

# *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides* identified as causal agents of broccoli head rot in Mexico

## *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides* agentes causales de la pudrición de brócoli en México

Alda A. Arratia-Castro<sup>1\*</sup>; Ernesto Fernández-Herrera<sup>2</sup>; María G. Gómez-Espinoza<sup>1</sup>; Teresa S. Herrera-Flores<sup>1</sup>; María G. Moreno-Contreras<sup>1</sup>; Eva M. Licea-de Anda<sup>1</sup>; Irene I. Ramírez-Bustos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Politécnica de Pénjamo. Carretera Irapuato - La Piedad km 44, El Derramadero, Pénjamo, Guanajuato, C. P. 36921, MÉXICO.

<sup>2</sup>Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería. Carretera Bahía de Kino km 21, Hermosillo, Sonora, C. P. 83340, MÉXICO.

<sup>3</sup>Universidad Estatal de Sonora, Ingeniería en Horticultura. Av. Ley federal del trabajo s/n, Hermosillo, Sonora, C. P. 83000, MÉXICO.

\*Corresponding author: [acastro@uppenjamo.edu.mx](mailto:acastro@uppenjamo.edu.mx), tel. 687 107 52 56.

### Abstract

Broccoli is one of the most economically important vegetables in Mexico, and one of the diseases that reduces its yield and quality is head rot, which has been associated with different phytopathogens. The objective of this study was to morphologically and molecularly identify the causal agents of head rot in broccoli cultivation in Mexico. Florets with rot symptoms were collected in different municipalities of the state of Guanajuato (León, San Francisco del Rincón, Valle de Santiago, Abasolo, Juventino Rosas and Dolores Hidalgo). The isolates obtained were identified based on their cultural, morphological and molecular characteristics (by PCR-ITS) as *Alternaria alternata* (AA), *Fusarium oxysporum* (FO) and *Fusarium verticillioides* (FV). The pathogenicity of these fungal species was corroborated by Koch's postulates. The fungal isolation frequency was 55, 26 and 19 % for AA, FV and FO, respectively, of the total samples analyzed. The sequence obtained from a representative isolate of each fungus was compared with those reported in the NCBI gene bank, where the highest similarity percentages were 99.6, 98.9 and 98.2 % for FO, FV and AA, respectively, thus confirming the morphological identification results. This is the second report of the presence of AA and FO associated with broccoli head rot in Mexico, and the first report of FV as part of the complex of causal agents of this disease.

**Keywords:** *Brassica oleracea* var. *italica*, morphological identification, necrosis, PCR, ITS.

### Resumen

El brócoli es una de las hortalizas de mayor importancia económica en México, y una de las enfermedades que reduce su rendimiento y calidad es la pudrición del florete, la cual se ha asociado a diferentes fitopatógenos. El objetivo del presente trabajo fue identificar morfológicamente y molecularmente a los agentes causales de la pudrición del florete en el cultivo de brócoli en México. Se colectaron floretes con síntomas de pudrición en diferentes municipios del estado de Guanajuato (León, San Francisco del Rincón, Valle de Santiago, Abasolo, Juventino Rosas y Dolores Hidalgo). Los aislados obtenidos se identificaron con base en sus características culturales, morfológicas y moleculares (mediante PCR-ITS) como *Alternaria alternata* (AA), *Fusarium oxysporum* (FO) y *Fusarium verticillioides* (FV). La patogenicidad de estas especies fúngicas se corroboró mediante los postulados de Koch. La frecuencia de aislamiento de los hongos fue de 55, 26 y 19 % para AA, FV y FO, respectivamente, del total de muestras analizadas. La secuencia obtenida de un aislado representativo de cada hongo se comparó con las reportadas en el banco de genes del NCBI, donde los mayores porcentajes de similitud fueron 99.6, 98.9 y 98.2 % para FO, FV y AA, respectivamente, con lo cual se confirmaron los resultados de la identificación morfológica. Este es el segundo reporte de la presencia de AA y FO asociados a la pudrición del florete de brócoli en México, y el primer reporte de FV como parte del complejo de agentes causales de esta enfermedad.

**Palabras clave:** *Brassica oleracea* var. *italica*, identificación morfológica, necrosis, PCR, ITS.

Please cite this article as follows (APA 6): Arratia-Castro, A. A., Fernández-Herrera, E., Gómez-Espinoza, M. G., Herrera-Flores, T. S., Moreno-Contreras, M. G., Licea-de Anda, E. M., & Ramírez-Bustos, I. I. (2022). *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides* identified as causal agents of broccoli head rot in Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 28(3), 175-188. doi: 10.5154/r.rchsh.2022.03.003



Revista Chapingo  
Serie Horticultura

## Introduction

Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) is one of the most economically important vegetables in Mexico, after green chili pepper (*Capsicum annuum* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.), onion (*Allium cepa* L.), tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) and watermelon (*Citrullus lanatus*). In 2020, 33,930 ha of broccoli were grown in Mexico, with a total production of 583,645 t (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural - Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera [SADER-SIAP], 2020). Currently, the leading producing state is Guanajuato, with 24,233 ha of broccoli.

As in many plant species, diseases caused by phytopathogens are a significant problem for cruciferous vegetable production around the world (Akram et al., 2020; Dillard, Cobb & Lamboy, 1998; Fraire-Cordero et al., 2010; Pattanamahakul & Strange, 1999). In Mexico and several parts of the world, one of the diseases that reduces broccoli yield and quality is head rot, which occurs when crop development coincides with rainfall greater than 10 mm (at an approximate temperature of 30 °C and relative humidity of 70 %), and the problem is aggravated if this occurs at harvest time. Losses caused by this disease are higher than 40 % (Editorial Agro Cultivos S. C de R. L. de C. V. [EAC], 2017).

This disease has been associated with different phytopathogens in different regions. In 2009, the fungus *Alternaria brassicicola* was reported as the causal agent of broccoli head rot in Shanghai province, China (Liu et al., 2009), while Li et al. (2009) identified the bacterium *Pseudomonas fluorescens* in broccoli fields with rot symptoms in Zhejiang province. In another study, *Alternaria alternata* was isolated and identified on broccoli florets with the same symptom in Tanggu, Tianjin district, China (Guo, Cui, Zhu, Song, & Wang, 2015). Finally, in 2018, the first report of *Fusarium tricinctum* as a cause of the rot in the same crop in Hubei province was published (Zhao, Li, Yan, Huang, & Zheng, 2018).

In Mexico, the work of Fraire-Cordero et al. (2010) is an important precedent for research and knowledge of broccoli head rot. This study reported the presence of *Alternaria tenuissima*, *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* as fungi causing this disease in the commercial broccoli varieties Marathon, Patron (Sakata Seed Corporation) and 'Monaco' (Syngenta-Rogers Company) in Guanajuato, specifically in the municipality of Apaseo el Grande. Despite the importance of this report, the research was restricted to a single geographic area, hence the current need to increase the study area to generate information at the regional level of the phytopathogens involved in the development of this disease in the state of Guanajuato.

## Introducción

El brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) es una de las hortalizas de mayor importancia económica en México, después del chile verde (*Capsicum annuum* L.), la papa (*Solanum tuberosum* L.), la cebolla (*Allium cepa* L.), el jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y la sandía (*Citrullus lanatus*). En 2020 se cultivaron 33,930 ha de brócoli en México, con una producción total de 583,645 t (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural - Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera [SADER-SIAP], 2020). Actualmente, el principal estado productor es Guanajuato, con 24,233 ha de brócoli.

Al igual que en muchas especies vegetales, las enfermedades causadas por fitopatógenos son un problema significativo para la producción de crucíferas alrededor del mundo (Akram et al., 2020; Dillard, Cobb & Lamboy, 1998; Fraire-Cordero et al., 2010; Pattanamahakul & Strange, 1999). En México y varias partes del mundo, una de las enfermedades que reduce el rendimiento y la calidad del brócoli es la pudrición del florete, la cual se presenta cuando coincide el desarrollo del cultivo con precipitaciones pluviales superiores a 10 mm (con temperatura aproximada de 30 °C y humedad relativa de 70 %), y el problema se agrava si esto ocurre en el momento de cosecha. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad son superiores al 40 % (Editorial Agro Cultivos S. C de R. L. de C. V. [EAC], 2017).

