a Whatman #40 filter and the filtrate was diluted with 130 mL sterile water, which was applied to the cladodes of the xococonostle plants. The cladodes inoculated by aspersion of 13 mL of a solution and a control (water) were constituted in the treatments. Each treatment had 10 repetitions (cladodes) distributed in an arrangement completely at random. Every 15 days, observations were performed in the search for the appearance of symptoms similar to those of golden spot, noting the treatment and the number of plants in cases in which the symptoms appeared. In case of the appearance of the symptomatology similar to those of golden spot 0.5 cm² fragments of the cladodes were disinfected in the 2% sodium hypochlorite solution and seeded onto PDA plates and incubated at 28 ± 2 °C. After 8 days of growth, the colonies were identified morphologically with taxonomic keys (Simmons, 2008).

Statistical analysis. Data were submitted to tests of normality (Shapiro-Wilk W test) and homoscedasticity (Levene). Kruskal-Wallis Analysis of Variance (ANOVA) and means comparison (Steel-Dwass) tests were used when the supposed normality could not be corrected using transformations. ANOVA and the Tukey test ($p < 0.05$) were used to separate treatments. Data analysis and processing was carried out with JMP® ver. 11 statistical software packages (SAS, 2012).

durante 1 min. La solución obtenida de la agitación se pasó a través de un filtro Whatman #40 y el filtrado se diluyó con 130 mL de agua estéril, la cual se aplicó a los cladodios de las plantas de xococonostle. Los cladodios inoculados por aspersion con 13 mL de una solución y un control (agua) fueron los dos tratamientos evaluados. Cada tratamiento constó de 10 repeticiones (cladodios) distribuidos en un arreglo completamente al azar. Cada 15 días se realizaban observaciones en busca de síntomas similares a los de la mancha dorada, anotando el tratamiento y el número de plantas cuando aparecían síntomas. En el caso de aparecer la sintomatología similar a la de la mancha dorada, se desinfectaban fragmentos de 0.5 cm² de los cladodios en la solución de hipoclorito de sodio al 2%, se sembraban en cajas con PDA y se incubaban a 28 ± 2 °C. Después de 8 días de crecimiento, los cultivos se identificaron morfológicamente con claves taxonómicas (Simmons, 2008).

Análisis estadístico. A los datos se les realizó una prueba de normalidad (prueba Shapiro-Wilk W) y de homocedasticidad (Levene). Se recurrió a las pruebas de Análisis de Varianza Kruskal-Wallis (ANDEVA) y comparación de medias (Steel-Dwass) cuando la supuesta normalidad no pudo ser corregida usando transformaciones. Se usaron las pruebas ANOVA y de Tukey ($p < 0.05$) para separar tratamientos. El análisis y el procesamiento de datos se desarrollaron con los paquetes de software estadísticos JMP® ver. 11 (SAS, 2012).

Muestreo en campo. La presencia de síntomas se observó en 100% de las plantas muestreadas del cultivo de xococonostle. La enfermedad se presentaba, por lo general, en el borde superior del cladodio previo al cladodio en fructificación (Figura 1A, B). Esta comienza en los cladodios como puntos

Field Sampling. The presence of symptoms was observed in 100% sampled plants of the xoconostle crop. The disease presented generally in the cladode on the upper edge or on that prior to fruiting cladode (Figure 1A, B). This begins in the cladodes as points of yellow color or spot chlorosis that often presented near the areoles (Figures 1C, D), similar to those caused by *A. alternata* and reported by Granata and Sidoti (1997) on cactus pear, and these evolved until they formed a golden spot and necrosis on the epidermis (Figures 1E, F). Subsequently, these acquired the appearance of burns as a result of the fusion of the spots, with elevation of the cuticle, dehydration of the tissue, and crusting. Similar symptomatology has been reported for *Opuntia ficus* (Swart and Kriel, 2002; Granata and Sidoti, 1997). The symptoms found in

amarillos o manchas cloróticas que normalmente se presentan cerca de las areolas (Figuras 1C, D), similares a las causadas por *A. alternata* y reportadas por Granata y Sidoti (1997) en tuna y que evolucionaron hasta formar una mancha dorada y necrosis en la epidermis (Figuras 1E, F). Más adelante, adquirieron la apariencia de quemaduras como resultado de la fusión de las manchas, con la elevación de la cutícula, deshidratación del tejido y formación de una costra. Una sintomatología similar ha sido reportada en *O. ficus-indica* (Swart y Kriel, 2002; Granata y Sidoti, 1997). Los síntomas hallados en la planta del xoconostle en este estudio no correspondían con los descritos por Ammar *et al.* (2004) y Flores *et al.* (2013) producidos por *Botryodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata* y *Fusarium solani* en cladodios y pudrición de frutas del tunar,

