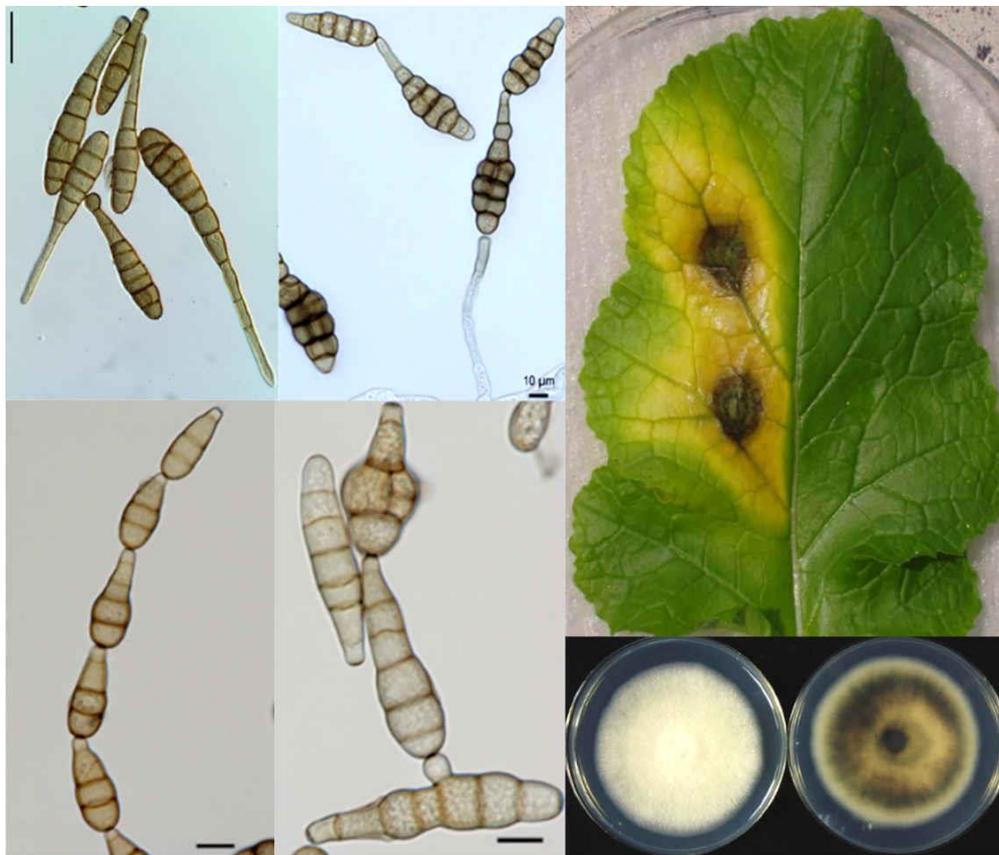


FICHA TÉCNICA PARA EL DIAGNÓSTICO DE:

Especies del género *Alternaria* que afectan brasicáceas (Brassicaceae)



SENASICA, AGRICULTURA SANA PARA EL BIENESTAR.

"ESTE PROGRAMA ES PÚBLICO, AJENO A CUALQUIER PARTIDO POLÍTICO. QUEDA PROHIBIDO EL USO PARA FINES DISTINTOS A LOS ESTABLECIDOS EN EL PROGRAMA"



GOBIERNO DE MÉXICO

AGRICULTURA
SECRETARÍA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL



SENASICA
SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD,
INOCUIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA

© Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), [2021]

Impreso por SENASICA

Todos los derechos reservados.

Imagen de Portada: Tipos de conidios y síntomas, Lawrence *et al.*, 2008; Woudenberg *et al.*, 2013, Nishikawa y Nakashima, 2020.

ÍNDICE

Pág.