Dicha enfermedad se ha asociado a diferentes fitopatógenos en distintas regiones. En 2009 se reportó al hongo *Alternaria brassicicola* como agente causal de la pudrición de floretes de brócoli en la provincia de Shanghai, China (Liu et al., 2009), mientras que Li et al. (2009) identificaron a la bacteria *Pseudomonas fluorescens* en campos de brócoli con síntomas de pudrición en la provincia de Zhejiang. En otro estudio se aisló e identificó a *Alternaria alternata* en floretes de brócoli con el mismo síntoma en Tanggu, distrito de Tianjin, China (Guo, Cui, Zhu, Song, & Wang, 2015). Finalmente, en 2018 se publicó el primer reporte de *Fusarium tricinctum* como causante de la pudrición en el mismo cultivo en la provincia de Hubei (Zhao, Li, Yan, Huang, & Zheng, 2018).

En México, el trabajo de Fraire-Cordero et al. (2010) es un antecedente importante para la investigación y conocimiento de la pudrición de florete en el cultivo de brócoli. En esa investigación se reportó la presencia de *Alternaria tenuissima*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* como hongos causantes de dicha enfermedad en brócoli de las variedades comerciales Marathon, Patron (Compañía Sakata) y 'Monaco' (Compañía Syngenta-Rogers) en Guanajuato, específicamente en el municipio de Apaseo el Grande. A pesar de la importancia de este reporte, la investigación estuvo restringida a una sola área geográfica, de ahí

Ochoa, Hernández-Montiel, Latisnere-Barragán, León-de la Luz, and Larralde-Corona (2007) point out that the study of the causal agents of diseases worldwide suggests that the problems of each region are different, due to management issues as well as soil and weather conditions. Therefore, and given that head rot can be caused by different pathogens, it is essential to identify and characterize the microorganisms associated with head rot in each region. This would allow generating information on the frequency and importance of these pathogens, in order to make a correct diagnosis of the disease, since the choice of an appropriate management method that can avoid damage and severe crop losses depends largely on this.

Based on the above, the objective of this work was to identify, morphologically and molecularly, the causal agents of broccoli head rot in the municipalities of León, San Francisco del Rincón, Valle de Santiago, Abasolo, Juventino Rosas and Dolores Hidalgo in the state of Guanajuato, Mexico.

## Materials and methods

### Sample collection

During July and August 2017, 64 broccoli florets of the Avenger variety (Sakata Seed Corporation), at harvest stage with rot symptoms, were collected in the municipalities of León (16 florets), San Francisco del Rincón (10 florets), Valle de Santiago (12 florets), Abasolo (9 florets), Juventino Rosas (9 florets) and Dolores Hidalgo (8 florets), Guanajuato, Mexico. The samples were transferred to the microbiology laboratory of the Universidad Politécnica de Pénjamo. Upon arrival, the samples were stored at 4 °C and processed within a maximum period of 24 h.

### Isolation and morphological identification of the causal agent

The collected florets were washed with running water and tissue sections were cut for the bacterial flow test, which consisted of placing the pieces in a test tube containing 3 mL of sterile distilled water and shaking for 5 min (Jiménez, Contreras, & Nass, 2004).

Once the presence of bacterial flow was ruled out, isolations were performed. For this, small sections (1 cm<sup>2</sup>) were taken from each broccoli floret, disinfested with 1.5% sodium hypochlorite for 2 min, washed three times with sterile distilled water and placed on sterile blotting paper. Subsequently, the pieces were placed in Petri dishes with potato dextrose agar (PDA) medium and incubated at 28 °C for 7 days. Each fungal colony developed was isolated and purified by monospore culture.

la necesidad actual de aumentar el área de estudio para generar información a nivel regional de los fitopatógenos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad en el estado de Guanajuato.

Ochoa, Hernández-Montiel, Latisnere-Barragán, León-de la Luz, y Larralde-Corona (2007) señalan que el estudio de los agentes causales de enfermedades a nivel mundial sugiere que la problemática de cada región es distinta, tanto por cuestiones de manejo, como por condiciones de suelo y clima. Por lo anterior, y dado que la pudrición del florete puede ser ocasionada por diferentes patógenos, es fundamental identificar y caracterizar a los microorganismos asociados con la pudrición de florete en cada región. Esto permitiría generar información sobre la frecuencia e importancia de dichos patógenos, con la finalidad de hacer un diagnóstico correcto de la enfermedad, ya que de esto depende, en gran medida, la elección de un método de manejo apropiado que pueda evitar daños y pérdidas severas del cultivo.

Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue identificar, morfológica y molecularmente, a los agentes causales de la pudrición del florete de brócoli en los municipios de León, San Francisco del Rincón, Valle de Santiago, Abasolo, Juventino Rosas y Dolores Hidalgo del estado de Guanajuato, México.

## Materiales y métodos

### Colecta de muestras

Durante julio y agosto de 2017, se colectaron 64 floretes de brócoli de la variedad Avenger (Compañía Sakata), en etapa de cosecha con síntomas de pudrición, en los municipios de León (16 floretes), San Francisco del Rincón (10 floretes), Valle de Santiago (12 floretes), Abasolo (9 floretes), Juventino Rosas (9 floretes) y Dolores Hidalgo (8 floretes), Guanajuato, México. Las muestras se trasladaron al laboratorio de microbiología de la Universidad Politécnica de Pénjamo. A su llegada, las muestras se almacenaron a 4 °C y se procesaron en un periodo máximo de 24 h.

### Aislamiento e identificación morfológica del agente causal

Los floretes colectados se lavaron con agua corriente y se realizaron cortes de tejido para la prueba de flujo bacteriano, la cual consistió en colocar los trozos en un tubo de ensayo que contenía 3 mL de agua destilada estéril y agitar por 5 min (Jiménez, Contreras, & Nass, 2004).

Descartada la presencia de flujo bacteriano, se realizaron aislamientos. Para ello, se tomaron secciones pequeñas (1 cm<sup>2</sup>) de cada florete de brócoli,

Three groups of fungal strains with different characteristics were isolated from broccoli samples with head rot symptoms. One group presented morphological characteristics similar to *Alternaria alternata* (AA) (Chen & Zhong, 2017), while the other two were identified as *Fusarium oxysporum* (FO) (Leslie & Summerell, 2006) and *Fusarium verticillioides* (FV) (Morales-Rodríguez, Yáñez-Morales, Silva-Rojas, García-de los Santos, & Guzmán-de Peña, 2007). Two representative isolates were selected from each group to perform the pathogenicity tests.

### Pathogenicity tests

Healthy Avenger variety broccoli plants (Sakata Seed Corporation) produced under greenhouse conditions ( $28 \pm 2$  °C and 70 % relative humidity) were used. For this, broccoli seeds were sown in plastic pots containing a substrate mixture of peat moss, perlite and vermiculite, at a ratio of 70, 20 and 10 % (v/v), respectively. The plants were constantly irrigated with distilled water and fertilized twice a week ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  N,  $44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  P and  $83 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  K), until floret development, at which time the isolates were inoculated.

Inoculation was carried out with selected isolates of AA (León and San Francisco del Rincón), FO (Juventino Rosas and Dolores Hidalgo) and FV (Juventino Rosas and Valle de Santiago), grown in calcium carbonate culture medium for AA, and PDA medium for FO and FV. After 15 days of incubation at 28 °C, conidial suspensions were prepared in sterile distilled water at a concentration of  $1 \times 10^6$  conidia·mL<sup>-1</sup>. For inoculation, a wound was made on the surface of each floret (dome) with a sterile hypodermic needle, and 100 µL of each conidial suspension was placed on each wound.

Ten plants per inoculated isolate and 10 control plants (which were wounded similarly to those described above, but inoculated with sterile distilled water) were used in a completely randomized arrangement. All plants were covered with transparent polyethylene bags to ensure high relative humidity (close to 100 %) and facilitate the infection process. At 72 h, the bags were removed and the plants were kept in the greenhouse under the conditions described above ( $28 \pm 2$  °C and 70 % relative humidity) until symptom development. The trial was conducted in triplicate. At the end of each experiment (25 days post-inoculation), fungi were re-isolated from infected florets to complete Koch's postulates.

### DNA extraction

From purified isolates, DNA extraction was performed using the 3 % CTAB protocol (Zhang, Uyemoto, & Kirkpatrick, 1998), with some modifications. A piece

se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se colocaron en papel secante esterilizado. Posteriormente, los trozos se colocaron en cajas de Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a 28 °C durante 7 días. Cada colonia fúngica desarrollada se aisló y purificó mediante cultivo monospórico.

