

# Histopatología y patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal

Andrés Quezada Salinas<sup>1</sup>, José Sergio Sandoval Islas<sup>2</sup>  
Dionicio Alvarado Rosales<sup>2</sup>, Magnolia Moreno Velázquez<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Guillermo Pérez Valenzuela 127, Colonia del Carmen, Delegación Coyoacán, CP 04100, Distrito Federal, México. <sup>2</sup> Fitosanidad. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Tezcoco km 36.5, CP 56230, Montecillo, Estado de México, México

## Histopathology and pathogenesis of *Pseudocercospora opuntiae* on prickly pear

**Abstract.** Pathogenesis process of *Pseudocercospora opuntiae*, the causal agent of black spot in prickly pear was described. In histological sections of diseased cladodes was observed mycelium in substomatal cavities and hyphae developing intercellularly in the epidermis, collenchyma and chlorenchyma. At 111 dai, greater amount of mycelia was observed, the hyphae invasion continued intercellularly to the storage parenchyma, vascular bundles and medular parenchyma. After that, at 122 dai plasmolysis in the collenchyma and chlorenchyma and, in the case of chlorenchyma, the disintegration of the chloroplasts were noted; in the substomatal cavity the mycelium was grouped to give rise to the stromatic tissue. Finally, at 129 dai, the mycelium caused plasmolysis of the membrane and cell disintegration in the epidermis, collenchyma and chlorenchyma, the stomatal apparatus (stomatal pore, guard cells and subsidiaries cells) was destroyed and begun the formation of stroma in substomatal cavity, phloem suffered disorganization and disintegration, as well as floematic fibers and the xylem vessels.

**Keywords:** histological sections, plasmolysis, cell disintegration, black spot, conidia.

**Resumen.** Se describe el proceso de patogénesis de *Pseudocercospora opuntiae*, agente causal de la mancha negra del nopal. En cortes histológicos de cladodios enfermos se observó micelio en las cavidades subestomáticas e hifas desarrollándose intercelularmente en la epidermis, colénquima y clorénquima. A los 111 ddi, se presentó mayor cantidad de micelio, la invasión de las hifas se extendió intercelularmente al parénquima de almacenamiento, haces vasculares y parénquima medular. Posteriormente, a 122 ddi se presentó plasmólisis en el colénquima y clorénquima y en el caso de este último se presentó desintegración de los cloroplastos; en las cavidades subestomáticas inició la agrupación de micelio (inicio de la formación de estromas). Finalmente, a 129 ddi, el micelio ocasionó plasmólisis de la membrana y desintegración celular en la epidermis, colénquima y clorénquima, el aparato estomático (poro estomático, células guarda y células subsidiarias) fue destruido y en la cavidad subestomática se observaron estromas, el floema sufrió desorganización y desintegración, al igual que las fibras floemáticas y los vasos del xilema.

**Palabras clave:** cortes histológicos, plasmólisis, desintegración celular, mancha negra, conidios.

Received 24 July 2012; accepted 23 November 2013.

Recibido 24 de julio 2012; aceptado 23 de noviembre 2013.

**Autor para correspondencia:** Andrés Quezada  
andresqs@colpos.mx

## Introducción

La mancha negra del nopal, causada por *Pseudocercospora opuntiae* Ayala-Escobar, Braun & Crous, es una de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo del nopal en Milpa Alta, Distrito Federal y Tlalnepantla, Morelos (Ayala *et al.*, 2006; Quezada *et al.*, 2006). Los síntomas macroscópicos de esta enfermedad se caracterizan principalmente por la presencia de lesiones de color café a negro en los cladodios (Ayala *et al.*, 2006). Estas lesiones inician con la presencia de puntos pequeños de color olivo los cuales aumentan de tamaño cambiando a un color café-oscuro; posteriormente las lesiones presentan un margen de color amarillo y un diámetro de 3 a 4 cm, en estados avanzados la parte afectada se deseca y puede caer al suelo dejando ver perforaciones por las dos caras del cladodio; el tiempo desde la aparición de los primeros síntomas hasta que las lesiones se desecan varía de 25 a 40 días dependiendo del grosor y la edad del cladodio (Quezada *et al.*, 2006).

Estudios detallados sobre la estructura anatómica de los cladodios han sido desarrollados, indicando la morfología y función de los tejidos (Bravo, 1978; Strachtenberg y Mayer, 1982; Gibson y Nobel, 1986; Retamal y Duran, 1987; Osorio, 1989; Goldstein *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2001). Sin embargo, el proceso de patogénesis de *P. opuntiae* que se desencadena una vez que existe el reconocimiento entre patógeno y hospedante es desconocido y, solo existe información limitada sobre la biología del hongo que indica que el período de incubación toma alrededor de 104 días y el desarrollo de síntomas transcurre en 25 días (Quezada *et al.*, 2006).

Los estudios histopatológicos de la interacción patógeno-hospedante son un recurso efectivo para entender el proceso de patogénesis, y recientemente permiten el entendimiento de los mecanismos de resistencia en el hospedante (Araujo y Matsuoka, 2004). Los eventos

asociados con el proceso de infección, colonización y esporulación de *P. opuntiae* en nopal no han sido estudiados, por lo que el presente trabajo tiene como objetivo determinar el proceso de patogénesis del hongo y las alteraciones asociadas a la enfermedad.