GENERALIDADES	1
INFORMACIÓN TAXONÓMICA.....	2
<i>Alternaria brassicicola</i> (Schwein.) Wiltsshre	2
<i>Alternaria brassicae</i> (Berk.).....	2
<i>Alternaria japonica</i> Yoshii (1941).....	3
SÍNTOMAS	3
DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN	4
Morfología	4
Técnicas de diagnóstico.....	8
Observación directa	8
Incubación en papel secante	8
Incubación en medios de cultivo	8
Obtención de cultivos puros.....	8
Interpretación de resultados.....	9
REFERENCIAS	11
AVISO.....	13

Especies del género *Alternaria* que afectan brasicáceas (Brassicaceae)

GENERALIDADES

El género *Alternaria* incluye a más de 100 especies, la mayoría saprofitas cosmopolitas o patógenas de plantas (Woudenberg *et al.*, 2013). Entre estas últimas, un complejo de tres especies: *A. brassicicola*, *A. brassicae* y *A. japonica*, pueden ocurrir de forma individual o de manera simultánea en el mismo hospedante, son responsables de causar la enfermedad de tizón o mancha negra en muchas especies cultivables del género *Brassica* (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2014).

La infección de semillas por estos hongos resulta en marchitez con una alteración significativa de la eficiencia de germinación y una reducción de hasta el 46 % del rendimiento en campo (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2014).

Actualmente en México, *A. brassicicola*, *A. japonica* y *A. tenuissima* se encuentran en la Lista de Plagas Reglamentadas en la importación de semillas de diversas especies ante la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF, 2015). En el Módulo de consulta de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancías, se incluye a *A. brassicicola* en alrededor de 58 claves de combinación que abarcan al brócoli, tomate, coliflor, col, entre otras, de diversos orígenes y procedencias (Senasica, 2020).

Por su parte, *Alternaria brassicae* es el agente causal de la enfermedad conocida como mancha negra en cultivos de *Brassica*, pudiendo causar una reducción de hasta el 47% en el rendimiento (Soengas *et al.*, 2007; Meena *et al.*, 2012). Afecta hojas y cabezas florales, siendo los restos vegetales la principal fuente de infección, además de que puede ser transmitido por semilla (Fatima *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2016; Soengas *et al.*, 2007).

Alternaria japonica se han reportado asociados a semillas y cabezas florales de brócoli (Fraire-Cordero *et al.*, 2010; Nishikawa y Nakashima, 2020).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

Posición taxonómica:

Fungi, Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae.

***Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltsshre**

Sinonimias:

Alternaria oleracea Milbr.

Helminthosporium brassicicola Schwein.

Sporidesmium exittiosum J.G. Kiihn.

Macrosporium circinans Berk & M.A. Curtis.

Alternaria septorioides (Wested.) E.G. Simons.

Alternaria mimicula E.G. Simmons.

Alternaria solidaccana E.G. Simmons

Nombres comunes:

Mancha negra de las crucíferas (español)

Black spot of crucifers (inglés)

Scab of cucumber (inglés)

Alternaria blight (inglés)

***Alternaria brassicae* (Berk.)**

Sinonimias:

Macrosporium brassicae Berk.

Sporidesmium exitiosum J.G. Kühn

Cercospora bloxamii Berk & Broome

Nombres comunes:

Mancha negra de las crucíferas (español)

Black spot of crucifers (inglés)

Leaf blight of crucifers (inglés)

***Alternaria japonica* Yoshii (1941)**

Sinonimias:

Alternaria raphani Groves & Skolko

Alternaria mattiolae Neerg.

Alternaria nepalensis Simmons

Nombres comunes:

Mancha negra de las crucíferas (español)

Black spot of crucifers (inglés) Pod spot of radish (inglés)

SÍNTOMAS

Los síntomas ocurren en la parte aérea de las plantas, principalmente en hojas, tallos y cabezas florales (Iacomi-Vasilescu *et al.*, 2002) y las lesiones se alargan al confluir entre manchas, mientras que las semillas suelen ser asintomáticas (Nishikawa y Nakashima, 2020).