De las muestras de brócoli, con síntomas de pudrición del florete, se aislaron tres grupos de cepas fúngicas con características diferentes. Un grupo presentó características morfológicas similares a *Alternaria alternata* (AA) (Chen & Zhong, 2017), mientras que los otros dos se identificaron como *Fusarium oxysporum* (FO) (Leslie & Summerell, 2006) y *Fusarium verticillioides* (FV) (Morales-Rodríguez, Yáñez-Morales, Silva-Rojas, García-de los Santos, & Guzmán-de Peña, 2007). De cada grupo se seleccionaron dos aislamientos representativos para realizar las pruebas de patogenicidad.

### Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron plantas sanas de brócoli variedad Avenger (Compañía Sakata) producidas bajo condiciones de invernadero ( $28 \pm 2$  °C y humedad relativa de 70 %). Para ello, se sembraron semillas de brócoli en macetas de plástico que contenían una mezcla de sustrato de peat moss, perlita y vermiculita, en una proporción de 70, 20 y 10 % (v/v), respectivamente. Las plantas se regaron constantemente con agua destilada y se fertilizaron dos veces por semana ( $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de N,  $44 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de P y  $83 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de K), hasta el desarrollo del florete, momento en el cual se inocularon los aislados.

La inoculación se realizó con los aislamientos seleccionados de AA (León y San Francisco del Rincón), FO (Juventino Rosas y Dolores Hidalgo) y FV (Juventino Rosas y Valle de Santiago), desarrollados en medio de cultivo carbonato de calcio para AA, y medio PDA para FO y FV. Después de 15 días de incubación a 28 °C, se prepararon suspensiones conidiales en agua destilada estéril a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios·mL<sup>-1</sup>. Para la inoculación, se realizó una herida sobre la superficie de cada florete (domo) con una aguja hipodérmica esterilizada, y se colocaron 100 µL de cada suspensión conidial sobre cada herida.

Se utilizaron 10 plantas por aislado inoculado y 10 plantas como testigo (a las cuales se les realizaron heridas similares a las descritas con anterioridad, pero se inocularon con agua destilada estéril), bajo un arreglo completamente al azar. Todas las plantas se cubrieron con bolsas de polietileno transparente para asegurar una alta humedad relativa (cercana al 100 %) y facilitar el proceso de infección. A las 72 h se retiraron las bolsas y las plantas se mantuvieron en el invernadero bajo las condiciones descritas anteriormente ( $28 \pm 2$  °C y



of mycelium was transferred to a 1.5 mL tube and macerated with 800  $\mu\text{L}$  of CTAB extraction buffer (3 % hexadecyltrimethylammonium bromide, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH of 8 and 0.2 % mercapto-ethanol) preheated to 60 °C; the mixture was then incubated at 60 °C for 30 min. Samples were extracted with chloroform-isoamyl alcohol (24:1), 15  $\mu\text{L}$  of RNase A (1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) was added and incubated at 37 °C for 10 min. The aqueous DNA layer was precipitated with 600  $\mu\text{L}$  of isopropanol at -20 °C. The DNA pellet was washed with 70% ethanol and dried at room temperature.

The amount and purity of the DNA samples were evaluated using a NanoDrop spectrophotometer (ND-1000-UV-Vis, NanoDrop Technologies, USA). Finally, the DNA obtained was stored at -20 °C for later analysis.

### Molecular identification of the causal agent

For the amplification of the internal transcribed spacer (ITS) regions of the DNA of the isolates obtained, the polymerase chain reaction (PCR) technique was used with the universal primers ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), which amplify a region of 500 to 750 bp (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).

PCR was performed in 0.2 mL eppendorf tubes, with a total reaction volume of 25  $\mu\text{L}$  containing 1  $\mu\text{L}$  of DNA, 1X of buffer, 2 mM of  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{M}$  of each primer, 0.2 mM of each triphosphate nucleotide (dNTP) and 1 unit of Taq polymerase (Invitrogen Life Technologie, Brazil). The reaction was carried out in an automatic thermal cycler (C1000 Thermal Cycler, BioRad, USA), with a denaturation cycle at 95 °C for 4 min, 30 successive three-step PCR cycles (denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 60 °C for 1 min and elongation at 72 °C for 2 min) and a final extension cycle at 72 °C for 5 min.

PCR products were analyzed by electrophoresis in 1 % agarose gels, stained with ethidium bromide (2  $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), and visualized in a UV transilluminator (Gel Doc XR+ Gel Documentation System, Bio-Rad, USA). Finally, PCR products were purified with the E.Z.N.A® Cycle Pure Kit (P692-02, Omega, USA), following the manufacturer's specifications, and sequenced (ABI PRISM 377, Applied Biosystems, USA). The sequences obtained were compared against all those reported in the NCI gene bank database (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) using the BLAST program.

### Phylogenetic analysis

The Clustal W method (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) was used to align the ITS sequences of the *Fusarium* isolates, together with 27 representative sequences of different species of that genus reported in

humedad relativa de 70 %) hasta el desarrollo de los síntomas. El ensayo se realizó por triplicado. Al final de cada experimento (25 días post-inoculación), los hongos se reaislaron de los floretes infectados para completar los postulados de Koch.

### Extracción de ADN

A partir de aislados purificados, se realizó la extracción de ADN utilizando el protocolo de CTAB al 3 % (Zhang, Uyemoto, & Kirkpatrick, 1998), con algunas modificaciones. Se transfirió un trozo de micelio a un tubo de 1.5 mL y se maceró con 800  $\mu\text{L}$  de buffer de extracción CTAB (3 % de bromuro de hexadeciltrimetilamonio, 1.4 M de NaCl, 20 mM de EDTA, 100 mM de Tris-HCl, pH de 8 y 0.2 % de mercapto-etanol) precalentado a 60 °C; posteriormente, la mezcla se incubó a 60 °C durante 30 min. Las muestras se extrajeron con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se les agregaron 15  $\mu\text{L}$  de RNase A (1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) y se incubaron a 37 °C durante 10 min. La capa acuosa de ADN se precipitó con 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol a -20 °C. La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70 % y se secó a temperatura ambiente.

La cantidad y la pureza de las muestras de ADN se evaluó por medio de un espectrofotómetro NanoDrop (ND-1000-UV-Vis, NanoDrop Technologies, EUA). Finalmente, el ADN obtenido se almacenó a -20 °C para su posterior análisis.

### Identificación molecular del agente causal

Para la amplificación de las regiones del espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN de los aislados obtenidos, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con los primers universales ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC3'), los cuales amplifican una región de 500 a 750 pb (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990).

La PCR se realizó en tubos eppendorf de 0.2 mL, con un volumen total de reacción de 25  $\mu\text{L}$  que contenía 1  $\mu\text{L}$  de ADN, 1X de buffer, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu\text{M}$  de cada primer, 0.2 mM de cada nucleótido trifosfatado (dNTP) y 1 unidad de Taq polimerasa (Invitrogen Life Technologie, Brasil). La reacción se llevó a cabo en un termociclador automático (C1000 Thermal Cycler, BioRad, EUA), con un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 4 min, 30 ciclos sucesivos de PCR de tres fases (desnaturalización a 95 °C durante 1 min, alineación a 60 °C durante 1 min y elongación a 72 °C durante 2 min) y ciclo de extensión final a 72 °C durante 5 min.

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %, teñidos con bromuro de etidio (2  $\text{mg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ), y visualizados en un

the NCBI gene bank. *Alternaria alternata* ITS sequences were also aligned with other *Alternaria* species in the gene bank. Phylogenetic trees were built by the maximum likelihood method using MEGA version 11 software (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021). Node stability was estimated by bootstrap analysis of 1,000 replicates.

## Results and discussion

### Isolation and morphological identification of the causal agent

Of the 64 broccoli florets with rot symptoms collected in the field (Figure 1), 185 fungal isolates were obtained: 102 were identified as *Alternaria alternata* and 83 showed characteristics of the genus *Fusarium* (35 were identified as *Fusarium oxysporum* and 48 as *Fusarium verticillioides*).