## Materiales y métodos

### Aislamiento de *Pseudocercospora opuntiae*

Los aislamientos se realizaron a partir de cladodios que presentaron diferentes grados de avance de la enfermedad mancha negra. De la transición de tejido sano-enfermo, se cortaron secciones de parénquima medular de 0.5 cm<sup>2</sup> y del conjunto cutícula-epidermis-colénquima también de 0.5 cm<sup>2</sup>. Los trozos se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.5% durante 1 minuto, se lavaron con tres cambios de agua destilada estéril y se secaron con papel secante estéril. El medio de cultivo utilizado para la siembra fue agar agua (AA). De cada colonia formada se transfirió una sección de medio con micelio a cajas con medio papa dextrosa agar (PDA). La incubación en ambos casos fue bajo luz blanca continua durante diez días a temperatura de 24 ± 2 °C (condiciones de laboratorio).

### Purificación e identificación de *Pseudocercospora opuntiae*

Las colonias se purificaron a través de cultivos monoconidiales (Burgess *et al.*, 1994), y se identificaron a nivel de género mediante el uso de claves taxonómicas (Barnett and Hunter, 1972; Chupp, 1953), y para especie las referencias de diferentes autores (Ayala *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 1996). Los aislamientos se preservaron en tubos con PDA con aceite mineral estéril.

### Inoculación de *Pseudocercospora opuntiae* en nopal

Material vegetal. Se colectaron cladodios de *Opuntia ficus-*

*indica* Mill variedad Milpa Alta, estos se colocaron en invernadero en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, Méx., donde se plantaron en macetas con suelo estéril, se mantuvieron en observación durante un año para asegurarse de que no estuvieran enfermos. Transcurrido este tiempo, la mayoría de las plantas presentó tres cladodios. La inoculación se realizó en el segundo y tercer cladodio, de 12 y 6 meses de edad respectivamente.

#### **Método de inoculación y concentración de inóculo**

Con la cámara de Neubauer y mediante diluciones se preparó una solución de  $16 \times 10^3$  conidios  $\text{mL}^{-1}$  de *P. opuntiae* obtenidos a través de cultivos monoconidiales, la aplicación de esta solución se realizó con un aspersor manual sobre la superficie de los cladodios. El testigo se asperjó con agua destilada estéril.

#### **Condiciones de incubación**

Las plantas inoculadas se mantuvieron a la intemperie en las instalaciones del Colegio de Postgraduados, en condiciones promedio de temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ), precipitación (mm) y humedad relativa (%) de 15.6, 0.17 y 64.77, respectivamente. Durante los primeros 10 días los cladodios inoculados se cubrieron con bolsas de plástico para aumentar la humedad relativa y propiciar una mayor germinación de los conidios.

#### **Histopatología y patogénesis**

De los cladodios inoculados se eligieron aquellos con diferentes estados de desarrollo de la enfermedad. Para la caracterización del proceso de patogénesis se realizaron cortes de tejido sano y enfermo con dimensiones de  $1 \text{ cm}^2$  y se fijaron en Craff III durante 24 h. Transcurrido el tiempo se lavaron con agua en tres cambios cada 15 min, posteriormente se colocaron en el procesador automático de tejidos TISSUE-TEK (C.O. Sakura Finetechnical mod. 4640-B), ahí los tejidos se pasaron por diferentes concentraciones de alcohol etílico (50, 70, 96 y 100%) y alcohol absoluto-xileno (1:1),

dos cambios en xileno y dos en Paraplast (SIGMA Chemical Co., U.S.A.); en cada solución los tejidos se mantuvieron 4 h. Para la inclusión en parafina los tejidos se retiraron del procesador automático, se colocaron en cubos de papel individuales y se agregó parafina fundida. Una vez sólidos los cubos se montaron en soportes de madera para ser sostenidos en el micrótopo rotatorio American Optical Company (A.O. Company mod. Spencer 820), en donde se obtuvieron cortes transversales de  $10 \mu\text{m}$  de grosor, los cuales se suspendieron en agua con gretina a una temperatura de  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , se montaron en portaobjetos y se secaron a temperatura ambiente.

Para teñir los cortes, se usó la tinción diferencial safranina-verde rápido (Curtis, 1986), eliminándose primeramente la parafina con tres cambios de xileno (3 minutos cada uno), para luego hidratar con una serie gradual de alcohol etílico. La tinción se inició con safranina al 1% (en alcohol etílico al 50%) durante 4 horas, luego se lavaron y deshidrataron en una serie ascendente de alcohol etílico 50, 70 y 96% para poder teñirlos con el verde rápido durante 1 minuto y se pasaron por alcohol en 96 y 100% y 3 cambios de xileno, luego estos se montaron en resina sintética para posteriormente ser observados al microscopio de luz. En total se observaron 500 preparaciones y se tomaron las fotografías con la cámara digital.

## **Resultados**

#### **Histología del cladodio sano**

En cortes transversales de cladodios sanos se observó una cutícula gruesa, de color blanco, hundidos en ella se presentaron los estomas con forma de riñón, muy evidentes debido a su gran tamaño, el aparato estomático estuvo formado por el poro estomático, células guarda y células subsidiarias. Las células guarda fueron alargadas (en forma de media luna), y con núcleo y nucleolo grandes, las subsidiarias

presentaron las mismas características solo que de mayor tamaño (Figura 1A y B). La cavidad subestomática se extendió desde la epidermis hasta el colénquima, su forma fue cilíndrica entre la epidermis y el colénquima, y globosa en el colénquima (Figura 1C).

Por debajo de la cutícula se encontró la epidermis constituida por una a dos capas de células de forma rectangular, con pared gruesa, núcleo grande y citoplasma evidente (Figura 1D).

El siguiente tejido fue colénquima, constituido por cuatro a cinco capas de células que se caracterizaron por presentar una pared gruesa, forma oval-alargada con extremos redondeados y núcleo grande (Figura 1D).

