

Alternaria tenuissima, A. alternata y Fusarium oxysporum
Hongos Causantes de la Pudrición del Florete de Brócoli
Alternaria tenuissima, A. alternata and Fusarium oxysporum
Fungi Causes of the Rotting of the Floret of Broccoli

María de Lourdes Fraire-Cordero, Daniel Nieto-Ángel, Elizabeth Cárdenas-Soriano, Colegio de Postgraduados, Instituto de Fitosanidad, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230 **Gabriel Gutiérrez-Alonso,** Seminis-Estación Experimental “La Charca”. A 3 kms del kilometro 11 de la carretera Cortazar-Jaral del Progreso, Jaral del Progreso, Guanajuato, CP 38470 **Rafael Bujanos-Muñiz,** INIFAP-Campo Experimental Bajío, Km. 6.5 Carr. Celaya-San Miguel de Allende, Celaya, Guanajuato, CP 38010 y **Humberto Vaquera-Huerta,** Colegio de Postgraduados, Instituto de Socioeconomía, Estadística e Informática, Km. 36.5 Carr. México-Texcoco, Montecillo, Edo. de México, CP 56230. Correspondencia: lfraire@colpos.mx.

(Recibido: Noviembre 20, 2009 Aceptado: Mayo 04, 2010)

Fraire-Cordero María de Lourdes, Nieto-Ángel, Daniel, Cárdenas-Soriano, Elizabeth, Gutiérrez-Alonso, Gabriel, Bujanos-Muñiz, Rafael y Vaquera-Huerta, Humberto. 2010. *Alternaria tenuissima, A. alternata y Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. Revista Mexicana de Fitopatología 28: 25-33.

Fraire-Cordero María de Lourdes, Nieto-Ángel, Daniel, Cárdenas-Soriano, Elizabeth, Gutiérrez-Alonso, Gabriel, Bujanos-Muñiz, Rafael y Vaquera-Huerta, Humberto. 2010. *Alternaria tenuissima, A. alternata and Fusarium oxysporum* fungi causes of the rotting of the floret of broccoli. Revista Mexicana de Fitopatología 28: 25-33.

Resumen. Durante los meses de julio-octubre del 2005 y 2006, se observaron manchas necróticas circulares, café oscuras en floretes de brócoli en Guanajuato, México. Se colectaron floretes de brócoli con síntomas y del tejido sintomático se aislaron *Alternaria tenuissima, A. alternata* y *Fusarium oxysporum*, los cuales fueron identificados morfológica y molecularmente. Las pruebas de patogenicidad mostraron que los tres hongos son agentes causales de la pudrición o manchado del florete de brócoli. Los primeros síntomas se observaron a las 48 h después de la inoculación. *A. tenuissima* y *A. alternata* presentaron manchas necróticas de 1mm en los botones florales y *F. oxysporum* presentó crecimiento superficial. A las 96 h las manchas necróticas causadas por *A. tenuissima* y *A. alternata* eran de 3 cm de diámetro con una textura aguanosa, la necrosis avanzó rápidamente hasta llegar a los tallos próximos a los botones florales y en el caso de *A. alternata* penetró tallos de 2 y 3 cm de diámetro. *Fusarium oxysporum* a las 96 h causó una pudrición gris seca de 3 cm de diámetro en botones y pedicelos con abundante micelio blanquecino el cual se extendió rápidamente, la pudrición incluyó a los tallos próximos a los botones florales.

Abstract. During the months of July-October of 2005 and 2006, circular necrotic spots, dark coffee were observed in florets of broccoli in Guanajuato, Mexico. Florets of broccoli with symptoms were collected and of the symptomatic tissue were isolated *Alternaria tenuissima, A. alternata* and *Fusarium oxysporum*, which were identified morphologically and molecularly. The pathogenicity tests showed that the three fungi are causal agents of the rotting of floret in broccoli. The first symptoms were observed to 48 h after inoculation, *A. tenuissima* and *A. alternata* presented necrotic spots of 1mm in the floral bellboys and *F. oxysporum* presented superficial growth. To 96 h the necrotic spots caused by *A. alternata* y *A. tenuissima* were of 3 cm of diameter with a sodden texture, the necrosis advanced quickly until to arrive at the stems next to the floral bellboys and in the case of *A. alternata* penetrated stems of 2 and 3 cm of diameter. *F. oxysporum* to 96 h caused to a gray rotting of 3 cm of diameter in bellboys and pedicels with abundant white mycelium which extended quickly, rotting included the stems next to the floral bellboys.

Additional keywords: identification, necrosis, *Brassica oleracea, Alternaria, Fusarium*

Palabras clave adicionales: identificación, necrosis, *Brassica oleracea, Alternaria, Fusarium*.

El brócoli es uno de los cultivos de mayor importancia socioeconómica en la región del Bajío en México (Montesinos, 2005), sin embargo, durante el verano las condiciones cálidas y de alta humedad relativa favorecen la presencia de enfermedades que limitan la producción (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). Las enfermedades causadas por hongos son un problema significativo para la producción de crucíferas en varias partes del mundo (Hodgkin y MacDonald, 1986; Dillard *et al.*, 1998; Pattanamahakul y Strange, 1999) incluyendo México (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). Entre los hongos que causan mayores daños al follaje o a la germinación de las semillas son: *Alternaria brassicae* (Berk) (Tewari, 1983), *A. brassicicola* (Schw) (Babadoost y Gabelson, 1979) *A. alternata* (Fries), *A. raphani* (Groves y Skolko) (Gupta y Chaudhury, 1992) *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans* (Wr) (Gaetán, 2005); y *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) (Moreno-Rico *et al.*, 2005).