The fungus *A. alternata* was isolated with a frequency of 55 % and presented the following morphological characteristics on PDA medium: brown or dark olive green mycelium (Figure 2A), and obclavate, muriform, elliptical or ovoid conidia in chains (from 1

transiluminador UV (Gel Doc XR+ Gel Documentation System, Bio-Rad, EUA). Finalmente, los productos de la PCR se purificaron con el kit de E.Z.N.A® Cycle Pure (P692-02, Omega, EUA), siguiendo las especificaciones del fabricante, y se secuenciaron (ABI PRISM 377, Applied Biosystems, EUA). Las secuencias obtenidas se compararon contra todas las reportadas en la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information, [www.ncbi.nih.gov](http://www.ncbi.nih.gov)) mediante el programa BLAST.

### Análisis filogenético

El método Clustal W (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) se utilizó para alinear las secuencias ITS de los aislados de *Fusarium*, junto con 27 secuencias representativas de distintas especies de ese género reportadas en el banco de genes del NCBI. Las secuencias ITS de *Alternaria alternata* también se alinearon con otras especies de *Alternaria* del banco de genes. Los árboles filogenéticos se construyeron por el método de máxima verosimilitud utilizando el programa MEGA versión 11 (Tamura, Stecher, & Kumar, 2021). La estabilidad de los nodos se estimó por análisis de confianza (bootstrap) de 1,000 réplicas.



Figure 1. Symptoms associated with broccoli head rot in Guanajuato, Mexico.

Figura 1. Síntomas asociados con la pudrición del florete de brócoli en Guanajuato, México.



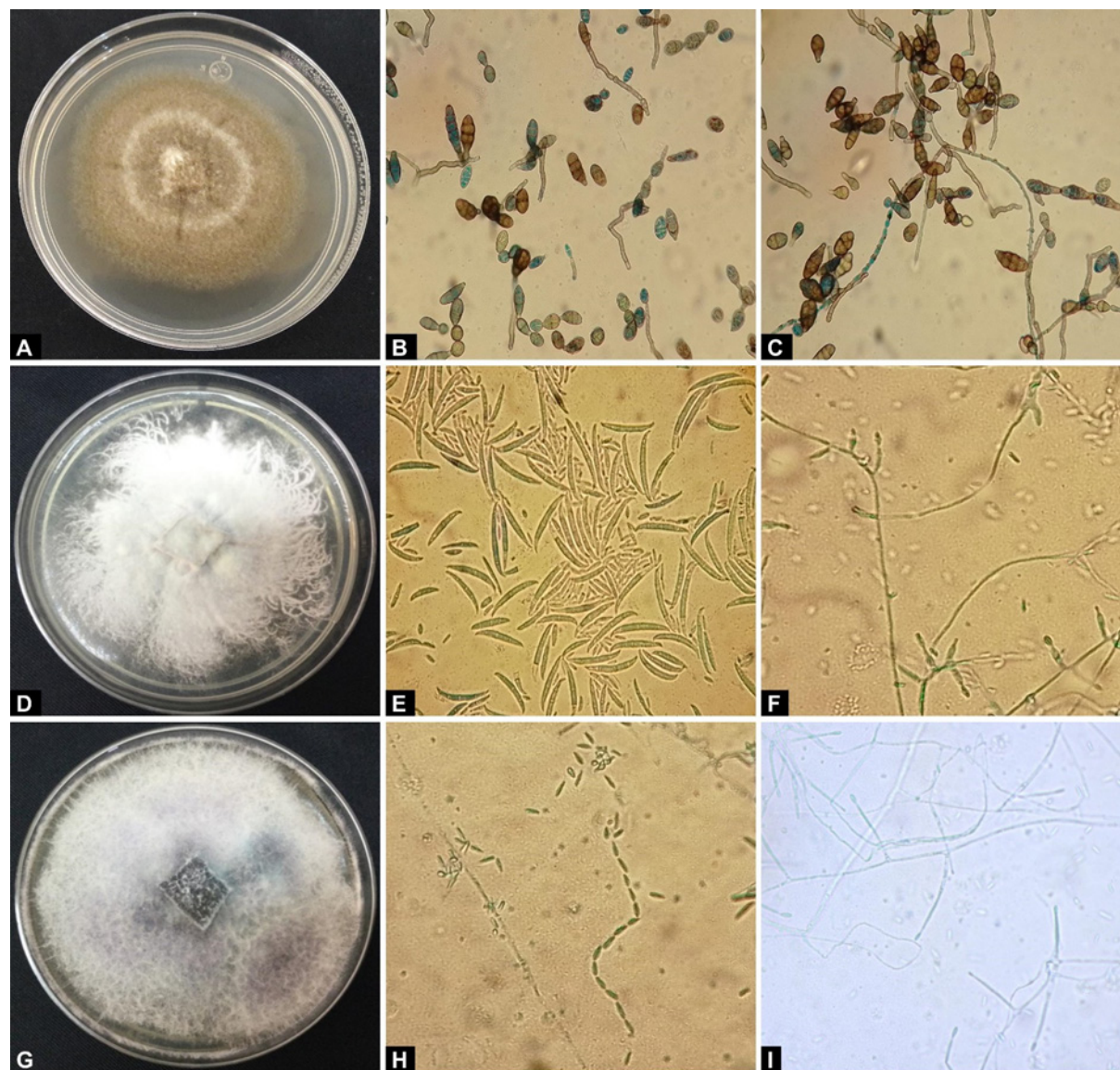
to 5 transverse and 0 to 3 longitudinal septa, 13.22 to 50.30  $\mu\text{m}$  long and 8.7 to 13.3  $\mu\text{m}$  wide) (Figure 2B and 2C) (Chen & Zhong, 2017).

For fungi of the genus *Fusarium*, *F. oxysporum* was isolated with a frequency of 19 % and presented the following morphological characteristics on PDA medium: pink mycelium (Figure 2D), elongated, curved macroconidia with pointed ends (with three to five

## Resultados y discusión

### Aislamiento e identificación morfológica del agente causal

De los 64 floretes de brócoli con síntomas de pudrición colectados en campo (Figura 1), se obtuvieron 185 aislados fúngicos: 102 se identificaron como *Alternaria alternata* y 83 presentaron características del género *Fusarium*



**Figure 2.** Macroscopic and microscopic analysis of fungal isolates causing broccoli head rot: A) mycelial growth of *A. alternata* (isolate L1-3F-A4) on PDA medium, B) and C) typical morphological characteristics of *A. alternata*, D) mycelial growth of *F. oxysporum* (isolate L1-8F-A1) on PDA medium, E) and F) typical morphological characteristics of *F. oxysporum*, G) mycelial growth of *F. verticillioides* (isolate L7-5F-A3) on PDA medium, and H) and I) typical morphological characteristics of *F. verticillioides*.

**Figura 2.** Análisis macroscópico y microscópico de aislamientos fúngicos causantes de la pudrición de brócoli: A) crecimiento micelial de *A. alternata* (aislado L1-3F-A4) en medio PDA, B) y C) características morfológicas típicas de *A. alternata*, D) crecimiento micelial de *F. oxysporum* (aislado L1-8F-A1) en medio PDA, E) y F) características morfológicas típicas de *F. oxysporum*, G) crecimiento micelial de *F. verticillioides* (aislado L7-5F-A3) en medio PDA, y H) e I) características morfológicas típicas de *F. verticillioides*.

cells of 28.76 to 40.5  $\mu\text{m}$  long and 3.9 to 4.2  $\mu\text{m}$  wide) (Figure 2E), oval-shaped microconidia (5.2 to 7.5  $\mu\text{m}$  long and 1.81 to 2.2  $\mu\text{m}$  wide) and short phialides (Figure 2F). According to these cultural and morphological characteristics, the isolates were identified as *Fusarium oxysporum* (Leslie & Summerell, 2006).

In the case of *F. verticillioides*, it was isolated with a frequency of 26 % and presented the following characteristics on PDA medium: white mycelium with a purple hue in the center of the dish (Figure 2G), few macroconidia (when present they were long, slightly straight, and with a curved apical cell and another foot-shaped basal cell with three to five septa), abundant microconidia (in long, oval chains with a flattened base) (Figure 2H and 2I) and absent chlamydospores (Morales-Rodríguez et al., 2007).

Based on these results, it can be inferred that the main phytopathogenic agent causing head rot in broccoli crops in the state of Guanajuato is *A. alternata*, with an isolation frequency of more than half (55 %) of the samples analyzed in this study. In this sense, it is important to note that the presence of bacteria was not detected in any of the samples analyzed by means of the bacterial flow test.