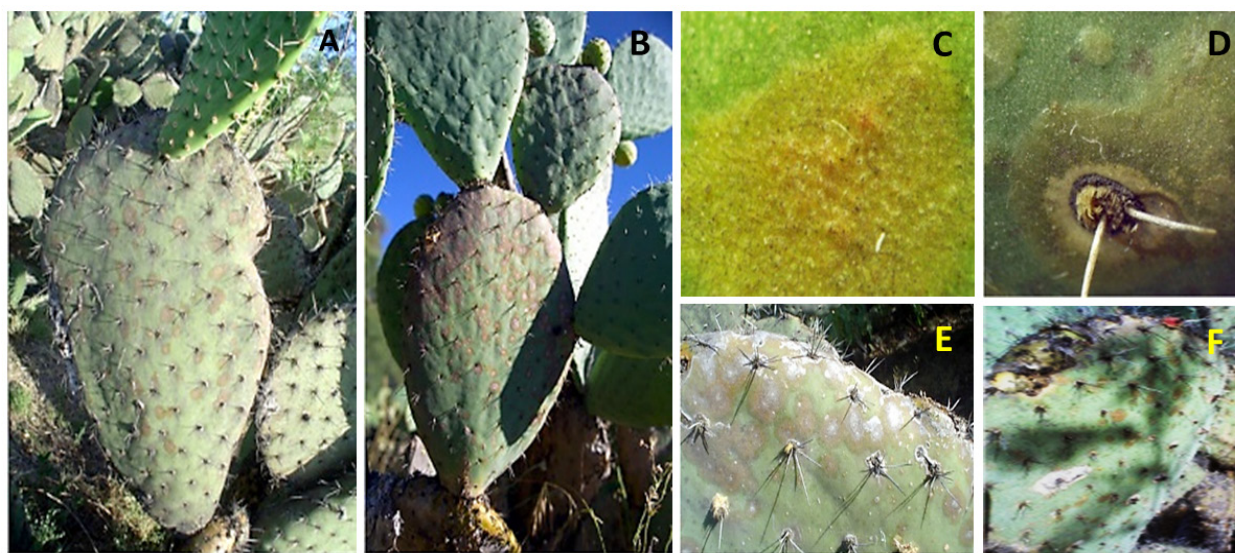


Figure 1. Expression of golden spot in *Opuntia matudae*, var. Rosa in plants sampled in the field. The symptomatology generally presented on the upper edge of cladode (A); and on that prior to fruiting cladode (B); golden spot on the epithelial tissue (C); presence of golden spot in the areole and thickening of the epithelial tissue (D); thickening of the tissue caused by fusion of the golden spots, mainly on the upper edge of the cladode (E) and concentric lesion in cladode tissue and necrosis on the epidermis (F).

Figura 1. Expresión de mancha dorada en *Opuntia matudae*, var. Rosa en plantas muestreadas en el campo. La sintomatología por lo general se presentaba en la orilla superior del cladodio (A); y en el previo al cladodio en fructificación (B); mancha dorada en el tejido epitelial (C); presencia de mancha dorada en la areola y el engrosamiento del tejido epitelial (D); engrosamiento del tejido causado por la fusión de las manchas doradas, principalmente en el borde superior del cladodio (E) y lesiones concéntricas en tejido del cladodio y necrosis en la epidermis (F).

the xoconostle plant in this study did not correspond to those described by Ammar *et al.* (2004) and Flores *et al.* (2013) produced by *Botryodiplodia theobromae*, *Alternaria alternata* and *Fusarium solani* on cladodes and fruit rots of prickly pear cactus, nor to those described by Méndez *et al.* (2008) for golden spot caused by *Alternaria* sp., *Hansfordia* sp., *Ascochyta* sp. in *O. ficus-indica*. These authors state that the damage presents in the fruiting cladode and that it affects the entire area of the cladode in this species, unlike in the xoconostle, where the damage is observed in the cladode prior to the apical cladode and that does not present in the fruits (Figure 1A, B).

The lesions reported by Swart and Kriel (2002) for golden spot in the cladodes of *O. ficus-indica* present a similar pattern, since these authors describe chlorosis around the spines, which was observed in our study; however, the presence of exudates in the lesions, reported by Ammar *et al.* (2004), was not found.