La incidencia de micoflora presente en el follaje de las plantas varía dependiendo de la etapa fenológica (Singh y Rai, 1980) y algunos de estos hongos se comportan como patógenos importantes en cosecha o postcosecha causando pérdidas significativas en el cultivo de brassicas. *Alternaria brassicae* causó pérdidas de un 30% en las cabezas de coliflor por pudriciones antes de la cosecha (Tamayo *et al.*, 2001), y reducción en la calidad de la col por la necesidad de remover las hojas infectadas (Dillard *et al.*, 1998). Ceponis *et al.*, (1987), encontraron pudriciones hasta de 50% de las cabezas de col en embarques muestreados en el mercado de Nueva York atribuibles a *A. brassicae*. Menniti y Casalini, (2000), reportan a *A. brassicicola* causando serios problemas postcosecha en coliflor. Mercier *et al.*, (1991), identificaron a *Fusarium avenaceum* creciendo sobre floretes de brócoli almacenados por largos periodos a baja temperatura y en atmósferas controlada. *A. brassicicola* y *A. brassicae* son las especies que causan los mayores problemas en la producción de crucíferas sobre todo por su capacidad de sobrevivir en las semillas por varios meses a diferentes temperaturas y humedades relativas (Kumar y Gupta, 1994; Abul-Fazal *et al.*, 1994).

En el estado de Guanajuato, México., durante el verano del 2002 y 2003 se presentó un incremento considerable en la incidencia de pudriciones y manchado del florete de brócoli en campo, los síntomas se asociaron con los hongos *Alternaria* spp, *Phoma* spp y *Fusarium* spp (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). El propósito de este estudio fue identificar las agentes causales de los síntomas del manchado y pudrición del florete en los cultivos comerciales localizados en Guanajuato, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de los hongos presentes en los floretes de brócoli con síntomas de manchas y pudriciones. Durante los meses de julio a octubre del 2005 y 2006 en Apaseo el Grande, Guanajuato, Méx., se colectaron floretes de brócoli en la etapa de cosecha de las variedades comerciales 'Marathon', 'Patron' (Compañía Sakata) y 'Monaco' (Compañía Syngenta-Rogers), con síntomas de manchas café oscuras y pudriciones en los botones florales.

One of the most important socio economic crops in the Bajío region of Mexico is broccoli (Montesinos, 2005); however, during the summer the presence of disease limiting its production is favored because of the warm conditions and the high relative humidity (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). Fungal diseases represent a significant issue for crucifer production in many parts of the world (Hodgkin and MacDonald, 1986; Dillard *et al.*, 1998; Pattanamahakul and Strange, 1999), including Mexico (Narro-Sánchez *et al.*, 2005). Among the fungi that cause further damage the foliage or seed germination are: *Alternaria brassicae* (Berk) (Tewari, 1983), *A. brassicicola* (Schw) (Babadoost and Gabelson, 1979) *A. alternata* (Fries), *A. raphani* (Groves and Skolko) (Gupta and Chaudhury, 1992) *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* (Wr) (Gaetán, 2005); and *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) (Moreno-Rico *et al.*, 2005). The mycoflora incidence present in plants foliage varies depending on the phenological stage (Singh and Rai, 1980), and both harvest and post-harvest crop losses or significant losses in brassicas crops are caused by some of these fungi, as they act as important pathogens. Losses up to 30 % were caused by *Alternaria brassicae* rotting in the heads of cauliflower before harvest (Tamayo *et al.*, 2001), as well as a reduction in the cabbage quality because of the need to remove the infected leaves (Dillard *et al.*, 1998). Up to 50 % rotting of cabbage heads sampled in shipments in the New York market attributable to *A. brassicae* were found by Ceponis *et al.*, (1987). An *A. brassicicola* causing serious post-harvest issues in cauliflower was reported by Menniti and Casalini, (2000); a *Fusarium avenaceum* growing on broccoli florets stored for long periods at low temperatures and in controlled atmospheres was identified by Mercier *et al.*, (1991). The species that cause the biggest problems in crucifer production, especially due to their ability to survive in seeds for several months at different temperatures and relative humidity are *A. brassicicola* and *A. brassicae* (Kumar and Gupta, 1994; Abul-Fazal *et al.*, 1994). A considerable increase in rotting incidence and staining of floret broccoli in the field were revealed in the state of Guanajuato, Mexico during the 2002 and 2003 summer periods; the symptoms were associated with the fungi *Alternaria* spp., *Phoma* spp. and *Fusarium* spp. (Narro-Sánchez *et al.*, 2005).

The present study is aimed to identify the agents causing the spotting and rotting symptoms of the crops foil located in Guanajuato, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the fungi present in broccoli florets with spotting and rotting symptoms. Broccoli florets of the commercial varieties 'Marathon', 'Patron' (Sakata Company) and 'Monaco' (Syngenta.-Rogers Company) with dark brown and rotting symptoms in the flower buds were collected at the harvest stage from July to October, 2005 and 2006 in Apaseo el Grande, Guanajuato, Mexico. Five tissue pieces of 0.5 cm² area of disease progression were taken from each floret, disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for two minutes and washed three consecutive times with sterile distilled water.

De cada florete se tomaron 5 trozos de tejido de 0.5 cm² de la zona de avance de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por dos minutos y se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril. En total se hicieron 150 siembras de tejido en cajas de Petri con el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (Bioxon®, Becton Dickinson S.A de C.V., México.). Cada colonia desarrollada se separó y se purificó por cultivo monospórico. La identificación a nivel de género se realizó siguiendo las claves de Barnett y Hunter (1972), y dio como resultado que para el 2005 el 70% de las colonias aisladas correspondieron al género *Alternaria* y el 30% a *Fusarium* y para el 2006 el 80% de las colonias correspondieron a *Alternaria* y el 20% a *Fusarium*. Las colonias de *Alternaria* se dividieron en dos grupos por el color que presentaban, ya que algunas eran de color café-verdoso (AC) y otras verde olivo (AO).