Adyacente al colénquima se localizó el clorénquima, constituido por varias capas de células dispuestas en empalizada, de forma rectangular, con pared delgada y protoplasma abundante. Las células más cercanas al colénquima fueron de menor tamaño, con contornos ondulados y forma cuadrada, en comparación con las más lejanas las cuales fueron de forma rectangular. Los cloroplastos dispuestos hacia la pared de las células y fueron más abundantes en las células cercanas al colénquima (Figura 1D).

Después del clorénquima se observaron grandes células de forma rectangular y pared delgada, las cuales conforman al parénquima de almacenamiento. Entre estas

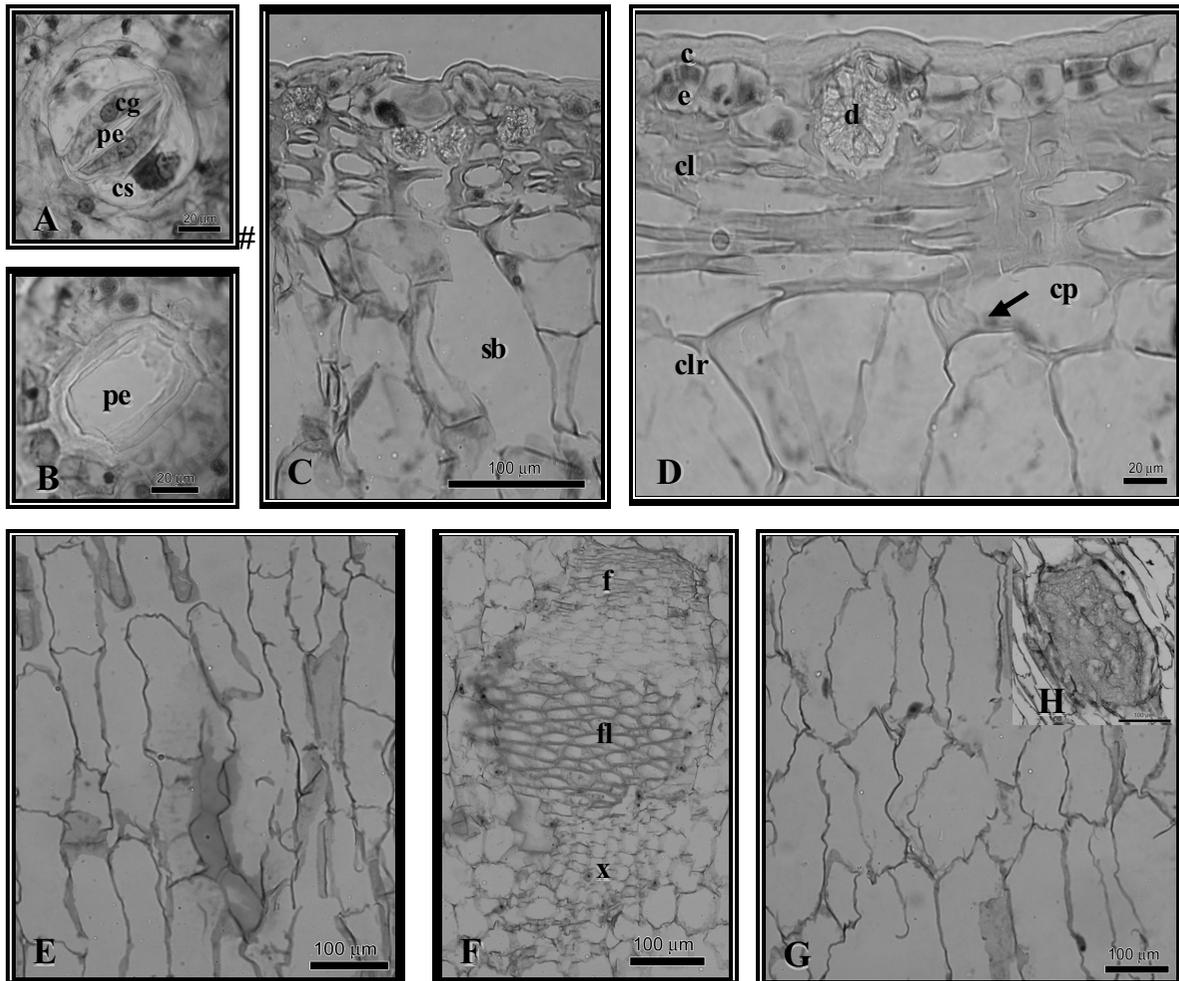


Figura 1. Corte transversal del cladodio sano de *Opuntia ficus-indica* Mill, variedad Milpa Alta. A-C. Complejo estomatal, poro estomático (pe), células guarda (cg), células subsidiarias (cs), cavidad subestomática (sb). D. Cutícula (c), epidermis (e), drusa (d), colénquima (cl), clorénquima (clr) y cloroplastos (cp). E. Células del parénquima de almacenamiento. F. Sistema vascular, floema (f), fibras floemáticas (fl) y xilema (x). G. Células del parénquima medular. H. Célula mucilaginosa.

células se identifican bien los depósitos de mucílago y la presencia de drusas (Figura 1E).

Después del parénquima de almacenamiento, se presentó el sistema vascular constituido por fibras floemáticas, floema y xilema, estos haces vasculares circundan al parénquima medular, formando un cilindro (Figura 1F). Finalmente se observó el parénquima medular, el cual estuvo formado por células grandes de color blanco, de formas poligonales y rectangulares (Figura 1G). Entre las células de la epidermis, clorénquima y tejido medular de los cladodios se encontraron células con cristales de oxalato de

calcio (drusas) (Figura 1D) y tanto en el parénquima de almacenamiento como en el medular se presentaron las células de mucílago, productoras de la comúnmente llamada baba del nopal (Figura 1H).