### Pathogenicity tests

Broccoli florets inoculated with conidial suspensions of isolates AA, FO and FV showed rotting symptoms (Figure 3A, 3B and 3C). The development of small dark lesions started 10 days after inoculation, and these increased in size until they covered the entire floret 20 to 25 days post-inoculation. Control florets did not develop disease symptoms (Figure 3D).

To comply with Koch's postulates, isolates were made from symptomatic tissue; AA, FO and FV were re-isolated from inoculated tissue, thus confirming their pathogenicity and their importance as causal agents of broccoli head rot in the municipalities of Guanajuato evaluated in the present study.

*Alternaria alternata* is mainly a saprophytic fungus common in soil and decaying plant tissue (Thoma, 2003). However, it has been reported as a pathogen of different agronomically important crops around the world, such as potato in Israel (Droby, Dinoor, Prusky, & Barkai-Golan, 1984), tomato in California (Morris, Connolly, & Clair, 2000), peach in Japan (Inoue & Nasu, 2000) and citrus in China (Huang et al., 2015), in which it induces symptoms such as leaf spots, fruit lesions, dark sunken spots on fruit, blight on branches, and fruit and young leaf drop, among other symptoms. In China, *A. alternata* has been reported as one of the main pathogens of broccoli, leading to chlorosis and rotting, which causes increased senescence and a

(35 se identificaron como *Fusarium oxysporum* y 48 como *Fusarium verticillioides*).

El hongo *A. alternata* se aisló con una frecuencia del 55 % y presentó las siguientes características morfológicas en medio PDA: micelio de color café o verde oliva oscuro (Figura 2A), conidios obclavados, muriformes, elípticos u ovoides en cadenas (de 1 a 5 septas transversales y 0 a 3 longitudinales, de 13.22 a 50.30  $\mu\text{m}$  de largo y de 8.7 a 13.3  $\mu\text{m}$  de ancho) (Figura 2B y 2C) (Chen & Zhong, 2017).

Para los hongos del género *Fusarium*, *F. oxysporum* se aisló con una frecuencia del 19 % y presentó las siguientes características morfológicas en medio PDA: micelio de color rosa (Figura 2D), macroconidios alargados, curvos y extremos puntiagudos (con tres a cinco células de 28.76 a 40.5  $\mu\text{m}$  de largo y 3.9 a 4.2  $\mu\text{m}$  de ancho) (Figura 2E), microconidios de forma oval (de 5.2 a 7.5  $\mu\text{m}$  de largo y 1.81 a 2.2  $\mu\text{m}$  de ancho) y filídes cortas (Figura 2F). De acuerdo con estas características culturales y morfológicas, los aislados se identificaron como *Fusarium oxysporum* (Leslie & Summerell, 2006).

En el caso de *F. verticillioides*, éste se aisló con una frecuencia del 26 % y presentó las siguientes características en medio PDA: micelio de color blanco con tonalidad púrpura en el centro de la caja (Figura 2G), macroconidios escasos (cuando presentes fueron largos, ligeramente rectos, y célula apical curva y otra basal en forma de pie con tres a cinco septas), microconidios abundantes (en cadenas largas, ovaladas y base aplanada) (Figura 2H y 2I) y clamidosporas ausentes (Morales-Rodríguez et al., 2007).

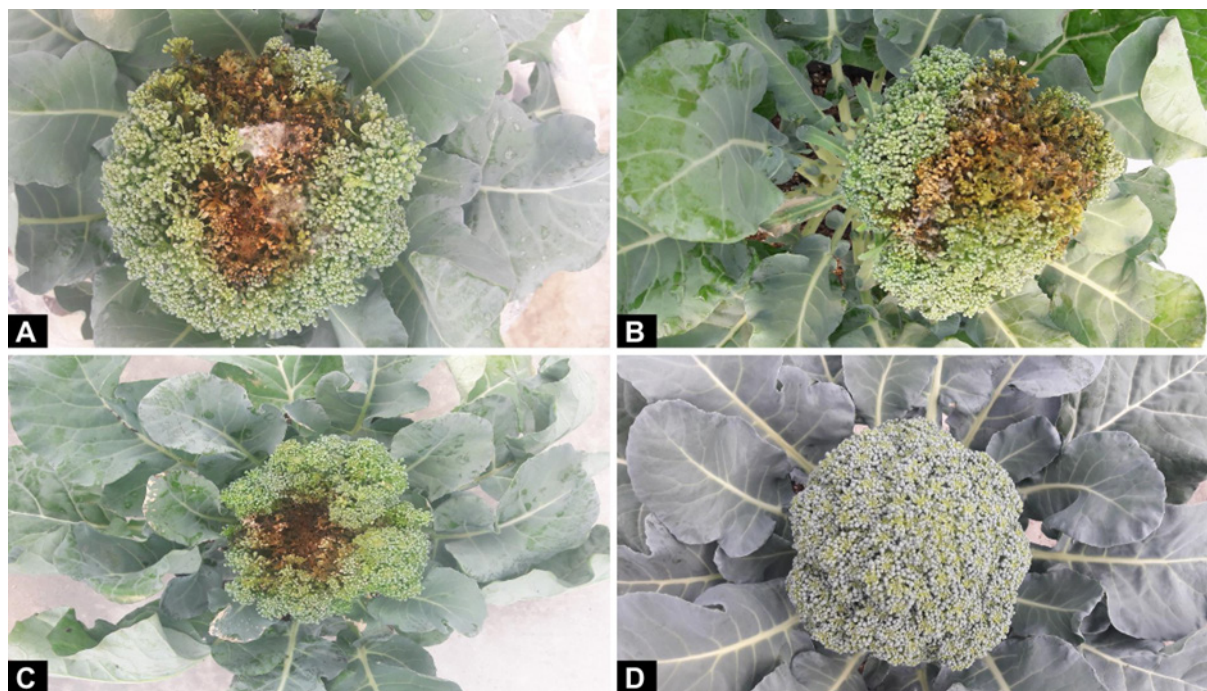
Con base en estos resultados, se puede inferir que el principal agente fitopatógeno que causa la pudrición del florete en el cultivo del brócoli en el estado de Guanajuato es *A. alternata*, con una frecuencia de aislamiento de más de la mitad (55 %) de las muestras analizadas en este estudio. En este sentido, es importante mencionar que no se detectó la presencia bacterias en ninguna muestra analizada, esto mediante la prueba de flujo bacteriano.

### Pruebas de patogenicidad

Los floretes de brócoli inoculados con suspensiones conidiales de los aislados AA, FO y FV mostraron síntomas de pudrición (Figura 3A, 3B y 3C). El desarrollo de pequeñas lesiones oscuras inició 10 días después de la inoculación, y éstas aumentaron de tamaño hasta cubrir todo el florete entre los 20 y 25 días post-inoculación. Los floretes testigo no desarrollaron síntomas de la enfermedad (Figura 3D).

Para cumplir con los postulados de Koch, se realizaron aislamientos a partir de tejido sintomático; AA, FO





**Figure 3.** Symptoms induced by inoculation of phytopathogenic fungi in broccoli florets: A) broccoli head rot induced by *A. alternata* (isolate L1-3F-A4), B) broccoli head rot induced by *F. oxysporum* (isolate L1-8F-A1), C) broccoli head rot induced by *F. verticillioides* (isolate L7-5F-A3) and D) control plant.

**Figura 3.** Sintomatología inducida por inoculación de hongos fitopatógenos en floretes de brócoli: A) pudrición en brócoli inducida por *A. alternata* (aislado L1-3F-A4), B) pudrición en brócoli inducida por *F. oxysporum* (aislado L1-8F-A1), C) pudrición en brócoli inducida por *F. verticillioides* (aislado L7-5F-A3) y D) planta control.

shorter shelf life of the product (Guo et al., 2015). In addition to the floret, this fungus can severely affect broccoli foliage, causing circular leaf spots with concentric rings surrounded by a yellow halo, which causes significant economic losses of this vegetable (Nira et al., 2022).

In Mexico, *A. alternata* and *F. oxysporum* have been reported as causal agents of rotting or spotting of broccoli (Fraire-Cordero et al., 2010), specifically in the municipality of Apaseo el Grande, Guanajuato. This report also highlights the presence of *Alternaria tenuissima* as the causal agent of the disease, which contrasts with the results of the present study, since *Fusarium verticillioides* was detected for the first time as part of the complex of causal agents of the disease and not the fungus *Alternaria tenuissima*. Fraire-Cordero et al. (2010) reported that the isolation frequency of the genus *Alternaria* ranged between 70 and 80 %, and of the genus *Fusarium* between 20 and 30 %. This differs from our research, where a lower isolation frequency (55 %) was found for AA and a higher frequency (45 %) for the genus *Fusarium* (FO and FV). This may be due to the fact that in the present study the sampling covered a wider region of broccoli-producing areas in the state of Guanajuato (León, San Francisco del Rincón, Valle de Santiago, Abasolo, Juventino Rosas and Dolores

y FV fueron reaislados a partir de tejido inoculado, confirmando así su patogenicidad y su importancia como agentes causales de la pudrición del florete en brócoli en los municipios de Guanajuato evaluados en el presente estudio.