Pruebas de patogenicidad de *Alternaria* spp. y *Fusarium* sp. Se utilizaron 40 floretes en etapa de cosecha de la variedad 'Marathon', se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% por 2 minutos y se lavaron con agua destilada estéril, para cada hongo se utilizó un florete como unidad experimental con 10 repeticiones en un arreglo completamente al azar, cada florete se inoculó colocando sobre su superficie (domo) cuatro gotas de 0.5 mL de una suspensión de conidios en agua destilada estéril (1X10⁵ conidios/mL) de cada uno de los aislamientos procedentes de cultivos monospóricos. Las colonias monospóricas de AC y AO se cultivaron en medio de cultivo papa-zanahoria-agar (PZA) y la de *Fusarium* en PDA, a una temperatura de laboratorio (24 ± 2°C) con 8 horas diarias de luz blanca fluorescente (lámparas Philips®, 21w/33). Después de dos semanas los conidios se filtraron en una malla de algodón estéril y se preparó la suspensión conidial antes mencionada. Como testigo se utilizaron los 10 floretes restantes, los cuales se inocularon con agua destilada estéril con el mismo procedimiento. Los 40 floretes inoculados se colocaron en charolas de unicel de 40x30 cm desinfectadas con etanol al 70%. Se cubrieron con una bolsa de polietileno y se incubaron a una temperatura de 24±2°C y 80% de humedad relativa, los síntomas se registraron diariamente por seis días en el caso de los inoculados con AC y AO y siete días en el caso de *Fusarium* sp. De los síntomas observados en los sitios de inoculación se hicieron cortes transversales para observar el avance de los hongos dentro de los tejidos, a las 144 h después de la inoculación (DI) para AC y AO y a las 168 h DI en el caso de *Fusarium* sp. De las zonas de avance de los hongos en los tejidos necrosados, se tomaron 10 fracciones de tejido de 0.5 cm² y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5% durante 2 min, posteriormente se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo PDA. Las características morfológicas de las colonias y hongos reaislados se compararon con las originalmente inoculadas.

Identificación de *Alternaria* spp. y *Fusarium* sp. como posibles agentes causales de la pudrición del florete. Se utilizaron tres colonias monoconidiales de *Alternaria* AC y AO sembradas en PZA y tres colonias monoconidiales de *Fusarium* sembradas en PDA, las cuales se mantuvieron por

A total of 150 sowings were made in Petri dishes with the potato-dextrose-agar culture medium (Bioxon®, Becton Dickinson S.A de C.V., México.). Each developed colony was separated and purified by monosporic culture. The identification at the genus level was performed following the Barnett and Hunter keys (1972), and resulted that by 2005, 70 % of the isolated colonies corresponded to the *Alternaria* genus, and 30 % to *Fusarium*; by 2006, 80 % of the colonies corresponded to *Alternaria* and 20 % to *Fusarium*. The *Alternaria* colonies were divided into two groups by the color they presented, since some of them revealed a brown-greenish color (AC) and others olive green (AO).

Pathogenicity tests of *Alternaria* spp. and *Fusarium* sp. A total of 40 florets of the 'Marathon' variety at harvest stage were utilized; they were disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for two minutes and washed with sterile distilled water. A floret was used for each fungus as an experimental unit with 10 repetitions in a completely random basis, having each floret inoculated by placing four 0.5 mL drops of a conidia suspension in sterile distilled water (1X10⁵ conidia/mL) over its surface (dome) from each one of the monosporic cultures precedent isolations. The AC and AO monosporic colonies were grown in a potato-carrot-agar culture medium (PZA) and the *Fusarium* in PDA, at a laboratory temperature (24 ± 2°C) with 8 hours of white fluorescent light (lamps Philips®, 21w/33). After two weeks, the conidia were filtered through a sterile cotton mesh the conidial suspension previously mentioned was prepared. The 10 remaining florets were used as a control, which were inoculated with sterile water following the very same procedure. The 40 inoculated florets were placed on 40x30cm polystyrene trays disinfected with 70 % ethanol. These were covered with a polythene bag and incubated at a 24±2°C temperature and with an 80 % relative humidity; the symptoms were recorded on a daily basis for six days in the case of those inoculated with AC and AO and seven days for those inoculated with *Fusarium* sp.

Transverse cuts were made to observe the fungus progress into the tissues from the symptoms observed at the inoculation sites after 144 h of the inoculation (AI) for AC and AO, and also after 168 AI for the *Fusarium* sp. A total of 10 tissue fractions of 0.5 cm² were taken from the fungus areas of progress in the necrotic tissues, and disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for two minutes, then washed three consecutive times with sterile distilled water and planted in a PDA culture medium. The morphological characteristics of the colonies and re-isolated fungi were compared with those originally inoculated.

Identification of *Alternaria* spp. and *Fusarium* sp. as possible floret rotting causal agents. Three AC and AO *Alternaria* monoconidial colonies planted in PZA were used, as well as three *Fusarium* monoconidial colonies planted in PDA, which were kept at a 24±2°C temperature for 10 days with 8 h of white fluorescent light (lamps Philips®, 21w/33). The identification was performed based on the mycelium characteristics, color of the colony, conidiophores form and shape, conidia size and color. Permanent preparation of fungi in glycerol at 50 % acidified with five drops of HCl at 12N

10 días a una temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ con 8 horas diarias de luz blanca fluorescente (lámparas Philips®, 21w/33). La identificación se hizo con base a las características del micelio, color de la colonia, forma de conidióforos; y forma, tamaño y color de los conidios. Para observar estas estructuras se hicieron preparaciones permanentes de los hongos en glicerol al 50% acidificado con cinco gotas de HCl al 12N y se observaron en el microscopio compuesto Carl Zeiss. Con la ayuda de las claves de Rotem (1994), Simmons (1995) y Nelson *et al.*, (1983) se identificaron los aislamientos a nivel de especie. Para confirmar la identificación morfológica se llevó a cabo la extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) de micelio de una colonia monoconidial de los hongos de acuerdo a la metodología de Ahrens y Seemüller (1992), se amplificaron las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rARN) localizadas entre la subunidad pequeña 18S rRNA, 5.8S y la subunidad larga 28S rRNA, con los iniciadores universales ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1990) por PCR y el producto se purificó con el juego wizard PROMEGA® y se secuenció en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM en un secuenciador Genetic Analyzer mod. 3100, APPLIED BIOSYSTEM. La secuencia ITS fue alineada en la base de datos del Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA por medio del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). La preservación de los cultivos monospóricos se hizo en tubos de ensaye con medio PDA y cubiertos con aceite mineral esterilizado.