### Histopatología del material inoculado por aspersión de conidios de *Pseudocercospora opuntiae*

Los síntomas iniciales de la enfermedad se presentaron 104 días después de la inoculación, debido a este largo período de incubación no se pudo determinar la fase de preinfección. Del material enfermo estudiado, se observaron los siguientes

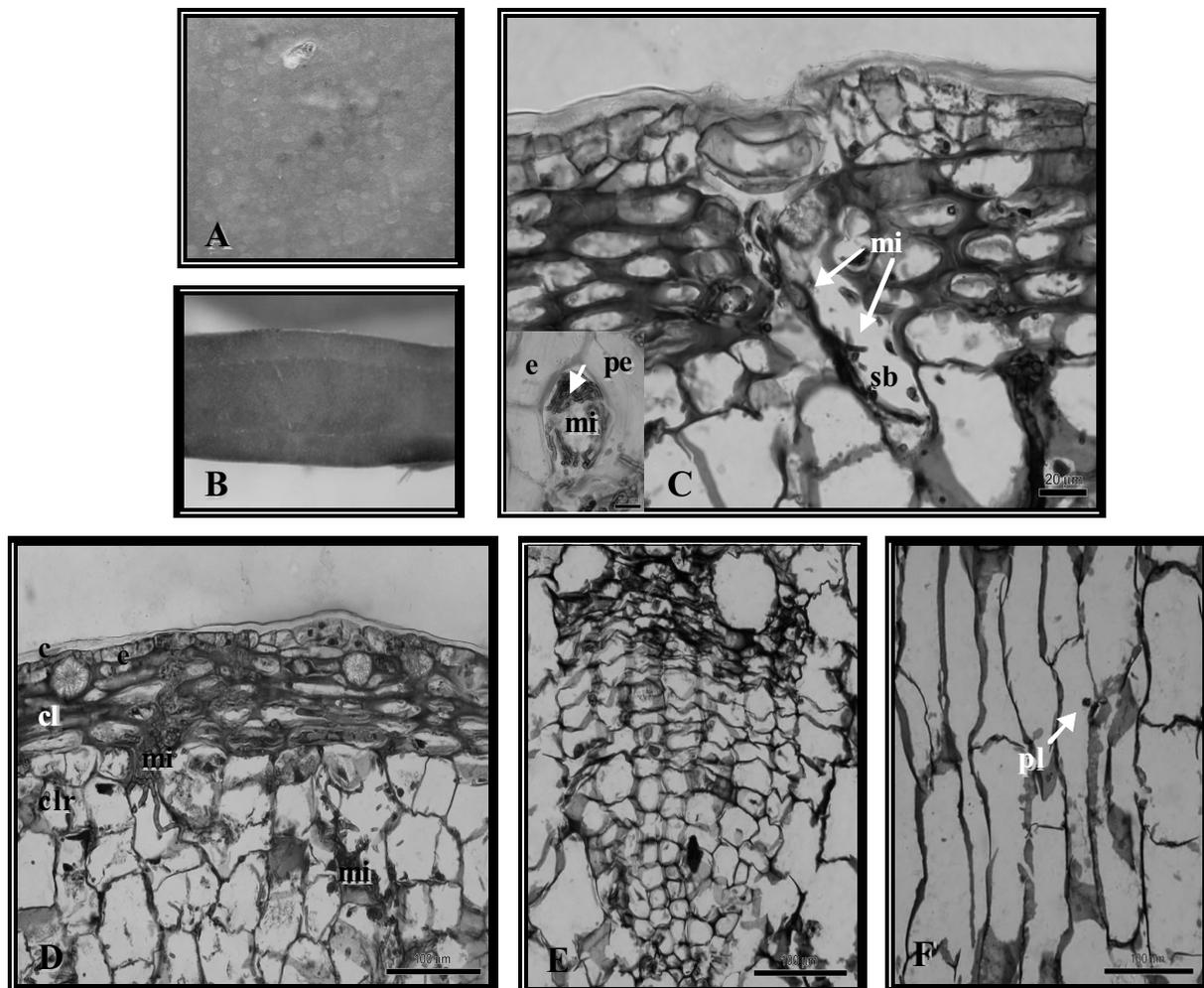


Figura 2. Cladodio de *Opuntia ficus-indica* Mill, variedad Milpa Alta, inoculado con el método de aspersión de conidios de *Pseudocercospora opuntiae*. A. Síntoma 1 (inicial) puntos de color olivo oscuro en las células epidermales. B. Corte transversal aparentemente sano. C. Corte transversal, micelio (mi) penetrando a través del estoma, poro estomático (pe), células de la epidermis (e) y cavidad subestomática (sb). D. Corte transversal, micelio (mi) entre las células de la epidermis (e), colénquima (cl) y clorénquima (clr), producción de polifenoles (pl). E. Corte transversal, haz vascular sin presencia de micelio. F. Corte transversal, parénquima medular sin presencia de micelio.