*Alternaria alternata* es, principalmente, un hongo saprófito común en suelo y tejido vegetal en descomposición (Thoma, 2003). No obstante, ha sido reportado como patógeno de diferentes cultivos de importancia agronómica alrededor del mundo, como la papa en Israel (Droby, Dinor, Prusky, & Barkai-Golan, 1984), el tomate en California (Morris, Connolly, & Clair, 2000), el durazno en Japón (Inoue & Nasu, 2000) y los cítricos en China (Huang et al., 2015), en los cuales induce síntomas como manchas foliares, lesiones en frutos, manchas hundidas oscuras en frutos, tizones en ramas, caída de frutos y hojas jóvenes, entre otros síntomas. En China, *A. alternata* ha sido reportado como uno de los principales patógenos del brócoli, al causar clorosis y pudriciones, lo cual provoca una mayor senescencia y una menor vida útil del producto (Guo et al., 2015). Además del florete, este hongo puede afectar severamente al follaje del brócoli, provocando manchas foliares circulares con anillos concéntricos rodeados de un halo amarillo, lo cual causa pérdidas económicas importantes de esta hortaliza (Nira et al., 2022).

Hidalgo), compared to only one municipality (Apaseo el Grande).

The identification of *Fusarium oxysporum* and *F. verticillioides*, as causal agents of broccoli head rot, represents an important step in the search for strategies that can minimize the impact on production. In Brassica vegetables, *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) is one of the most important and devastating diseases in cabbage, cauliflower and broccoli around the world (Mehraj et al., 2020). In these crops, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* causes leaf yellowing, wilting, defoliation, and eventually death of infected plants (Liu, Fang, Yang, Zhang, & Lv, 2018; Mehraj et al., 2020). In contrast, Fraire-Cordero et al. (2010) reported *Fusarium oxysporum* as a causal agent of floret spotting and rot symptoms in broccoli in Guanajuato, Mexico, which coincides with the results of our study, since *F. oxysporum* is one more member of the fungal complex associated with head rot in our country, so this would be the second report of the presence of this pathogen as a causal agent of the disease.

*Fusarium verticillioides* has been identified mainly as a pathogen in corn, where it produces toxins in the tissue and grain that harm the health of animals and humans (Duncan & Howard, 2010; Oren, Ezrati, Cohen, & Sharon, 2003). However, this fungus has also been reported in other crops. Akram et al. (2020) made the first report of this pathogen on Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. *parachinensis*), where it produces rotting symptoms on leaves and flowers. Additionally, in the present study, pathogenicity tests with *Fusarium verticillioides*, isolated from florets with rot symptoms, confirmed that this fungus is part of the complex of causal agents of this disease, this being the first report in Mexico and the world.

### Molecular identification of the causal agent

PCR amplification of DNA extracted from the isolates yielded amplicons of approximately 546 and 573 bp from the ITS region of *Fusarium* spp. and *Alternaria alternata*, respectively (data not shown). A portion of the purified PCR products were directly sequenced in both directions with the primers ITS1 and ITS4. DNA sequences obtained from representative isolates were deposited in the NCBI gene bank and the following accession numbers were obtained: OL721612, OL721613 and OL721614, for isolates L7-5F-A3, L1-8F-A1 and L1-3F-A4, respectively.

BLAST analysis revealed that the sequence of isolate L7-5F-A3 shares the highest similarity percentages (98.9 to 98.72 %) with *Fusarium verticillioides* strains isolated in India (accession numbers MN652651.1,

En México, *A. alternata* y *F. oxysporum* han sido reportados como agentes causales de la pudrición o manchado del brócoli (Fraire-Cordero et al., 2010), específicamente en el municipio de Apaseo el Grande, Guanajuato. En dicho reporte también se destaca la presencia de *Alternaria tenuissima* como agente causal de la enfermedad, lo cual contrasta con los resultados de la presente investigación, ya que se detectó por primera vez a *Fusarium verticillioides* como parte del complejo de agentes causales de la enfermedad y no al hongo *A. tenuissima*. Fraire-Cordero et al. (2010) reportaron que la frecuencia de aislamiento del género *Alternaria* osciló entre el 70 y 80 %, y del género *Fusarium* entre el 20 y 30 %. Lo anterior difiere con nuestra investigación, en donde se encontró una frecuencia de aislamiento menor (55 %) para AA y una frecuencia mayor (45 %) para el género *Fusarium* (FO y FV). Esto se puede deber a que en el presente estudio el muestreo abarcó una región más amplia de zonas productoras de brócoli del estado de Guanajuato (León, San Francisco del Rincón, Valle de Santiago, Abasolo, Juventino Rosas y Dolores Hidalgo), en comparación con un solo municipio (Apaseo el Grande).

La identificación de *Fusarium oxysporum* y *F. verticillioides*, como agentes causales de la pudrición del florete de brócoli, representa un paso importante en la búsqueda de estrategias que puedan minimizar el impacto en la producción. En Brassicas, la marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*) es una de las enfermedades más importantes y devastadoras en repollo, coliflor y brócoli alrededor del mundo (Mehraj et al., 2020). En estos cultivos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* causa amarillamiento de las hojas, marchitez, defoliación y, eventualmente, la muerte de las plantas infectadas (Liu, Fang, Yang, Zhang, & Lv, 2018; Mehraj et al., 2020). En contraste, Fraire-Cordero et al. (2010) reportaron a *Fusarium oxysporum* como agente causal de síntomas del manchado y pudrición de florete en brócoli en Guanajuato, México, lo cual coincide con los resultados de nuestro estudio, ya que *F. oxysporum* es un miembro más del complejo de hongos asociados con la pudrición del florete en nuestro país, por lo que este sería el segundo reporte de la presencia de este patógeno como agente causal de la enfermedad.

El *Fusarium verticillioides* se ha identificado, principalmente, como patógeno en el cultivo del maíz, en donde produce toxinas en el tejido y grano que dañan la salud de animales y humanos (Duncan & Howard, 2010; Oren, Ezrati, Cohen, & Sharon, 2003). Sin embargo, este hongo también ha sido reportado en otros cultivos. Akram et al. (2020) realizaron el primer reporte de este patógeno en col china (*Brassica rapa* L. *parachinensis*), en donde produce síntomas de pudrición en hojas y flores. Adicionalmente, en el presente



MN652650.1, MN652649.1, MN652645.1, MN652644.1 and MN652643.1), Canada (accession number MG515226.1), China (accession numbers MW928602.1 and MW386816.1), Jordan (accession numbers MN335235.1, MN335234.1, MN335233.1, MN335232.1 and MN335231.1) and Nigeria (accession number MT742824.1).

Isolate L1-8F-A1 showed 99.63 % identity with *Fusarium oxysporum* isolates identified in Kenya, China, India and Nigeria (accession numbers MT420633.1, MH707084.1, KU671046.1 and MW260086.1, respectively). Finally, the sequence of isolate L1-3F-A4 showed 98.26 % similarity with *Alternaria alternata* strains identified in Pakistan (accession number MN548780.1) and China (accession numbers MH892844.1 and KY397985.1). The above confirms the results found with morphological identification.

Other phytopathogens have been reported in different regions of the world as causing rot symptoms in broccoli, such as the bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Li et al., 2009), *Alternaria brassicicola* (Liu et al., 2009), *Alternaria alternata* (Fraire-Cordero et al., 2010; Guo et al., 2015), *Alternaria tenuissima*, *Fusarium oxysporum* (Fraire-Cordero et al., 2010) and *Fusarium tricinctum* (Zhao et al., 2018). The present investigation confirms the presence of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* as causal agents of broccoli head rot, and reports for the first time *Fusarium verticillioides* as a causal agent of the disease in crop fields in Guanajuato. This result reinforces the need for accurate identification and characterization of phytopathogens associated with diseases in each region for the development of more efficient management strategies.