RESULTADOS

Expresión de síntomas. Durante el muestreo en campo se observó que la pudrición en los floretes es más frecuente cuando se presentan condiciones de alta humedad provocadas por precipitaciones (50 mm) intercaladas con periodos de sequía. Las condiciones anteriores provocan la aparición de manchas café oscuras principalmente en los puntos de unión entre los minifloretes, donde no se conserva la pendiente del florete y quedan pequeños hundimientos. Es posible que en ésta zona las gotas de lluvia se conserven por más tiempo, lo que propicia la infección de los hongos. También se encontraron floretes con pudriciones en los puntos de crecimiento de los minifloretes donde los botones florales más jóvenes son más pequeños de tal forma que también se forma un hundimiento donde se conserva la humedad con facilidad.

Pruebas de patogenicidad de *Alternaria* spp. y *Fusarium* sp. en floretes de brócoli. Todos los floretes inoculados con *Alternaria* AC, AO y *Fusarium* sp., produjeron síntomas de necrosis y pudrición. *Alternaria* AC y AO a las 48 h DI produjeron pequeños puntos negros de aproximadamente 1 mm de diámetro en los sépalos de los botones florales, pero no se observó micelio evidente. A las 96 h DI AC y AO desarrollaron una mancha de 2.5-3 cm de diámetro aproximadamente. El micelio de AC tomó un coloración café-amarillenta en el centro de la lesión y en los alrededores una coloración amarillenta, los botones infectados tomaron una coloración café oscuro pero no se desintegraron con facilidad

to observe these structures, having them observed under a Carl Zeiss compound microscope. Isolations at species level became identified with the help provided by the codes of Rotem (1994) Simmons (1995) and Nelson *et al.*, (1983). The mycelium DNA (deoxyribonucleic acid) extraction from a monoconidial fungi colony in accordance with the Ahrens and Seemüller methodology (1992), was performed aiming to confirm the morphologic identification. The internal regions ITS1 and ITS2 from the ribosomal genes (rARN) located between the 18S rRNA, 5.8S small subunit and the 28S rRNA long subunit were amplified, with the ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') and ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') universal initiators (White *et al.*, 1990) by PCR, having the product purified with the Wizard set (PROMEGA®) and sequenced at the Instituto de Fisiología Celular de la UNAM in a Genetic Analyzer mod. 3100, APPLIED BIOSYSTEM sequencer. The ITS sequence was aligned in the Gene Bank database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA by the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). The monosporic crops preservation was carried out in test tubes with PDA medium and covered with sterile mineral oil.

RESULTS

Symptoms expression. It was observed during the field sampling that the floret rotting was more common when high humidity conditions provoked by rainfall (50 mm) interspersed with drought periods were present. The above conditions led to the appearance of dark brown spots mainly in the junctions among miniflorets, where the slope is not retained in the floret and small depressions prevail. It is possible that in this zone raindrops are retained longer, encouraging fungal infection, thus. Florets with rotting in the growth points of the miniflorets where young flower buds are smaller were also found so that it also formed a depression which retains moisture easily.

Pathogenicity tests of *Alternaria* spp. and *Fusarium* sp. Broccoli florets. Necrosis symptoms and rotting were produced by all the *Alternaria* AC, AO and *Fusarium* sp. Inoculated florets. Small black spots of about 1 mm diameter on the flower buds sepals were produced by *Alternaria* AC and AO at 48 h DI, but no evident mycelium was revealed. A 2.5-3 cm diameter spot was developed at 96 h AI by AC and AO. A yellowish-brown coloration was taken by the AC mycelium in the center of the lesion and around a yellowish color in its surroundings; a dark brown color was taken by the buttons infected, but they were not easily disintegrated (Fig. 1A). A dark brown discoloration was taken by the AO mycelium in the center of the lesion, having abundant sporulation produced; a whitish color was revealed by the mycelium around the lesion and a dark brown color was taken by the infected buttons but with a watery consistency and easily disintegrated (Fig. 1B). Afterwards, at 144 h AI, spots joined covering 80 % of the floret surface. It was observed in the cuts made in the inoculated areas that *Alternaria* strains had the pedicels and the thinner stems (2-3 mm diameter) (Fig. 1C and 1D) invaded after causing a watery brown rot in

(Fig. 1A). El micelio de AO tomó una coloración café oscuro en el centro de la lesión y se produjo abundante esporulación, alrededor de la lesión el micelio fue de color blanquecino y los botones infectados tomaron un color café oscuro pero tuvieron una consistencia acuosa y se desintegraron con facilidad (Fig. 1B). Posteriormente a las 144 h DI las manchas se unieron cubriendo el 80% de la superficie del florete. En los cortes realizados en las zonas inoculadas, se observó que las cepas de *Alternaria* después de causar una pudrición café acuosa en los botones florales, invadieron los pedicelos y los tallos más delgados (2-3 mm de diámetro) (Fig. 1C y 1D), en el caso de AO también invadió tallos gruesos de 2-3 cm de diámetro.

En el caso de *Fusarium*, a las 48 h DI se observó micelio externo superficial de color blanco, creciendo lento sobre los botones, entre las 72 y 96 h DI el crecimiento fue lento pero ya había formado una mancha de micelio blanquecino de 3 cm de diámetro en promedio y no se observó esporulación. Posteriormente las manchas de micelio blanquecino algodonoso se unieron de tal forma que cubrieron el 80% de la superficie a las 168 h DI (Fig. 1E). Los cortes revelaron una pudrición acuosa de botones y pedicelos en el centro de la lesión y una necrosis gris seca de los botones y pedicelos en los alrededores de la lesión. El hongo produjo abundante micelio superficial y llegó a invadir tallos florales delgados en los sitios de inoculación (2-7 mm de diámetro) (Fig. 1F). En los floretes utilizados como testigos no se observó manchas o crecimiento de micelio externo sobre la superficie de los botones, y tampoco pudrición de tejidos. De todos los floretes con síntomas se tomó tejido dañado se reaislaron los hongos en cultivo puro, coincidiendo con las características de los hongos aislados. El aislamiento AO fue el más patogénico, ya que causa una desintegración de tejidos mayor y es capaz de invadir tallos gruesos de 2-3 cm de diámetro.