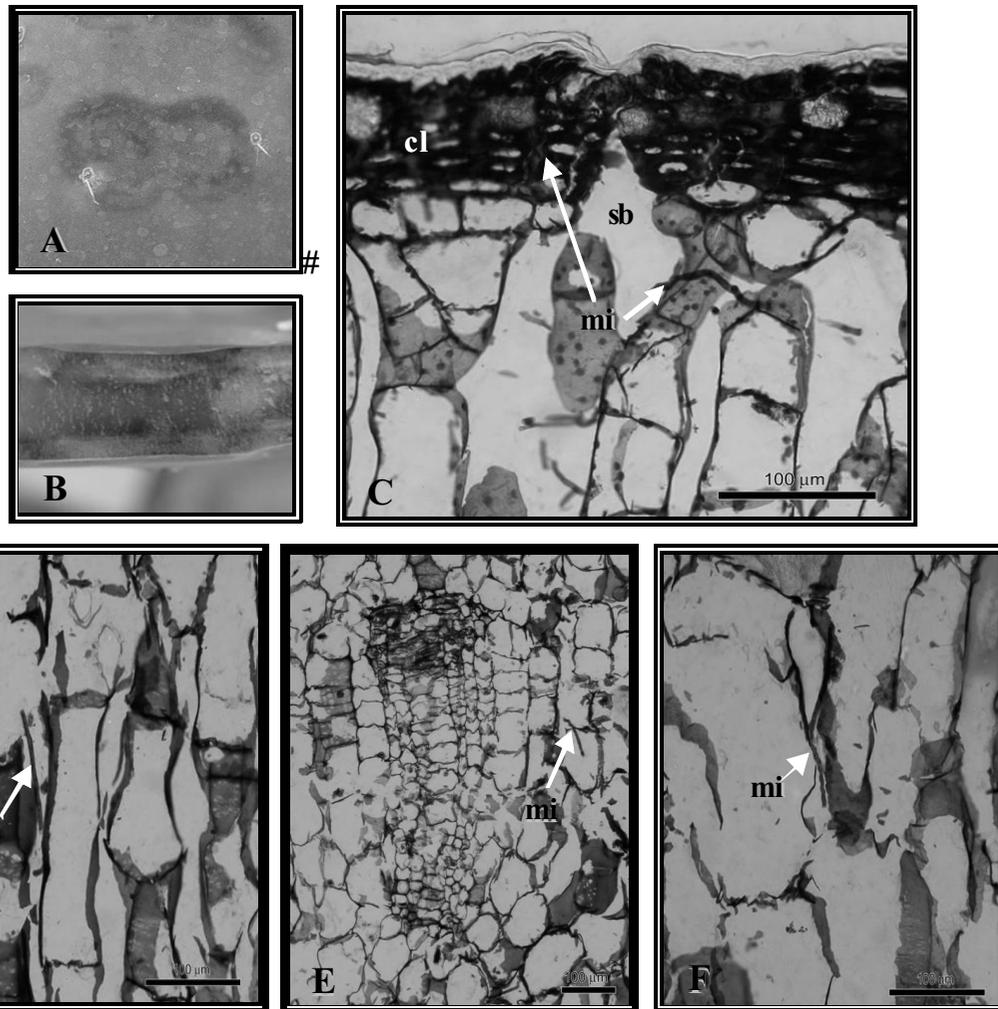


Figura 3. Cladodio de *Opuntia ficus-indica* Mill, variedad Milpa Alta, inoculado con el método de aspersión de conidios de *Pseudocercospora opuntiae*. A. Síntoma 2, manchas de color café claro a rojizas. B. Corte transversal, cambio de color de los tejidos de verde a rojizo, debido a la inducción de polifenoles. C. Micelio (mi), en cavidad subestomatica (sb), colénquima (cl) y clorénquima (clr). D. Micelio intercelular en el parénquima. E. Haz vascular con micelio a su alrededor. F. Parénquima medular y micelio intercelular.

síntomas:

Síntoma 1 (104 días después de la inoculación). Puntos de color olivo oscuro de 3-5 mm de diámetro (Figura 2A y B). Presencia de micelio penetrando en la mayoría de las cavidades estomáticas (Figura 2C); sin embargo, las células guarda y subsidiarias no fueron afectadas. Las hifas se desarrollaron también intercelularmente en la epidermis, colénquima y clorénquima (Figura 2D). En el parénquima de almacenamiento, haces vasculares y parénquima medular, no se observó micelio (Figura 2E y F).

Síntoma 2 (111 días después de la inoculación). Manchas de color café claro a rojizo (Figura 3 A y B). Mayor

cantidad de micelio intercelular en la epidermis, colénquima y clorénquima (Figura 3C). La invasión de las hifas se extendió intercelularmente al parénquima de almacenamiento, haces vasculares y parénquima medular (Figura 3D-F). Aunque la invasión avanzó a tejidos más internos, se conservó la consistencia y unión de los mismos. El cambio de color de los tejidos más cercanos a la cutícula denotó la presencia de polifenoles originados por el aumento en la cantidad de micelio invasor.

Síntoma 3 (122 días después de la inoculación). Manchas de color café-negruzco (Figura 4A y B). El cladodio presentó un color interno negro-rojizo, debido a la gran

producción de polifenoles, los cuales fueron consecuencia de la intensa invasión del micelio colonizador. La cutícula permaneció sin alteraciones, sin embargo, entre las células de la epidermis, colénquima y clorénquima la elevada cantidad de hifas presentes ocasionaron plasmólisis de la membrana y en el caso del clorénquima la desintegración de los cloroplastos. En la cavidad subestomática el micelio comenzó a agruparse para posteriormente dar lugar a los estromas (Figura 4C y D).

El parénquima de almacenamiento fue invadido en mayor medida al igual que el parénquima medular (Figura 4D y F), no se observó plasmólisis de la membrana, pero

sipérida de la forma y tamaño celular, lo que coincidió con el adelgazamiento del cladodio. Por último los haces vasculares fueron rodeados por hifas, el floema y las fibras floemáticas comenzaron a sufrir desorganización principalmente en sus células más cercanas al parénquima (Figura 4E); el xilema a pesar de la cantidad de hifas que lo rodearon permaneció sin alteraciones.