Alternaria brassicicola

Las manchas son de color gris, café a negro, circulares de 8-12 mm diámetro, normalmente con un halo clorótico (Figura 1a); las cabezas florales pueden sufrir una pudrición acuosa (Nishikawa y Nakashima, 2020).

Alternaria brassicae

Las manchas son de color marrón claro a grisáceo o marrón oscuro, circulares de 0.5-12 mm de diámetro (Figura 1b). En las nervaduras las lesiones son oblongas o lineales y hundidas. Las cabezas florales pueden presentar manchas negras (Nishikawa y Nakashima, 2020).

Alternaria japonica

Las manchas son similares a la causadas por *A. brassicicola* en color y tamaño (Figura 1c), sin embargo, las cabezas florales raramente presentan lesiones (Nishikawa y Nakashima, 2020).

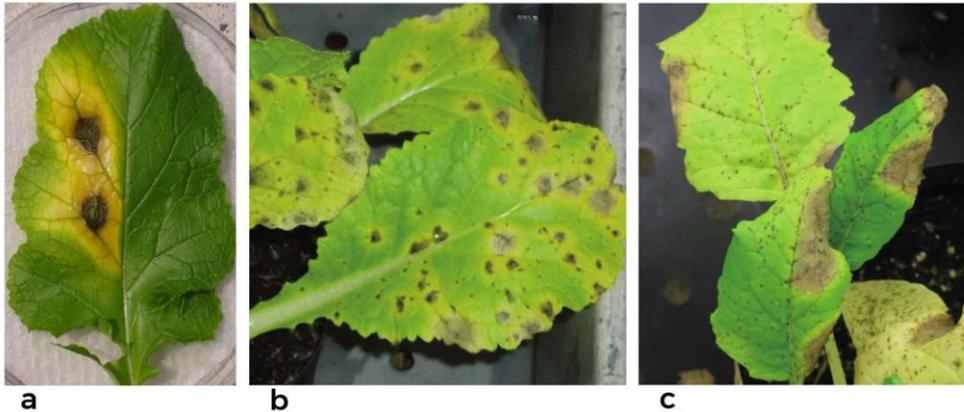


Figura 1. Síntomas causados por *Alternaria* en crucíferas. Lesiones circulares características en hoja: a) *A. brassicicola*, b) *A. brassicae*, c) *A. japonica*. Tomado y modificado de: a) Lawrence et al., (2008). b) y c) Nishikawa y Nakashima (2020).

DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN

Morfología

La diferenciación o tamaño de las estructuras fungosas pueden verse afectadas por el sustrato y condiciones en las cuales se desarrollan, por lo que, para la adecuada identificación a nivel de especie, es necesario considerar las condiciones que reporta la literatura que se utilizará como referencia.

Alternaria brassicicola

Morfología colonial: colonias de 4 a 5 cm de diámetro después de 5-7 días en medio de cultivo Papa-Zanahoria-Agar (PCA; por sus siglas en inglés), con crecimiento y esporulación, formando de dos a tres anillos pobremente definidos de color marrón a negro (Simmons, 2007).

Morfometría de estructuras: En PCA, conidios catenulados en forma acropétala, cadenas sin ramificar con 10-20 esporas; sin embargo, la ramificación múltiple de conidióforos y cadenas primarias es un carácter dominante.

Conidios estrechamente ovoides o elipsoides. Los conidios iniciales tienen un rango de tamaño de 50-60 x 12-17 μm y 6-8 transeptos con 0-1 longisepto en algunos segmentos (Figura 2). Esporas ovoides intermedias de 30- 40 x 15-18 μm y 4-5 transeptos con 0-2 longiseptos en algunos segmentos; esporas ovoides más pequeñas de aproximadamente 10-25 x 6-10 μm y 1- 3 transeptos sin longisepto. El conidio terminal en cualquier cadena tiene una célula apical redondeada (Simmons, 2007).