Identificación de *Alternaria* spp. y *Fusarium* sp. como agentes causales de la pudrición del florete. En total se identificaron tres especies de hongos causantes del manchado o pudrición del florete de brócoli. *Alternaria* AC presentó colonia verde grisacea en medio de cultivo PZA, conidios obclavados, muriformes, con ornamentación rugosa-punteada, con septación transversal y longitudinal variable de 4 a 6 y 2 a 3 respectivamente y un tamaño variable de conidios de 11 a 42 x 7.7 a 11 µm con conidióforos primarios de 31-88 x 3.3 a 4.4 µm, estas características correspondieron a la especie *Alternaria tenuissima* (Kunze; Wiltshire) de acuerdo a las claves y descripciones de Rotem (1994) y Simmons (1995). *Alternaria* AO presentó colonia verde olivo en medio de cultivo PZA, conidios obclavados, muriformes, con ornamentación rugosa-punteada, con septación transversal y longitudinal variable de 3 a 7 y 0-1 respectivamente y un tamaño variable de conidios de 12 a 42 x 6.7 a 13 µm con conidióforos primarios de 16-71 x 3.3 a 4.4 µm. La catenulación puede poseer de 5 - 10 conidios, presenta ramificación secundaria y puede presentar ramificación terciaria, estas características correspondieron a la especie *Alternaria alternata* de acuerdo a las claves de Rotem (1994) y Simmons (1995). *Fusarium* sp. presentó colonia de coloración rosada a púrpura con apariencia algodonosa,

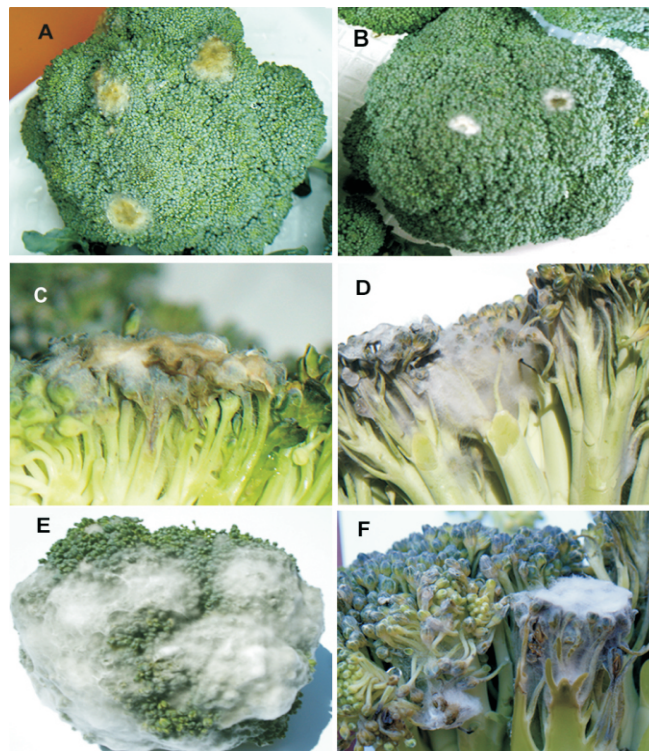


Figura 1. Fotografías de floretes de brócoli var. 'Marathon' inoculados con *A. tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*. A- Crecimiento de micelio café amarillento de *A. tenuissima* en el centro de la lesión a las 96 h DI. B- Crecimiento de micelio café oscuro de *A. alternata* en el centro de la lesión a las 96 h DI. C- *A. tenuissima* invadiendo botones y pedicelos florales en un corte transversal de un florete después de 144 h DI. D- *A. alternata* invadiendo botones y pedicelos florales en un corte transversal de un florete después de 144 h DI. E- Crecimiento de micelio blanco algodonoso de *Fusarium oxysporum* a las 168 h DI. F- *F. oxysporum* invadiendo botones y pedicelos florales en un corte transversal de un florete después de 168 h DI.

Figure 1. Pictures of broccoli florets 'Marathon' variety inoculated with *A. tenuissima*, *A. alternata* and *Fusarium oxysporum*. A- Brown yellowish mycelium growth of *A. tenuissima* in the center of the lesion at 96 h AI. B- Dark brown mycelium growth of *A. alternata* in the center of the lesion at 96 h AI. C- Floral buttons and pedicels from a broccoli floret being invaded in a cross section after 144 h DI by *A. tenuissima*. D- Floral buttons and pedicels from a broccoli floret being invaded in a cross section after 144 h AI by *A. alternata*. E- Cottony white mycelium growth of *Fusarium oxysporum* at 168 h AI. F- Floral buttons and pedicels from a broccoli floret being invaded in a cross section after 168 h DI by *F. oxysporum*.

the flower buds; thick stems of 2-3 cm diameter were also invaded in the AO case. A white superficial color external mycelium was observed in the *Fusarium* case at 48 h AI, growing slowly over the buttons; between the 72 and the 96 h AI growth was slow, but had already made a 3 cm average

esporodoquios abundantes errupentes de coloración color salmón o naranja, macroconidios en forma de hoz de 3 a 5 células, delgados con la célula apical atenuada y la célula basal en forma de pie producidos en esporodoquios, monofialides ramificadas o simples y abundantes clamidosporas simples o en pares, las características concordaron con lo descrito por Nelson *et al.*, (1983), para la especie *Fusarium oxysporum*.