Morphological and molecular identification.

Purification allowed for the elimination of saprophytic organisms. From a 100 samples *A. alternata* was identified in 100% of the incubated plates. The distinctive feature of the colony in PDA culture medium was greenish-grey plush, concentric with whitish rim, dark brown plate underside. The conidiophores were 3 to 6 μm thick and 50 μm long on average. The conidia were generally short in chains of 3 to 5 conidia, secondary conidiophores were also observed, short, straight, ovoid, with short cylindrical beak, 7-25 μm long, 5-12 μm wide, olive colored, with 3 transverse septa and 2 longitudinal septa. According to McKenzie (2013), the morphology corresponds to *A. alternata* (Figure 2C-D).

The Altal-ITS1 (length of 234 bp NCBI Access num: MW092952) and Altal-ITS2

ni con los descritos por Méndez *et al.* (2008) para la mancha dorada causada por *Alternaria* sp., *Hansfordia* sp., *Ascochyta* sp. en *O. ficus-indica*. Estos autores exponen que el daño se presenta en el cladodio en fructificación y que afecta al área completa del cladodio en esta especie, a diferencia del xoconostle, donde el daño se observó en el cladodio previo al cladodio apical y no se presenta en las fructificaciones (Figura 1A, B).

Las lesiones reportadas por Swart y Kriel (2002) para la mancha dorada en los cladodios de *O. ficus-indica* presentan un patrón similar, ya que estos autores registran la presencia de clorosis alrededor de las espinas, lo cual se observó en el presente estudio. Sin embargo, la presencia de exudados en las lesiones reportada por Ammar *et al.* (2004), no fue encontrada.

Identificación morfológica y molecular. La purificación permitió la eliminación de organismos saprofitos. De 100 muestras, se indentificó a *A. alternata* en 100% de las cajas incubadas. La característica distintiva del cultivo en el medio de cultivo PDA fue una capa color gris verdoso concéntrica con un borde blanquecino y un color café oscuro en el fondo de la caja. Los conidióforos median de 3 a 6 μm de grosor y un promedio de 50 μm de largo. Los conidios eran cortos, por lo general, con cadenas de 3 a 5 conidios. También se observaron conidióforos secundarios cortos, rectos, ovoides, con un pico corto y cilíndrico de 7-25 μm de largo, 5-12 μm de ancho, color olivo, con 3 septas transversales y 2 longitudinales. De acuerdo con McKenzie (2013), la morfología corresponde a la de *A. alternata* (Figura 2C-D).

La secuencia de Altal-ITS1 (234 bp de largo Número de accession NCBI: MW092952) y Altal-ITS2 (largo de 565 bp Número de accession NCBI: MW092953) presentó un porcentaje de homología (98%). Los lineamientos de la base de datos de