### Phylogenetic analysis

The sequences of the ITS regions of *Fusarium* isolates associated with rotting symptoms were compared with 27 representative sequences of different species of that genus reported in the NCBI gene bank (Figure 4A). *Alternaria alternata* ITS sequences were also aligned with other *Alternaria* species in the gene bank (Figure 4B), and in both cases *Penicillium* spp. was used as an outgroup. The analysis indicated that isolates L1-8F-A1, L7-5F-A3 and L1-3F-A4 were grouped in the same phylogenetic branch as strains belonging to *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides* and *Alternaria alternata*, respectively, which is consistent with the results found in the morphological and molecular identification.

### Conclusion

Based on cultural, morphological and molecular characteristics, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium verticillioides* were identified as causal

estudio, las pruebas de patogenicidad con *Fusarium verticillioides*, aislado a partir de floretes con síntomas de pudrición, confirmaron que este hongo forma parte del complejo de agentes causales de esta enfermedad, siendo este el primer reporte en México y en el mundo.

### Identificación molecular del agente causal

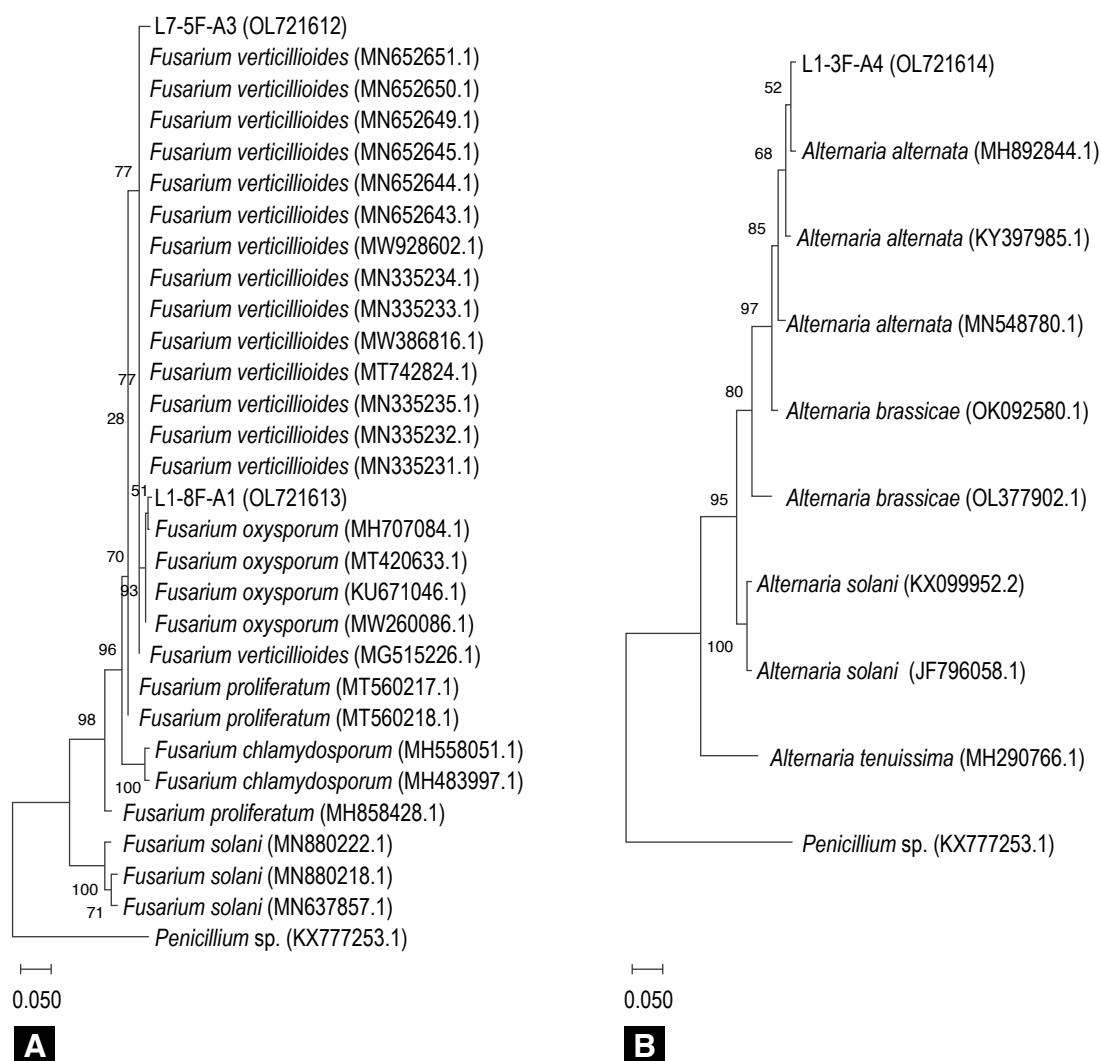
La amplificación por PCR del ADN extraído de los aislados permitió obtener amplicones de aproximadamente 546 y 573 pb de la región ITS de *Fusarium* spp. y *Alternaria alternata*, respectivamente (datos no mostrados). Una parte de los productos de PCR purificados fueron secuenciados directamente en ambas direcciones con los primers ITS1 e ITS4. Las secuencias de ADN obtenidas de aislados representativos se depositaron en el banco de genes del NCBI y se obtuvieron los siguientes números de acceso: OL721612, OL721613 y OL721614, para los aislados L7-5F-A3, L1-8F-A1 y L1-3F-A4, respectivamente.

El análisis BLAST reveló que la secuencia del aislado L7-5F-A3 comparte los mayores porcentajes de similitud (98.9 a 98.72 %) con cepas de *Fusarium verticillioides* aisladas en India (números de accesión MN652651.1, MN652650.1, MN652649.1, MN652645.1, MN652644.1 y MN652643.1), Canadá (número de accesión MG515226.1), China (números de accesión MW928602.1 y MW386816.1), Jordania (números de accesión MN335235.1, MN335234.1, MN335233.1, MN335232.1 y MN335231.1) y Nigeria (número de accesión MT742824.1).

El aislado L1-8F-A1 mostró 99.63 % de identidad con aislados de *Fusarium oxysporum* identificados en Kenia, China, India y Nigeria (números de accesión MT420633.1, MH707084.1, KU671046.1 y MW260086.1, respectivamente). Finalmente, la secuencia del aislado L1-3F-A4 presentó 98.26 % de similitud con cepas de *Alternaria alternata* identificadas en Pakistán (número de accesión MN548780.1) y China (números de accesión MH892844.1 y KY397985.1). Lo anterior confirma los resultados encontrados con la identificación morfológica.

Han sido reportados otros fitopatógenos en diferentes regiones del mundo como causantes de síntomas de pudrición en brócoli, tales como la bacteria *Pseudomonas fluorescens* (Li et al., 2009), *Alternaria brassicicola* (Liu et al., 2009), *Alternaria alternata* (Fraire-Cordero et al., 2010; Guo et al., 2015), *Alternaria tenuissima*, *Fusarium oxysporum* (Fraire-Cordero et al., 2010) y *Fusarium tricinctum* (Zhao et al., 2018). En la presente investigación se confirma la presencia de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* como agentes causales de la pudrición del florete de brócoli, y se reporta por primera vez a *Fusarium verticillioides* como agente causal de la enfermedad en campos de cultivo en Guanajuato.





**Figure 4.** Maximum likelihood phylogenetic trees based on ITS sequences showing the phylogenetic relationships of isolates L1-8F-A1, L7-5F-A3 and L1-3F-A4 with other *Fusarium* (A) and *Alternaria* (B) species. *Penicillium* spp. (KY777253.1) was included as an outgroup. Bootstrap values are indicated at the nodes. Sequence accession numbers are shown in parentheses.

**Figura 4.** Árboles filogenéticos de máxima verosimilitud basados en secuencias ITS que muestran las relaciones filogenéticas de los aislados L1-8F-A1, L7-5F-A3 y L1-3F-A4 con otras especies de *Fusarium* (A) y *Alternaria* (B). *Penicillium* spp. (KY777253.1) se incluyó como grupo externo. Los valores de Bootstrap están indicados en los nodos. Los números de accesiones de las secuencias se muestran entre paréntesis.

agents of broccoli head rot in the state of Guanajuato, Mexico. This is the second report of *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum* as causal agents of head rot in broccoli grown in Mexico, and the first report to identify *Fusarium verticillioides* as part of the complex of causal agents of this disease.