Identificación molecular. Las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rARN) amplificadas por PCR para *Alternaria* AC fue de 578pb que correspondió a una secuencia completa de ambas regiones ITS1 e ITS2. En el banco de genes (NCBI), la secuencia se alineó en primer lugar con secuencias correspondientes a especies de *Alternaria* no especificadas y a algunos hongos de suelo, la primera especie de *Alternaria* con la que se alineó fue *Alternaria tenuissima* (número de acceso AY154712.1) con un índice de similaridad de 99%, el índice de similaridad fue el mismo para *Alternaria tenuissima* (número de acceso AY154712.1) y para las secuencias de especies no especificadas, así como para otras especies como *A. mali* (Roberts) y *A. longipes* (Ellis and Everhart) con las cuales se alineó posteriormente con el mismo porcentaje, sin embargo por la morfología presentada se corroboró que la especie de estudio era *A. tenuissima*.

Las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rARN) amplificadas por PCR para *Alternaria* AO fue de 558 pb que correspondió a una secuencia completa de ambas regiones ITS1 e ITS2. En el banco de genes (NCBI), la secuencia se alineó en primer lugar con *A. arborescens* (Simmons) (DQ242505.1), en segundo lugar con una especie de *Alternaria* no especificada (número de acceso AY714482.1) y en tercer lugar con *A. alternata* (número de acceso AF397236.1), posteriormente con *A. grisea* (número de acceso AF314581.1) todas presentaron los mismos valores (Score 979 y con 100% de índice de similaridad), se decidió tomar a *A. alternata* (número de acceso AF397236.1), apoyados en la identificación morfológica realizada.

Las regiones internas ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales (rARN) amplificadas por PCR para *Fusarium* sp. fue de 540 pb que correspondió a una secuencia completa de ambas regiones ITS1 e ITS2. En el banco de genes (NCBI), la secuencia se alineó en primer lugar con *F. oxysporum* (número de acceso EF495235.1); con un valor de 950 y un índice de similaridad de 99 %, en este caso no hubo alineamientos con otras especies de *Fusarium*, pero si con secuencias de especies no especificadas de hongos de suelo.

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró evidencia suficiente de que *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* causan los síntomas de pudrición y manchado del florete de brócoli. La humedad proporcionada al florete al momento de la inoculación de los hongos fue suficiente para permitir la germinación de los conidios y la infección, Hong y Fitt (1995), mencionan que *A. brassicae* necesitó 4 h de humedad para infectar hojas de *Brassica napus* y que el incremento de la humedad favorece la severidad de la enfermedad. Para este estudio los síntomas iniciales de *A. tenuissima* y *A. alternata*

diameter whitish mycelium spot with no sporulation being observed. Later, the cottony white mycelium spots joined, having 80 % of the surface covered at 168 h AI (Fig. 1E). It was revealed by the sections a buttons and pedicels watery rot in the center of the lesion and a dry gray necrosis and pedicels buttons around it. Abundant superficial mycelium was produced by the fungi, coming to invade the thin flower stems at the inoculation sites (2-7 mm diameter) (Fig. 1F). At lack of spots or external mycelium growth over the buttons surface was neither revealed in the florets utilized as controls nor the rotting tissues. The fungi in pure culture were re-isolated from all the florets with symptoms from which damaged tissue had been taken, coinciding with the characteristics of the isolated fungi. The AO isolation was the most pathogenic because it causes a major tissues breakdown and it is capable to invade 2-3 cm diameter thick stems.

Identification of *Alternaria* spp. and *Fusarium* sp. as causal agent of broccoli floret rotting. Three spotting or rotting causing fungi species of broccoli floret were identified. A grayish colony in a PZA culture medium, obclavate muriforms, with rough-dotted ornamentation, with a transverse and longitudinal septation variable 4-6 and 2-3 respectively, and a variable size of conidia of 11 to 42 x 7.7 to 11 µm with primary conidiophores of 31-88 x 3.3 to 4.4 µm was revealed by *Alternaria* AC; these characteristics corresponded to the *Alternaria tenuissima* (Kunze; Wiltshire) in accordance to Rotem (1994) and Simmons (1995) codes and descriptions.

An olive green colony in a PZA culture medium, obclavate conidia, muriforms with a rough-dotted ornamentation, with a transverse and longitudinal septation variable of 3 to 7 and 0-1 respectively, and a variable size of conidia of 12 to 42 x 6.7 to 13 µm with primary conidiophores of 16-71 x 3.3 to 4.4 µm. The catenulation may present 5 to 10 conidia, secondary branching and a tertiary branching can occur; these characteristics corresponded to the *Alternaria alternata* in accordance to the Rotem (1994) and Simmons (1995) codes.

A colony of purple pinkish cottony appearance, abundant errupentes sporodochia salmon or orange color, 3-5 sickle shaped macronidia cells, thin with an attenuated apical cell and a foot shaped basal cell produced in sporodochia, monofialides branched or simple and abundant simple or branched chlamydospores; the features were consistent with those described by Nelson *et al.*, (1983), for the *Fusarium oxysporum* species.

Molecular identification. The internal regions ITS1 and ITS2 of the ribosomal genes (rARN) amplified by PCR for *Alternaria* AC was 578pb, which corresponded to a complete sequence of both ITS1 and ITS2 regions. The sequence was first aligned with sequences corresponding to unspecified *Alternaria* species and with regards to some soil fungi, the first *Alternaria* species that it got aligned with was *Alternaria tenuissima* (access number AY154712.1) with a 99 % similarity index; the similarity index was the same for *Alternaria tenuissima* (access number AY154712.1), and for the sequences of unspecified species, as well as for other species such as *A. mali* (Roberts) and *A. longipes* (Ellis and Everhart) to which it became further aligned with the same