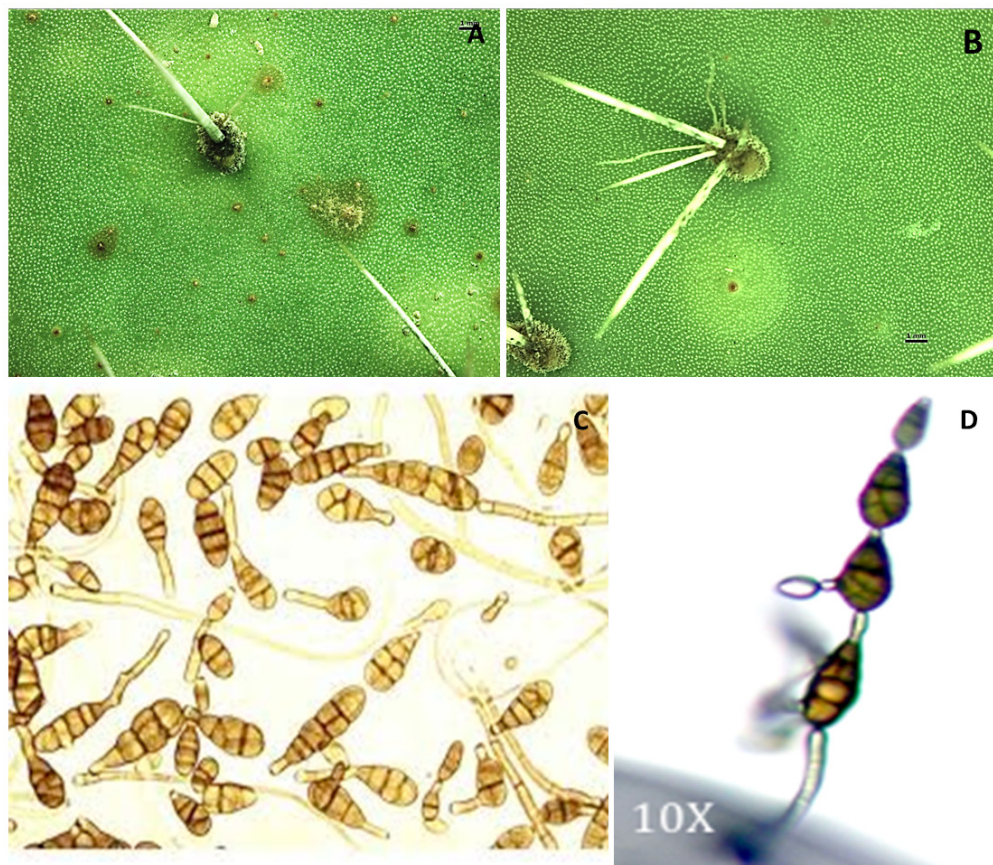


Figure 2. Symptoms caused by the inoculation of *Alternaria alternata* in cladodes of xocoostle under greenhouse conditions: without the presence of the chlorotic halo (A); with the presence of the chlorotic halo (B); *A. alternata* colony sporulation pattern in short (C); branched chain in the second conidium (D).

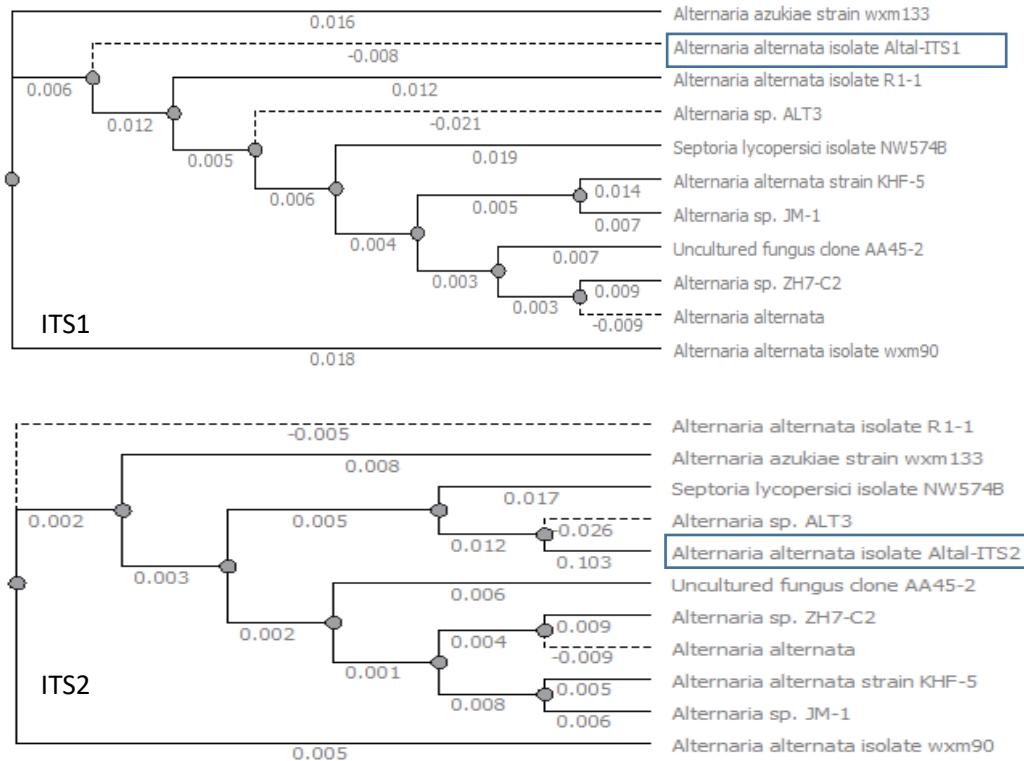
Figura 2. Síntomas causados por la inoculación de *Alternaria alternata* en cladodios de xocoostle en condiciones de invernadero: sin la presencia del halo clorótico (A); con la presencia del halo clorótico (B); patrón de esporulación del cultivo de *Alternaria alternata* en cadenas cortas (C); cadenas de conidios (D).

sequence (length of 565 bp NCBI Acces num: MW092953) showed a homology percentage (98%). According to alignments in the National Center Biotechnology Information database and the previous morphological characterization, allowed the identification of *Alternaria alternata* (Figure 3).