Síntoma 4 (129 días después de la inoculación). Manchas de color negro. La formación de polifenoles siguió aumentando, lo que ocasionó un color negro de los tejidos (Figura 5A y B). El micelio continuó ocasionando plasmólisis de la membrana y desintegración celular en la epidermis,

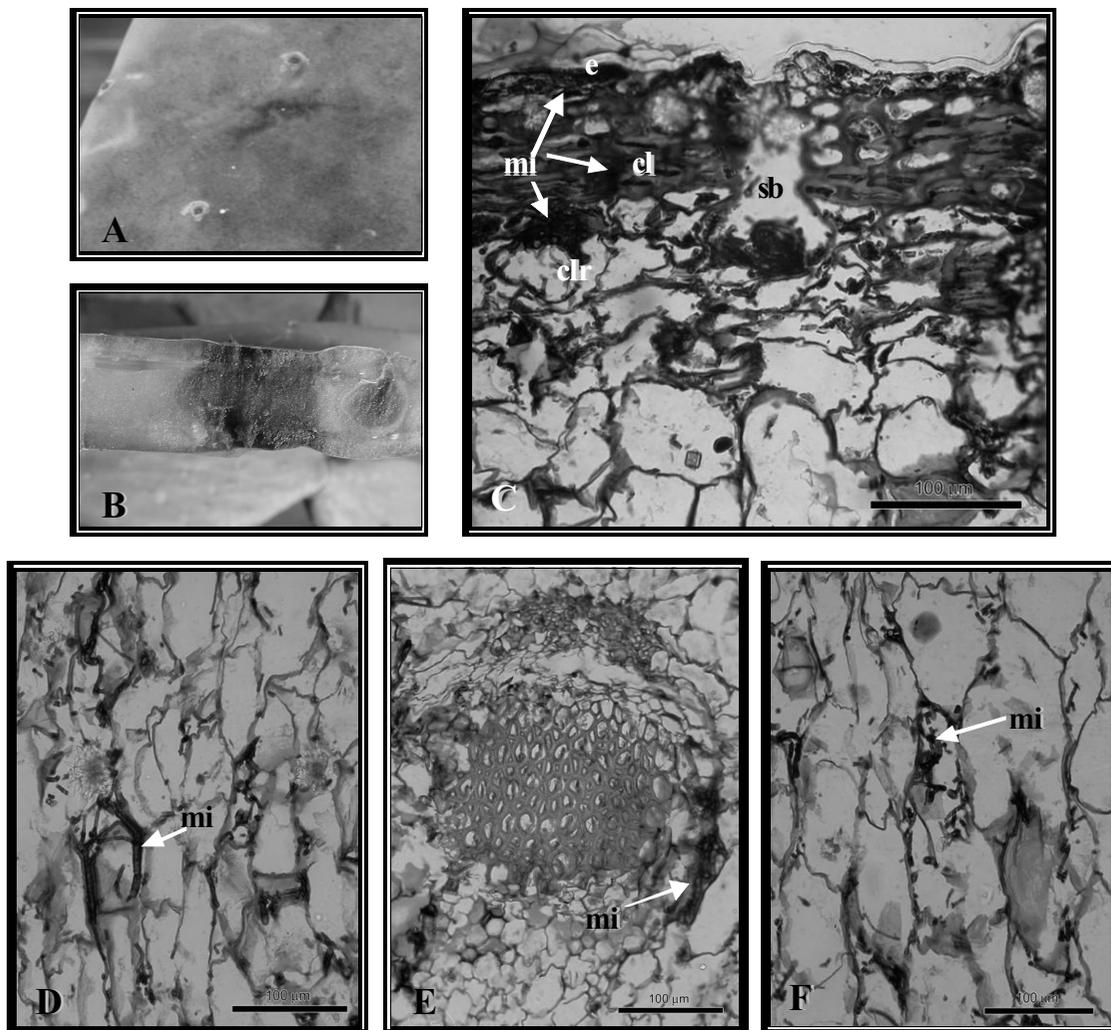


Figura 4. Cladodio de *Opuntia ficus-indica* Mill, variedad Milpa Alta, inoculado con el método de aspersión de conidios de *Pseudocercospora* sp. A. Síntoma 3, manchas de color café negro. B. Corte transversal, necrosis en la epidermis (e), colénquima (cl) y clorénquima (clr). C. Micelio (mi) intercelular en la epidermis, colénquima, clorénquima y agrupación en la cavidad subestomática (sb). D. Mayor cantidad de micelio intercelular en el parénquima de almacenamiento. E. Células del haz vascular siendo invadidas por micelio. F. Parénquima medular mayor cantidad de micelio intercelular.

colénquima y clorénquima, más notable en este último donde se pudieron observar grandes cavidades. El aparato estomático (poro estomático, células guarda y células subsidiarias) fue destruido y la cavidad subestomática invadida por hifas que se agruparon para dar lugar a la formación de estromas (Figura 5C) con espermatogonios (Figura 5D), conidióforos y conidios (Figura 5E).

El parénquima de almacenamiento sufrió

plasmólisis de la membrana celular, la pared se rompió y se desintegró (Figura 5F). El floema sufrió desorganización y desintegración de sus células, lo mismo sucedió con las fibras floemáticas y los vasos del xilema, estos últimos se observaron dispersos entre las células del parénquima (Figura 5G). Las células del parénquima medular aunque conservaron una buena integridad, algunas zonas presentaron plasmólisis y ruptura de la pared celular (Figura 5H).