en los sépalos de los botones de brócoli, fueron similares a los producidos por *A. brassicicola* y *A. brassicae* en plántulas de col, donde también se observaron puntos necróticos al inicio de la infección (Babadoost y Gabrielson, 1979). Thomma, 2003; Eshel *et al.*, 2000; Nutsugah *et al.*, 1994, mencionan que varias enzimas y toxinas juegan un papel determinante en el proceso de infección de *A. tenuissima* y *A. alternata*. Eshel *et al.*, (2000) mencionan que endoglucanasas están relacionadas con el síntoma de manchas negras en frutos de persimonia atacados por *A. alternata*, sin embargo en este estudio no se determinó la presencia de enzimas o toxinas en los tejidos de brócoli. *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* es un patógeno que ha sido reportado atacando brassicas en campo, donde causa un amarillamiento de hojas y posteriormente necrosis y defoliación (Rangavajhyala *et al.*, 1998; Farnham *et al.*, 2001); en este caso *F. oxysporum*, no causó amarillamiento de los botones, solo necrosis gris-seca y abundante micelio blanquecino que cubrió gran parte del domo del florete, algo similar a lo descrito por Mercier *et al.* (1991) en floretes de brócoli almacenados los cuales fueron infectados por *F. avenaceum*. *A. alternata* fue la especie más virulenta desintegrando los tejidos infectados más rápidamente que *A. tenuissima* y *F. oxysporum*, lo cual puede ser atribuible a la producción de algún compuesto fitotóxico que no producen las otras dos especies, sin embargo no se comprobó su presencia. *A. alternata* y *A. tenuissima* son especies ampliamente relacionadas por lo que existen numerosos aislamientos con características intermedias de ambas especies, lo que dificulta la separación taxonómica (Pryor y Michailides, 2002); ésta semejanza morfológica también se reflejó en la identificación molecular, donde las secuencias ITS1 e ITS2 de ambas especies se alinearon con el mismo porcentaje con otras especies que comparten características, que los mismos autores reportan con aislamientos de *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* y *A. infectoria* en pistacho.

Alternaria tenuissima, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum*, no solo dañan los tejidos de la inflorescencia del brócoli, sino que posiblemente puedan contaminar las semillas, tal como sucedió con *A. brassicicola* y *A. brassicae*, las cuales contaminaron semillas de col causando pérdidas importantes durante la germinación y la etapa de plántula (Babadoost y Gabrielson, 1979; Dillard *et al.*, 1998).

CONCLUSIONES

Alternaria tenuissima, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* son agentes causales de la pudrición o manchado del florete de brócoli, al ocasionar necrosis de células y pudrición de tejidos.

LITERATURACITADA

- Abul-Fazal, M., Khan, M.I., and Saxena, S.K. 1994. The incidence of *Alternaria* species in different cultivars of cabbage and cauliflower seeds. Indian Phytopathology 47:419-421.
- Ahrens, U., and Seemüller, E. 1992. Detection of DNA of cabbage and cauliflower seeds. Indian Phytopathology 47:419-421.

percentage; nevertheless, it was confirmed that because of the presented morphology the species under study was *A. tenuissima*.

The ribosomal genes (rARN) internal regions of ITS1 and ITS2 amplified by PCR for *Alternaria* AO were 558 Pb, which corresponded to a complete sequence of both ITS1 and ITS2 regions. The sequence was aligned, in first place, with *A. arborescens* (Simmons) (DQ242505.1) in the bank of genes (NCBI), in second place with an unspecified *Alternaria* species (access number AY714482.1) and in third place with an *A. alternata* (access number AF397236.1); afterward with an *A. grisea* (access number AF314581.1); the same values were revealed by all of them (Score 979 and con 100% similarity index). It was decided to take an *A. alternata* (access number AF397236.1), supported by the morphologic identification previously performed. The ribosomal genes (rARN) ITS1 and ITS2 internal regions amplified by PCR for *Fusarium* sp. was 540 pb, which corresponded to a complete sequence from both ITS1 and ITS2 regions. The sequence was aligned, in first place, with *F. oxysporum* (access number EF495235.1), with a 950 value and a 99 % similarity index; no alignment with other *Fusarium* species was revealed by this case but with soil fungi unspecified species sequences.

DISCUSSION

Sufficient evidence was revealed by the study hereby confirming the fact that broccoli floret rotting and spotting are caused by *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* and *Fusarium oxysporum*. The moisture supplied to the floret at the time of fungal inoculation was sufficient to allow conidia and infection germination. It is mentioned by Hong and Fitt (1995), that 4 h of moisture were required by *A. brassicae* to have the leaves infected with *Brassica napus*, and that an increased humidity favors the severity of the disease. The *A. tenuissima* and *A. alternata* initial symptoms on the sepals of broccoli buttons, for the study hereby, were similar to those produced by *A. brassicicola* and *A. brassicae* in cabbage seeding, where necrotic spots were also observed at the beginning of the infection (Babadoost and Gabrielson, 1979). It is reported by Thomma, 2003; Eshel *et al.*, 2000; Nutsugah *et al.*, 1994 that a relevant role is played by several enzymes and toxins in *A. tenuissima* and *A. alternata* infection process. It is reported by Eshel *et al.*, (2000) that endoglucanase are related to the black spot symptoms on persimmon fruits attacked by *A. alternata*; although, the presence of neither enzymes nor toxins in the broccoli tissues were revealed in this study. *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* is a pathogen that has been reported attacking brassicas on the field, where a leaf yellowing and a subsequent necrosis and defoliation are caused by such fungi (Rangavajhyala *et al.*, 1998; Farnham *et al.*, 2001); regarding this particular case, no buttons yellowing was caused by *F. oxysporum*, but only dry-gray necrosis and abundant whitish mycelium which covered much of the floret dome; similar to those described by Mercier *et al.* (1991) in stored broccoli florets that had been infected by *F. avenaceum*. The most virulent species disintegrating the infected tissues faster than *A. tenuissima* and *F. oxysporum*, was *A. alternata*, which may be