Greenhouse experiment. Ten months after inoculation carried out at the greenhouse, the appearance of symptoms similar to those caused by

National Center Biotechnology Information y la caracterización morfológica previamente descrita, permitieron la identificación de *Alternaria alternata* (Figura 3).

Experimento en invernadero. Diez meses después de la inoculación realizada en el invernadero comenzó la aparición de síntomas similares a los causados por la mancha dorada en *O. ficus-indica*. Una diferencia significativa ($P \leq 0.05$) se observó entre los tratamientos evaluados, y se encontró que



**Figure 3. Phylogenetic tree construction comparing the Altal-ITS1 and Altal-ITS2 amplified regions in *Alternaria alternata*.
 Figura 3. Construcción del árbol filogenético comparando las regiones amplificadas Altal-ITS1 y Altal-ITS2 en *Alternaria alternata*.**

golden spot in *O. ficus-indica* began. A significant difference ($P \leq 0.05$) was observed among the treatments evaluated, finding that those in which the solution containing the strain, were those that presented experimental units with symptomatology, while the control treatment did not present these. In cladodes inoculated with solution containing the isolated were identified areas in brown color with a diameter of between 1 and 5 mm and an elevation of the tissue; but chlorotic halos were not registered (Figure 2A). However, there were also cladodes in which the chlorotic halo was present (Figure 2B). The microorganisms identified from the isolates corresponded to *Alternaria alternata*, observing the presence of their conidia in the spines of the cladodes.

aquellos en que se aplicó la solución conteniendo los aislados, fueron los que presentaron la sintomatología, mientras que el tratamiento control no la presentó. En cladodios inoculados con la solución con el aislamiento se identificaron áreas en color café con un diámetro de entre 1 y 5 mm y una elevación del tejido, pero los halos cloróticos no se registraron (Figura 2A). Sin embargo, también hubo cladodios en los que el halo clorótico estaba presente (Figura 2B). Los microorganismos identificados a partir de los aislamientos correspondieron con *Alternaria alternata*, observando la presencia de sus conidios en las espigas de los cladodios.

Observaciones morfológicas permitieron identificar a *Alternaria alternata* como el agente causal de la mancha dorada en *O. matudae* y los síntomas

Morphological observations allowed to identify *A. alternata* as the causal agent of the Golden spot in *O. matudae* and the symptoms are similar to that of the golden spot in *O. ficus-indica*. The molecular characterizations of the Altal-ITS1 and Altal-ITS2 isolation coincided with the *A. alternata* species. More research is needed to investigate the effect of the integrated management and specially of fungicides on the growth of the pathogenic fungi *A. alternata* in xoconostle.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the Secretaría de Educación Pública (SEP) through the Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) with Project no. 34411246 “Rescate y Evaluación de Especies Endémicas de Interés Agrícola”, and the Department of Agricultural and Animal Production of the Autonomous Metropolitan University, Xochimilco Unit, with the Project denominated “Determinación Morfológica y Molecular del Agente causal del Mal del Oro en Xoconostles” DCBS.CD.447.12.

LITERATURE CITE

- Ammar MI, Shltout AM and Kamhawy M. 2004. Cladode and fruit rots of prickly pear (*Opuntia ficus-indica* L. Mill.). Egyptian Journal of phytopathology 32:119-128.
- Choueiri E, Massad R, Jreijiri F, Danet JL, Salar P, Bové J and Foissac X. 2005. First report of a 16SrII group phytoplasma associated with shoot proliferation of a cactus (*Opuntia monacantha*) in Lebanon. Plant Disease 89:1129. <https://doi.org/10.1094/pd-89-1129b>
- Defelice MS. 2004. Prickly pear cactus, *Opuntia* spp. A spine-tingling tale. Weed Technology 18:869-877. <https://doi.org/10.1614/wt-04-134>
- Flores FR, Velázquez VMG, León RR, Flores MHE and Hernández LAN. 2013. Identification of fungal species associated with cladode spot of prickly pear and their sensitivity to chitosan. Journal of Phytopathology 161:544-552. <https://doi.org/10.1111/jph.12104>
- Gallegos-Vázquez C, Scheinvar L, Núñez-Colín C and Mondragón-Jacobo C. 2012. Morphological diversity of xoconostles (*Opuntia* spp.) or acidic cactus pears: a Mexican contribution to functional foods. Fruits 67(2):4-20. <https://doi.org/10.1051/fruits/2012001>