Alternaria brassicae

Morfología colonial: colonias de 37.6 ± 1.6 mm de diámetro después de 7 días en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), a 25 °C (Figura 3a). Crecimiento algodonoso, de color blanco a gris pálido o grisáceo verdoso y esporulación escasa. En el reverso con centro de color verde oscuro a negro (Nishikawa y Nakashima, 2020).

Morfometría de estructuras: Sobre medio de cultivo V8 (Jugo de verduras V8) conidióforos de color marrón pálido a marrón oscuro, de $38-183 \times 6.11$ μm (Figura 3b); conidios solitarios o en cadenas cortas de 1-4 (Figura 3c), subcilíndricos a oblongos, con ápice romo, de $33-160 \times 8-33$ μm , con 1 -10 septos transversales y de 0-3 (-9) septos longitudinales (Figura 3d y 3e), de color marrón pálido a marrón oscuro (Nishikawa y Nakashima, 2020).

Alternaria japonica

Morfología colonial: en medio de cultivo PDA alcanzan 6 ± 3 cm de diámetro en 7 días a 25°C, con hifas aéreas algodonosas blancas, gris pálido o grisáceo verde. En el reverso, centro verde oscuro a negro (Figura 4a), esporulación escasa (Nishikawa y Nakashima, 2020).

Morfometría de estructuras: En medio de cultivo PCA los conidióforos son solitarios, cortos y estrechos de $18-80 \times 4-6$ μm . Conidios solitarios o en cadenas cortas y sin ramificaciones (Figura 4b). Conidios ovoides, obclavados o elipsoides, marrón a marrón pálido, de $20-68 \times 8-25$ μm , con dos a siete septos transversales (ocasionalmente con constricciones) y de cero a cuatro septos longitudinales (Figura 4c y 4d). Frecuentemente con formación de clamidosporas intercalares en cadenas (Figura 4e), tanto aéreas como sumergidas en el agar, de $10-21 \times 8-16$ μm (Nishikawa y Nakashima, 2020).

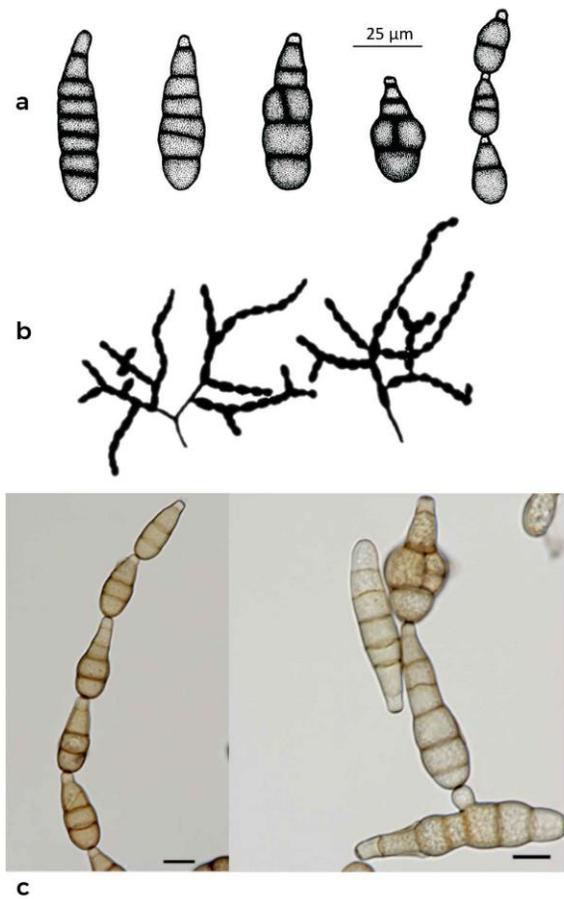


Figura 2. Características morfológicas de *Alternaria brassicicola*. a) Ilustración de los tipos de conidios. Escala = 25 μm . b) Patrón de esporulación en medio PCA. c) Conidios en medio PCA. Escala = 10 μm . a y b) Tomado y modificado de Nishikawa y Nakashima, (2020). c) Tomado de Woundenberg *et al.*, 2013.