- Babadoost, M., and Gabrielson, R.L. 1979. Pathogens causing *Alternaria* diseases of brassica seed crops in western Washington. Plant disease reporter 63: 815-820.
- Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1972. Ilustred Genera of Imperfect Fungi. Burgess Publishing Company. Minnesota, USA. 241 p.
- Ceponis, M.J., Cappellini, R.A., and Lightner, G.W. 1987. Disorders in Cabbage, Bunched Broccoli, and Cauliflower Shipments to the New York Market, 1972-1985. Plant disease 71:1151-1154.
- Dillard, H.R., Cobb, A.C., and Lamboy, J. S. 1998. Transmission of *Alternaria brassicicola* to Cabbage by Flea Beetles (*Phyllotreta cruciferae*). Plant Disease 82:153-157.
- Eshel, D., Ben-Arie, R., Dinoor, A., and Prusky, D. 2000. Resistance of gibberellin-treated persimmon fruit to *Alternaria alternata* arises from the reduced ability of the fungus to produce endo-1,4- β -glucanase. Phytopathology 90:1256-1262.
- Farnham, M.W., Keinath, A.P., and Smith, J.P. 2001. Characterization of *Fusarium* yellows resistance in collard. Plant Disease 85:890-894.
- Gaetan, S.A. 2005. Occurrence of *Fusarium* Wilt on canola Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* in Argentina. Plant Disease 89:432.
- Gupta, D.K., and Chaudhury, K.C.B. 1992. Occurrence and prevalence of *Alternaria* species in crucifers grown in Sikkim. Indian Journal of Hill Farming. 5:129-131.
- Hodgkin, T., and MacDonald, M.V. 1986. The Effect of a Phytotoxin from *Alternaria brassicicola* on Brassica Pollen. New Phytologist 104:631-636.
- Hong, C.X., and Fitt, B.D.L. 1995. Effects of inoculum concentration, leaf age and wetness period on the development of dark leaf and pod spot (*Alternaria brassicae*) on oilseed rape (*Brassica napus*). Annals Applied Biology 127: 83-295.
- Kumar, R., and Gupta, P.P. 1994. Survival of *Alternaria brassicae*, *A. brassicicola* and *A. alternata* in the seed of mustard (*B. juncea*) at different temperatures and relative humidities. Annals of Biology 10:55-58.
- Menniti, A.M., and Casalini, L. 2000. Prevention of post-harvest diseases on cauliflower. Colture Protette 29: 67-71.
- Mercier, J., Makhlof, J., and Martin, R.A. 1991. *Fusarium avenaceum*, a pathogen of stored broccoli. Canadian Plant Disease Survey 71:161-162.
- Montesinos, S.G. 2005. Modelo de manejo de las unidades calor en el cultivo de brócoli y sus principales plagas. Memorias del VI Seminario Técnico: Tecnología de producción de las crucíferas. COTECO. Guanajuato, México. 95 p.
- Moreno-Rico, O., Manzano-Flores, D.E., y Luna-Ruiz, J.J. 2005. Reacción de Variedades de Coliflor (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) y Brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.) a *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 206-210.
- Narro-Sánchez, J., Quijano-Carranza, J.A., y Rocha, R.R. 2005. Enfermedades del follaje y florete de brócoli en la producción de some phytotoxic compound not produced by the other two species; however, their presence was not verified. The highly related species are *A. alternata* and *A. tenuissima*; consequently, there are many isolates with intermediate characteristics of both species, making it rather difficult to perform a taxonomic separation (Pryor and Michailides, 2002). This morphological similarity was also reflected in the molecular identification, where the ITS1 and ITS2 sequences from both species aligned themselves at the same percentage level with other species sharing the same characteristics, which the same authors reported with *A. alternata*, *A. tenuissima*, *A. arborescens* and *A. infectoria* isolations in pistachio. It was revealed that *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* and *Fusarium oxysporum* not only damage broccoli inflorescence tissue, but that they could possibly contaminate the seed, as it was the case with *A. brassicicola* and *A. brassicae*, which contaminated cabbage seeds causing relevant losses during germination and seeding stage (Babadoost and Gabrielson, 1979; Dillard *et al.*, 1998).
- CONCLUSIONS**
- The causal agents of either rotting or spotting of broccoli florets are *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* and *Fusarium oxysporum*, by causing cell necrosis and tissue rotting.
-
- México. In: Memorias del VI Seminario Técnico: Tecnología de producción de las crucíferas. COTECO. Celaya, Gto., México. 95 p.
- Nelson, P.E., Toussoun, T.A., and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. The Pennsylvania State University Press. USA. 193 p.
- Nutsugah, S.K., Kohmoto, K., Otani, H., Kodoma, M., and Sunkerwari, R.R. 1994. Production of a Host-Specific toxin by germinating spores of *Alternaria tenuissima* causing leaf spot of pigeon pea. Journal Phytopathology 140: 19-30.
- Pattanamahakul, P., and Strange, R.N. 1999. Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of *Brassica* species grown in Thailand. Plant Pathology 48:749-755.
- Pryor, B.M., and Michailides, T.J. 2002. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* isolates associated with *Alternaria* late blight of pistachio. Phytopathology 92:406-416.
- Rangavajhyala, N., Ghorpade, V.M., and Kadam, S.S. 1998. Broccoli. pp. 337-357. In: D.K. Salunkhe and S.S. Kadam (eds). Handbook of Vegetables Science and Technology. Marcel Dekker. Inc. New York, USA. 721 p.
- Rotem, J. 1994. The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. American Phytopathological Society. St Paul, MN. USA. 326 p.
- Simmons, E.G. 1995. *Alternaria* themes and variations (112-144). Mycotaxon 55: 55-163.
- Singh D.F., and Rai, B. 1980. Studies on the leaf surface mycoflora of mustard (*Brassica campestris* L. cv. YS-42).

- Bulletin of the Torrey Botanical Club 107: 447-452.
- Tamayo, M. P. J., Becerra, V.D.C., y Jaramillo, N.J.E. 2001. *Alternaria brassicae*, agente causal de pudrición de la cabeza en coliflor (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L). ASCOLFI Informa 27: 10-11.
- Tewari, J.P. 1983. Celular alterations in the blackspot of rapeseed caused by *Alternaria brassicae*. Plant pathology 73: 831.
- Thomma, B.P.H.J. 2003. *Alternaria* spp: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant pathology 4:225-236.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. *In*: M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky and T.J. White (eds). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Innis, Academic Press, San Diego, CA. USA. 482 p.