son similares a los de la mancha dorada en *O. ficus-indica*. Las caracterizaciones moleculares de los aislamientos Altal-ITS1 y Altal-ITS2 coincidieron con la especie de *Alternaria alternata*. Se requiere de más investigación para conocer el efecto del manejo integrado de productos y sobre todo de fungicidas en el crecimiento del hongo patógeno *A. alternata* en xoconostle.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue financiado por la Secretaría de Educación Pública (SEP) a través del Programa de Mejoramiento al Profesorado (PROMEP) con el proyecto 34411246 “Rescate y Evaluación de Especies Endémicas de Interés Agrícola” y el Departamento de Producción Agrícola y Animal of the Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, con el proyecto denominado “Determinación Morfológica y Molecular del Agente causal del Mal del Oro en Xoconostles” DCBS.CD.447.12.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Granata G and Sidoti A. 1997. Appearance of *Alternaria* golden spot on cactus pear in Italy. Acta Horticulture 438:129-130. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1997.438.16>
- Griffith MP. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. American Journal of Botany 91:1915-1921. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1915>
- INEGI. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Chapantongo, Hidalgo. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/13/13017.pdf>
- McKenzie, E. 2013. *Alternaria alternata* (*Alternaria alternata*). PaDIL <https://www.padil.gov.au/maf-border/pest/main/142985/50820>
- Méndez GSJ, Talavera MD and García HEJ. 2008. Identificación y control de las enfermedades más comunes en el nopal. Revista de Salud Pública y Nutrición 14:105-113. <http://respyn2.uanl.mx/especiales/2008/ee-14-2008/documentos/05.pdf>
- Montiel SD, Ruíz JD, Olivares OJL and Segundo PE. 2016. Guía práctica para el diagnóstico de microorganismos de interés agrícola. CBS 50. UAM. México. 60 p.

- Morales P, Barros L, Ramírez ME, Santos BC and Ferreira ICFR. 2015. Xoconostle fruit (*Opuntia matudae* Scheinvar cv. rosa) by-products as potential functional ingredients. *Food Chemistry* 185:289-297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.012>
- Morales P, Barros L, Ramírez ME, Santos BC and Ferreira ICFR. 2014. Exploring xoconostle by-products as sources of bioactive compounds. *Food Research International* 65: 437-444. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.067>
- Morales P, Ramírez ME, Sánchez MMC, Carvalho AM and Ferreira ICFR. 2012. Nutritional and antioxidant properties of pulp and seeds of two xoconostle cultivars (*Opuntia joconostle* F.A.C. Weber ex Diguët and *Opuntia matudae* Scheinvar) of high consumption in Mexico. *Food Research International* 46: 279-285. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.031>
- Quezada A, Sandoval S, Alvarado D and Cárdenas E. 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. *Agrociencia* 40: 641-653. <https://doi.org/10.24275/uami.hm50tr74r>
- Rodríguez AG, Fernández PSP and Landa HL. 2001. First Report of *Pythium aphanidermatum* causing crown and stem rot on *Opuntia ficus-indica*. *Plant Disease* 85:231. <https://doi.org/10.1094/pdis.2001.85.2.231b>
- Sáenz C, Berger H, García JC, Galletti L, Cortázar VG, Higuera I, Mondragón C, Rodríguez FA, Sepúlveda E and Varnero MT. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. *Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO*. FAO Roma, Italia.162p.
- SAS. 2012. Institute, Inc., JMP 10. Basic Analysis and Graphing, Vol. 1.
- Simmons GE. 2008. *Alternaria: An Identification Manual*. The Netherlands [CBS Fungal Diversity Series No. 6.] *Mycological Research* 112(9) 1130. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.06.012>
- Shure M, Wessler S and Fedoroff N. 1983. Molecular identification and isolation of the *Waxy* locus in maize. *Cell* 35 (1): 225-233 [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90225-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90225-8)
- Swart W and Kriel WM. 2002. Pathogens associated with necrosis of cactus pear cladodes in South Africa. *Plant Disease* 86: 693. <https://doi.org/10.1094/pdis.2002.86.6.693d>
- Okonechnikov K, Golosova O and Fursov M. 2012. The UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* 28: 1166-1167. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. Innis, MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. Academic Press, Inc., New York, 315-322 pp. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>