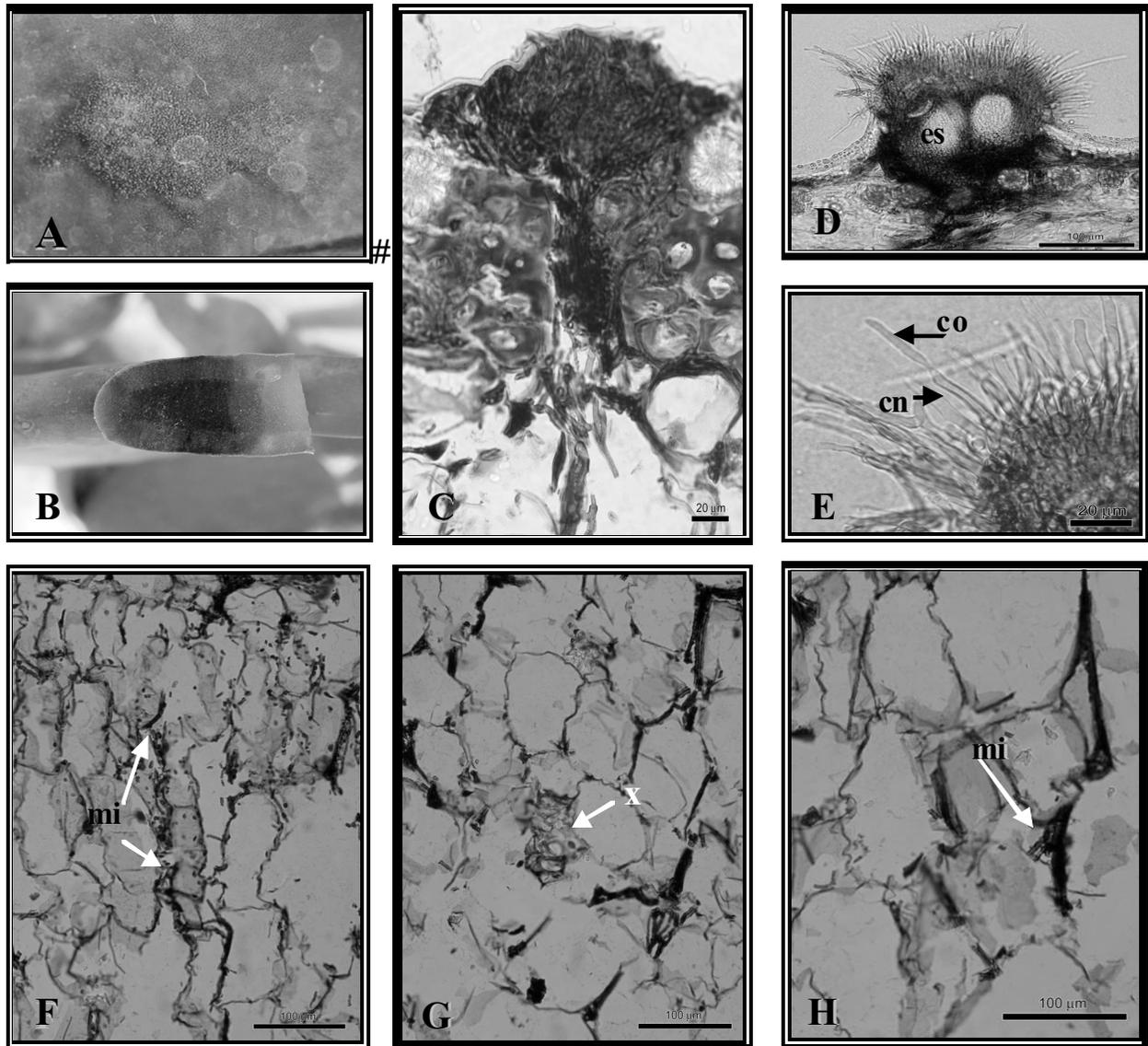


Figura 5. Cladodio de *Opuntia ficus-indica* Mill, variedad Milpa Alta, inoculado con el método de aspersión de conidios de *Pseudocercospora opuntiae*. A. Síntoma 4, manchas de color negro. B. Corte transversal, necrosis total en los tejidos internos. C. Estroma formado de la cavidad subestomática hacia el estoma. D. Formación de espermatogonios (es). E. Conidioforos (cn) y conidios (co). F. Mayor cantidad de micelio (mi), intercelular en el parénquima de almacenamiento, el cual ocasiona plasmólisis de membrana y ruptura de la pared celular. G. Desintegración total del floema y fibras floemáticas, persisten algunos vasos de xilema (x). H. Parénquima medular y micelio (mi) intercelular.

## Discusión

La estructura anatómica de cladodios de nopal verdura (*Opuntia ficus-indica* Mill), variedad Milpa Alta, no difirió en grandes rasgos a lo reportado por Bravo (1978), Stratchtenberg y Mayer (1982), Gibson y Nobel (1986), Retamal y Durán (1987), Osorio (1989), Goldstein *et al.* (1991) y Slva *et al.* (2001). Cabe mencionar que el material utilizado tuvo una edad aproximada de un año lo que explicó algunas diferencias en cuanto al tamaño y forma de algunas células.

Respecto al estudio histopatológico, en este trabajo no fue posible documentar los eventos ocurridos durante el proceso de penetración de *P. opuntiae*; sin embargo, la frecuente observación de micelio en el poro estomático y en la cavidad subestomática sugiere que los estomas son la vía de entrada del patógeno, lo cual coincide con lo reportado para otras especies del mismo género como *P. mori* en hojas de mora (Babu y Kumar, 2002), *P. psophocarpi* en frijol alado (Price y Munro, 1978) y *P. macadamiae* en frutos de macadamia (Miles *et al.*, 2009; Miles *et al.*, 2010).