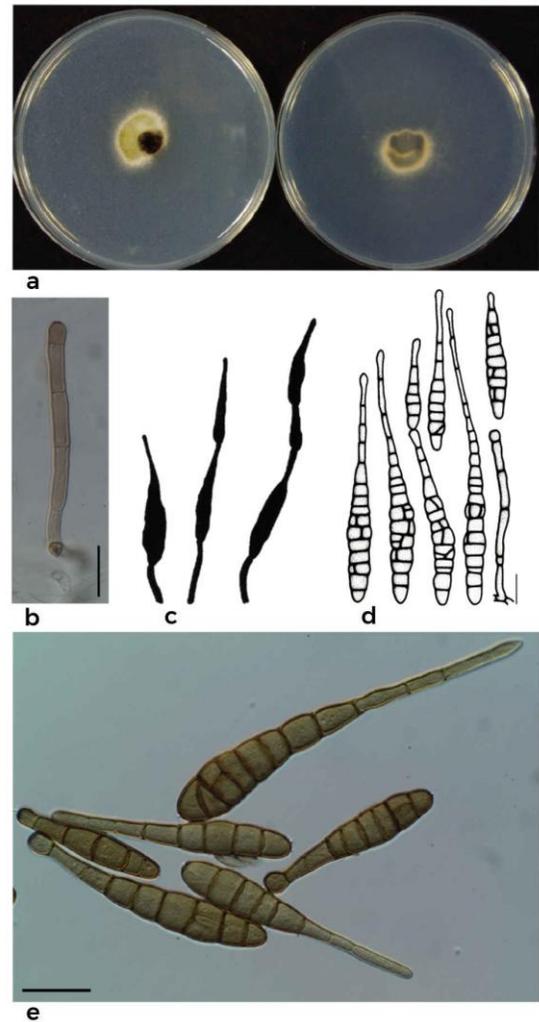


Figura 3. Características morfológicas de *Alternaria brassicae*. a) Cultivo en PDA (izquierda = anverso, derecha = reverso). b) Conidióforo. c) Patrón de esporulación. d) Ilustración de los tipos de conidios. e) Conidios. b, c y d Escala = 25 μm . Tomado y modificado de Nishikawa y Nakashima, 2020.