Este resultado refuerza la necesidad de identificación y caracterización precisa de los fitopatógenos asociados con las enfermedades en cada región para el desarrollo de estrategias de manejo más eficientes.

#### Análisis filogenético

Las secuencias de las regiones ITS de los aislados de *Fusarium* asociados con síntomas de pudrición se compararon con 27 secuencias representativas de distintas especies de ese género reportadas en el banco de genes del NCBI (Figura 4A). Las secuencias ITS de *Alternaria alternata* también se alinearon con otras

End of English version

## References / Referencias

- Akram, W., Ahmad, A., Juxian, G., Yasin, N. A., Akbar, M., Luo, W., ... & Li, G. (2020). Occurrence of head rot disease caused by *Fusarium verticillioides* on Chinese flowering cabbage (*Brassica rapa* L subsp. *parachinensis*) in China. *Crop Protection*, 134, 105180. doi: 10.1016/j.cropro.2020.105180
- Chen, Y., & Zhong, J. (2017). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot of *Aloe vera* in China. *Plant Disease*, 101(8), 1544-1544. doi: 10.1094/PDIS-04-12-0343-PDN
- Dillard, H. R., Cobb, A. C., & Lamboy, J. S. (1998). Transmission of *Alternaria brassicicola* to cabbage by flea beetles (*Phyllotreta cruciferae*). *Plant Disease*, 82(2), 153-157. doi: 10.1094/PDIS.1998.82.2.153
- Droby, S., Dinooor, A., Prusky, D., & Barkai-Golan, R. (1984). Pathogenicity of *Alternaria alternata* on potato in Israel. *Phytopathology*, 74(5), 537-542. doi: 10.1094/Phyto-74-537
- Duncan, K. E., & Howard, R. J. (2010). Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23(1), 6-16. doi: 10.1094/MPMI-23-1-0006
- Editorial Agro Cultivos S. C de R. L. de C. V. (EAC) (2017). Manejo integrado de enfermedades en brócoli. México: EAC. Retrieved from <https://www.horticultivos.com/cultivos/cruciferas/brocoli/manejo-integrado-de-enfermedades-en-brocoli/>
- Fraire-Cordero, M. L., Nieto-Ángel, D., Cárdenas-Soriano, E., Gutiérrez-Alonso, G., Bujanos-Muñoz, R., & Vaquera-Huerta, H. (2010). *Alternaria tenuissima*, *A. alternata* y *Fusarium oxysporum* hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28(1), 25-33. Retrieved from <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61214206003>
- Guo, H., Cui, Y., Zhu, E., Song, Z., & Wang, C. (2015). Effect of antagonistic yeast *Pichia membranaefaciens* on black spot decay of postharvest broccoli. *European Journal of Plant Pathology*, 143(2), 373-383. doi: 10.1007/s10658-015-0689-5
- Huang, F., Fu, Y., Nie, D., Stewart, J. E., Peever, T. L., & Li, H. (2015). Identification of a novel phylogenetic lineage of *Alternaria alternata* causing citrus brown spot in China. *Fungal Biology*, 119(5), 320-330. doi: 10.1016/j.funbio.2014.09.006
- Inoue, K., & Nasu, H. (2000). Black spot of peach caused by *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. *Journal of General Plant Pathology*, 66(1), 18-22. doi: 10.1007/PL00012916
- Jiménez, O., Contreras, N., & Nass, H. (2004). *Xanthomonas albilineans* agente causal de la escaldadura foliar de la Caña de Azúcar (*Saccharum* sp) en los estados Lara y Yaracuy. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 21(3), 233-245. Retrieved from [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-78182004000300003](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182004000300003)
- Leslie, F. J., & B. Summerell A. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. USA: Blackwell Publishing.
- especies de *Alternaria* del banco de genes (Figura 4B), y en ambos casos se utilizó *Penicillium* spp. como grupo externo. El análisis indicó que los aislados L1-8F-A1, L7-5F-A3 y L1-3F-A4 se agruparon en la misma rama filogenética que las cepas pertenecientes a *Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticillioides* y *Alternaria alternata*, respectivamente, lo cual concuerda con los resultados encontrados en la identificación morfológica y molecular.
- ## Conclusión
- Con base en las características culturales, morfológicas y moleculares se identificó a *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium verticillioides* como agentes causales de la pudrición del florete en brócoli en el estado de Guanajuato, México. Este es el segundo reporte de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* como agentes causales de la pudrición del florete en brócoli cultivados en México, y el primer reporte en identificar a *Fusarium verticillioides* como parte del complejo de agentes causales de esta enfermedad.
- ## Fin de la versión en español
- Li, B., Wang, G. L., Wu, Z. Y., Qiu, W., Tang, Q. M., & Xie, G. L. (2009). First report of bacterial head rot of broccoli caused by *Pseudomonas fluorescens* in China. *Plant Disease*, 93(11), 1219-1219. doi: 10.1094/PDIS-93-11-1219A
- Liu, Y., Xu, Z., Zhu, P., Liu, Y., Zhang, Z., Xu, L., & Toyoda, H. (2009). Postharvest black spot disease in broccoli caused by *Alternaria brassicicola*. *Annual Report of The Kansai Plant Protection Society*, 51, 11-15. doi: 10.4165/kapps.51.11
- Liu, X., Fang, Z. Y., Yang, L. M., Zhang, Y. Y., & Lv, H. H. (2018). First report of Brussels sprouts and Broccoli yellows caused by *Fusarium oxysporum* in China. *Plant Disease*, 102(12), 2638-2638. doi: 10.1094/PDIS-12-17-1970-PDN
- Mehraj, H., Akter, A., Miyaji, N., Miyazaki, J., Shea, D. J., Fujimoto, R., & Doullah, M. (2020). Genetics of clubroot and *Fusarium* wilt disease resistance in Brassica vegetables: The application of marker assisted breeding for disease resistance. *Plants*, 9(6), 726. doi: 10.3390/plants9060726
- Morales-Rodríguez, I., Yáñez-Morales, M. J., Silva-Rojas, H. V., García-de los Santos, G., & Guzmán-de Peña, D. A. (2007). Biodiversity of *Fusarium* species in Mexico associated with ear rot in maize, and their identification using a phylogenetic approach. *Mycopathologia*, 163(1), 31-39. doi: 10.1007/s11046-006-0082-1
- Morris, P. F., Connolly, M. S., & Clair, D. A. (2000). Genetic diversity of *Alternaria alternata* isolated from tomato in California assessed using RAPDs. *Mycological Research*, 104(3), 286-292. doi: 10.1017/S0953756299008758
- Nira, S. T., Hossain, M. F., Mahmud, N. U., Hassan, O., Islam, T., & Akanda, A. M. (2022). *Alternaria* leaf spot of broccoli caused by *Alternaria alternata* in Bangladesh. *Plant*

- Protection Science, 58(1), 49-56. doi: 10.17221/44/2020-PPS
- Ochoa, J. L., Hernández-Montiel, L. G., Latisnere-Barragán, H., León-de la Luz, J., & Larralde-Corona, C. P. (2007). Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México. *CYTA-Journal of Food*, 5(5), 352-359. doi: 10.1080/11358120709487712
- Oren, L., Ezrati, S., Cohen, D., & Sharon, A. (2003). Early events in the *Fusarium verticillioides*-maize interaction characterized by using a green fluorescent protein-expressing transgenic isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(3), 1695-1701. doi: 10.1128/AEM.69.3.1695-1701.2003
- Pattanamahakul, P., & 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(6), 749-755. doi: 10.1046/j.1365-3059.1999.00406.x
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural - Servicio de Información Agroalimentaria y pesquera (SADER-SIAP). (2020). *Anuario estadístico de la producción agrícola*. Retrieved from <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022-3027. doi: 10.1093/molbev/msab120
- Thoma, B. P. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225-236. doi: 10.1046/j.1364-3703.2003.00173.X
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680. doi: 10.1093/nar/22.22.4673
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, W. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). New York: Academic Press, Inc.
- Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., & Kirkpatrick, B. C. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71(1), 45-50. doi: 10.1016/s0166-0934(97)00190-0
- Zhao, A. N., Li, J., Yan, S. L., Huang, J. B., & Zheng, L. (2018). First report of *Fusarium tricinctum* causing rot of broccoli heads post-harvest in China. *Plant Disease*, 102(1), 239-239. doi: 10.1094/PDIS-02-17-0218-PDN