Durante la colonización, el micelio de *P. opuntiae* invadió los tejidos del cladodio mediante hifas que se desarrollaron de manera intercelular y sin la formación de haustorios, este comportamiento es similar a lo reportado por Miles *et al.* (2009) para el caso de *P. macadamiae* en frutos de macadamia. Asimismo, debido a la gran cantidad de micelio invasivo y a la continua demanda de nutrientes por *P. opuntiae*, en el hospedante se registraron síntomas generalizados correspondientes a plasmólisis celular, colapso de membranas, desorganización de tejidos y muerte de células.

En la etapa de esporulación, los conidios de *P. opuntiae* únicamente se desarrollaron en conidióforos sobre el estroma como en el caso de *P. cocculicola*, *P. kolanensis*

(Singh y Bhalla 2000), *P. juniperi* y *P. exosporioides* (Sutton y Hodges, 1990). Asimismo, los estromas solo se formaron en la cavidad subestomática y errumpieron a través del poro estomático sin causar ruptura de la epidermis.

Cabe señalar que el comportamiento de *P. opuntiae* durante el largo periodo de incubación (104 días) no fue determinado en este estudio; sin embargo, es posible que este hongo permanezca en dormancia después de la penetración como en el caso de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de aguacate (Coates *et al.*, 1993), o coloniza lentamente los tejidos del hospedante en ausencia de síntomas como ha sido observado para *Mycosphaerella citri* sobre hojas de cítricos (Mondal y Timmer, 2006).

## Literatura citada

- Araujo, J.C.A., K. Matsuoka, 2004. Histopatologia da interação *Alternaria solani* em tomateiros resistentes e suscetíveis. *Fitopatologia Brasileira* 29:268–275.
- Ayala, V., M.J. Yáñez, U. Braun, J.Z. Groenewald, P.W. Crous, 2006. *Pseudocercospora opuntiae* sp. nov., the causal organism of cactus leaf spot in Mexico. *Fungal Diversity* 21:1-9.
- Babu, A.M., V. G. Kumar, 2002. Surface ultrastructural studies on the infection process of *Pseudocercospora mori* causing grey leaf spot disease in mulberry. *Mycological Research* 106:938-945.
- Barnett, H.L., B.B. Hunter, 1972. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minneapolis, EEUU, Burgess.
- Burgess, L. W., A. B. Summerell, S. Bullock., P. K. Gott, D. Backhouse, 1994. *Laboratory manual for Fusarium research*. Universidad de Sydney, Australia.
- Bravo, H.H., 1978. *Las cactáceas de México*. Vol. I. Instituto de Biología. UNAM, México.
- Chupp, C., 1953. *A monograph of the fungus genus Cercospora*. The Ronald Press. New York.
- Coates, L.M., I.F. Muirhead, J.A.G. Irwin, D.H. Gowanlock, 1993. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. *Mycological Research* 97:1363-1370.
- Curtis, P.J., 1986. *Microtécnica Vegetal*. Trillas. México.
- Goldstein, G., J. L. Andrade, P. S. Nobel, 1991. Differences in water relations parameters for the chlorenchyma and the parenchyma of *Opuntia ficus indica* under wet versus dry conditions. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 95-107.
- Gibson, A., P. S. Nobel, 1986. *The cactus primer*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Miles, A.K., O.A. Akinsanmi, P.W. Sutherland, E.A.B. Aitken, A. Drenth, 2009. Infection, colonisation and sporulation by *Pseudocercospora macadamiae* on macadamia fruit. *Australasian Plant Pathology* 38:36-43.
- Miles, A.K., O.A. Akinsanmi, P.W. Sutherland, E.A.B. Aitken, A. Drenth, 2010. Infection, colonisation and sporulation by *Pseudocercospora macadamiae* on macadamia fruit.

- Australasian Plant Pathology 38:36-43.
- Mondal, S.N., L.W. Timmer, 2006. Relationship of the severity of citrus greasy spot, caused by *Mycosphaerella citri*, to ascospore dose, epiphytic growth, leaf age, and fungicide timing. Plant Disease 90:220-224.
- Osorio A.F., 1989. Estudio sobre el engrosamiento de cladodios en nopal (*Opuntia* spp.). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Especialidad de Fitopatología. Montecillo, México.
- Price, T.V., P.E. Munro, 1978. *Pseudocercospora psophocarpi* on winged bean in Papua New Guinea. Transactions of the British Mycological Society 70:47-55.
- Quezada, A., J.S. Sandoval, D. Alvarado, E. Cárdenas, 2006. Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) en Tlalnepantla, Morelos, México. Agrociencia 40:641-653.
- Retamal, N., J. M. Duran, 1987. Stomatal distribution in cladodes of prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. Phytomorphology 37:243-248.
- Rao, H. S. G., A. S. Moses, P. N. Singh, 1996. Some new species of *Pseudocercospora* from India. Mycological Research 100:1071-1074.
- Silva, H., E. Acevedo, P. Silva, 2001. Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de *Opuntia* establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile. Revista Chilena de Historia Natural 74:341-351.
- Singh, S.K., K. Bhalla, 2000. New *Pseudocercospora* species causing foliar diseases in plain forests of Vindhya region in India. Indian Phytopathology 53:399-403.
- Strachtenberg, S., A.M. Mayer, 1982. Mucilage cells, calcium oxalate and soluble calcium in *Opuntia ficus-indica*. Annals of Botany 50:549-557.
- Sutton, B.C., C.S. Hodges, 1990. Revision of *Cercospora*-like fungi on *Juniperus* and related conifers. Mycologia 82:313-325.