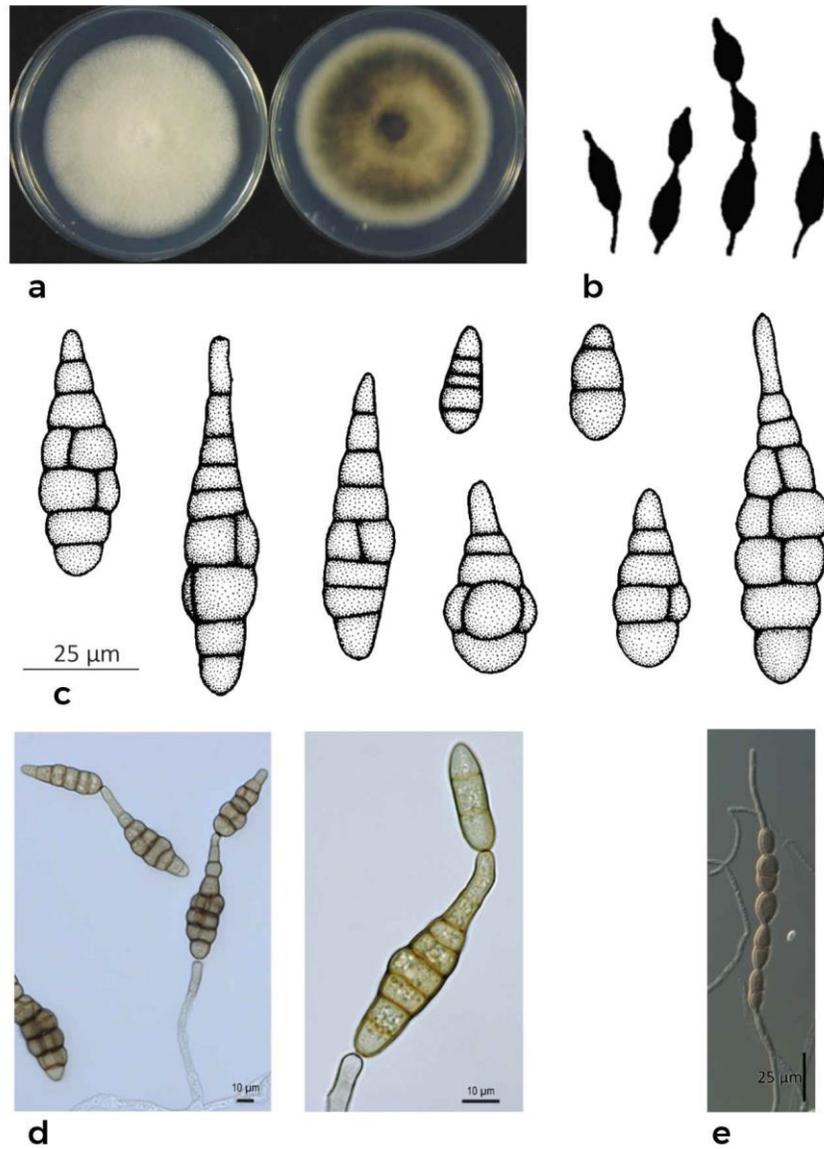


Figura 4. Características morfológicas de *Alternaria japonica*. a) Cultivo en PDA (izquierda = anverso, derecha = reverso). b) Patrón de esporulación. c) Ilustración de los tipos de conidios. d) Conidios. e) Clamidosporas en cadena. Tomado y modificado de a), b) c) y e) Nishikawa y Nakashima (2020). d) Woudenberg *et al.*, (2013).

Técnicas de diagnóstico

Material propagativo: cuatrocientas semillas, si la muestra lo permite, o el 75% del total de ésta (Senasica, 2018)

Cultivo establecido: hojas, tallos y cabezas florales con síntomas característicos.

Observación directa

Utilizar un microscopio estereoscópico para buscar signos del hongo (micelio y esporulación) en hojas, tallos o cabezas florales con presencia de síntomas y elaborar montajes para la observación de las estructuras en un microscopio compuesto.

Incubación en papel secante

Obtener fragmentos de aproximadamente 1 cm² a partir de tejido vegetal con o sin síntomas. En condiciones de asepsia lavar con una solución de NaClO al 1% durante 1 min, realizar tres lavados con agua destilada estéril y permitir el secado del material vegetal sobre papel absorbente estéril. Aplicar el mismo procedimiento para muestras de semillas.

En una caja Petri estéril colocar de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco o 25 semillas. Incubar durante 3 a 6 días en una cámara húmeda a 25 ± 3 °C bajo condiciones de al menos 80% de humedad.

Incubación en medios de cultivo

Realizar el mismo procedimiento que en la técnica de incubación en papel secante, con la diferencia de sembrar de 5 a 6 fragmentos de material vegetal seco o las semillas en cajas Petri con medio de cultivo PDA o PCA. E incubar a 25 ± 3 °C, sin condiciones de humedad.

Obtención de cultivos puros

A partir de material vegetal o del crecimiento del hongo en cámaras húmedas o medio de cultivo, con un microscopio estereoscópico observar si hay esporulación característica del género *Alternaria* y obtener cultivos puros monospóricos en medio de cultivo PDA, PCA y V8. Incubar bajo las mismas condiciones descritas y, posteriormente, obtener montajes de las estructuras para su observación con un microscopio compuesto.

Los cultivos monospóricos pueden obtenerse mediante la captura directamente del tejido vegetal o de cepas de un solo conidio y siembra en medios nutritivos (PDA, CPA, V8), o mediante suspensiones de conidios para su siembra en medios pobres como Agar agua (AA), germinación y transferencia de un solo conidio en medios nutritivos.

Interpretación de resultados

Para reportar una identificación positiva a *A. brassicicola*, *A. brassicae* o *A. japonica* se requiere la detección y observación de colonias y conidios que correspondan con la descripción morfológica de la especie.

Como prueba de corroboración se debe secuenciar la región ITS del rDNA a partir de la extracción del ácido desoxirribonucleico (DNA) de cultivos puros, utilizando, preferentemente, la metodología propuesta por Cenis (1992) modificada, descrita por Senasica (2018a), y realizar un análisis filogenético o alinear y determinar si hay homología mayor al 99% de las secuencias de la muestra de interés con las secuencias de referencia.

Las secuencias de referencia sugeridas son: para *A. brassicicola*, JX499031; para *A. brassicae*, LC440627 y KC584185; para *A. japonica*, LC440595 y KC584201 y para (Woudenberg *et al.*, 2013; Nishikawa y Nakashima, 2020).

Reportar el diagnóstico como negativo si no se detecta presencia de estructuras características o si el análisis de secuencias no corresponde la especie.

En caso de resultado positivo deberá conservar:

- Evidencia fotográfica de los signos y síntomas, aislamientos y de las estructuras del hongo.
- Preservación del tejido vegetal sintomático a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante al menos 3 meses posteriores a la identificación.
- Montajes permanentes, donde se encuentren las estructuras distintivas del hongo, como evidencia de la identificación morfométrica.
- DNA obtenido, en congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (de ser posible a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)
- Registro de los resultados de las pruebas moleculares (fotografías del gel y formatos de secuencias)
- Conservar el aislamiento puro, no realizar transferencias continuas del aislamiento, utilizando técnicas de preservación que garanticen la viabilidad del hongo

En caso de que se requiera la corroboración por parte del CNRF, deberá enviarse lo siguiente:

- Informe técnico con descripción detallada y evidencia de las técnicas utilizadas para el diagnóstico.
- Cultivos puros monospóricos de no más de 8 días de crecimiento a la recepción en el CNRF, en tres medios de cultivo (PDA, PCA y V8).
- Montajes permanentes con las estructuras necesarias para la identificación morfológica.
- DNA del hongo, con soporte documental de la evaluación de la calidad (valor de absorbancia A260/A280 y A260/A230, y concentración).
- Imagen de geles
- Archivos generados por secuenciación Sanger con ambos primers en formato .ab1 con su respectivo electroferograma.
- Evidencias del alineamiento de secuencias o árbol filogenético.

REFERENCIAS

- Cenis, L. J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20, 2380. doi: 10.1093/nar/20.9.2380
- CIPF. Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. (2015). Lista de Plagas Reglamentadas México. <https://www.ippc.int/es/countries/mexico/>
- Fatima U, Bhorali P, Borah S, Senthil-Kumar M. (2019). Perspectives on the utilization of resistance mechanisms from host and nonhost plants for durable protection of Brassica crops against *Alternaria* blight. *PeerJ* 7, e7486. Doi:org/10.7717/peerj.7486
- Iacomi-Vasilescu, B., Blancard, D., Guénard, M., Molinero-Demilly, V., Laurent, E. and Simoneau, P. (2002). Development of a PCR-based diagnostic assay for detecting pathogenic *Alternaria* species in cruciferous seeds. *Seed Science and Technology* 30: 87-95.
- Kumar, A., Kumar, R., Kumar, S., Nandan, D., Chand, G. and Kolte, S. J. (2016). *Alternaria* blight of oilseed brassicas: A review on management strategies through conventional, non-conventional and biotechnological approaches. *Journal of Applied and Natural Science* 8: 1110 - 1125
- Lawrence, C. B., Mitchell, T. K., Craven, K. D., Cho, Y., Cramer, R. A. and Kim, K. H. (2008). At death's door: *Alternaria* pathogenicity mechanisms. *Plant Pathology Journal*, 24: 101-111.
- Meena, P. D., Rain, A., Meena, R., Sharman, P., Gupta, R. and Chowdappa, P. (2012). Aggressiveness, diversity and distribution of *Alternaria brassicae* isolates infecting oilseed *Brassica* in India. *African Journal of Microbiology Research* 6: 5249-5258. DOI: 10.5897/AJMR12.705
- Nishikawa, J. and Nakashima, C. (2020). Japanese species of *Alternaria* and their species boundaries based on host range. *Fungal Systematics and Evolution* 5: 197- 281.
- Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018). Protocolo de Diagnóstico: *Guignardia bidwellii*, Anamorfo: *Phyllosticta ampelicida* (Pudrición negra de la vid) [Versión 1.0]. Autor.
- Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2018a). Módulo de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancía de origen vegetal. <https://sistemasssl.senasica.gob.mx/mcrfi/>

- Senasica. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. (2020). Módulo de requisitos fitosanitarios para la importación de mercancía de origen vegetal. <https://sistemasssl.senasica.gob.mx/mcrfi/>
- Simmons, E. G. (2007). *Alternaria: An identification manual*. CBS Biodiversity Series.
- Singh, U. R., Kumar, S., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., Mishra, S. and Sharma, A. K. (2014). Identification and characterization of Microsatellite from *Alternaria brassicicola* to assess cross-species transferability and utility as a diagnostic marker. *Molecular Biotechnology* 56: 1049-1059.
- SNAVMP, Sistema Nacional Argentino de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (2020). <https://www.sinavimo.gov.ar/plaga/alternaria-tenuissima>
- Soengas, P., Cartea, M.E., Velasco, P. y Ordás, A. (2007). Enfermedades de las Brassicas cultivadas en Galicia. Situación actual y perspectiva. Informe técnico. Misión Biológica de Galicia.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M. and Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75: 171-212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>

AVISO

La metodología descrita en la presente ficha técnica para la detección de Especies del género *Alternaria* que afectan brasicáceas (Brassicaceae), tiene un sustento científico que respalda los resultados obtenidos al aplicarlo. La incorrecta implementación o variaciones en la metodología especificada en este documento de referencia pueden derivar en resultados no esperados, por lo que es responsabilidad del usuario seguir y aplicar el procedimiento de forma correcta.

Forma recomendada de citar

SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. 2021. Ficha técnica para el diagnóstico de: Especies del género *Alternaria* que afectan brasicáceas (Brassicaceae). Tecámac, México: Autor.

Esta ficha técnica fue elaborada, revisada y validada por el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria.

Dr. Ángel Ramírez Suárez Subdirector Técnico	Validó
M. en C. María del Rocío Hernández Hernández Jefa del Departamento de Fitopatología	Revisó
Dra. Magnolia Moreno Velázquez Técnico del Laboratorio de Micología M. en C. Lervin Hernández Ramos Técnico del Laboratorio de Micología	Elaboró

CONTACTO

lab.micologia@senasica.gob.mx
Teléfono y extensión (55) 59051000 ext. 51424, 51373

Dudas sobre:

- Campañas Fito o Zoonosanitarias
- Movilización de Productos Agroalimentarios y Mascotas

800 987 9879

Quejas • Denuncias
Órgano Interno de Control
en el Senasica

55 5905.1000

Ext. 51648

gob.mx/agricultura

gob.mx/senasica



“Este programa es público, ajeno a cualquier partido político.
Queda prohibido el uso para fines distintos a los establecidos en el programa”