

## Identificación morfológica y molecular de cepas del hongo (*Alternaria dauci*) patógeno de la zanahoria (*Daucus carota* L.)

Morphological and molecular identification of fungus strains (*Alternaria dauci*) pathogenic of carrot (*Daucus carota* L.)

ADAN ACEVEDO CRUZ<sup>1</sup>

### RESUMEN

La finalidad del estudio fue la identificación morfológica y molecular de las cepas de *Alternaria dauci*, causantes de la quemadura foliar de la zanahoria. Para ello, mediante técnicas convencionales se aislaron 50 cepas del hongo del cultivo de zanahoria, ubicada en el departamento de Landes al sudoeste de Francia. Las observaciones macroscópicas y microscópicas de las colonias mostraron que: 10 (42A, 42B, 25A, 37B, 22A, 12B, 2A, 22B, 12A y 25B) de las 50 cepas presentaron micelios de aspecto algodonoso, pigmentación rojo claro a marrón del Extracto de Malta Agar (EMA), conidióforos alargados y no ramificados, conidios ovalados con septos transversales y longitudinales. Se realizó el monosporage de las 10 cepas con características propias de *A. dauci* se obtuvieron 40 cepas puras. De las cuales, la identificación molecular con la PCR, se logró amplificar el ADN de 30 cepas con los primers universales ITS1/ITS4 con una talla de 600 pb, y la verificación de estas cepas con la PCR utilizando los primers específicos Ada3 y Ada5 de *A. dauci*, reveló que 9 cepas puras: M25AA<sub>1</sub>, M12BA<sub>1</sub>, M12AA<sub>2</sub>, M37BA<sub>2</sub>, M22BB<sub>2</sub>, M25BB<sub>2</sub>, M42AB<sub>1</sub>, M42BB<sub>1</sub> y M42BB<sub>2</sub> pertenecen a la especie *A. dauci* con un peso molecular correspondiente a 159 pb.

**Palabras clave:** zanahoria; *daucus carota*; *alternaria dauci*; identificación morfológica.

<sup>1</sup> Research Institute of Horticulture and Seeds (IRHS). Angers, France.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Aporte Santiaguino de la Universidad Nacional Santiago Antúñez de Mayolo. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

## ABSTRACT

The purpose of the study was morphological and molecular identification of the strains of *Alternaria dauci*; that cause the leaf burning of the carrot. For it, 50 bacterial strains of the fungus of the carrot crop located in the Landes department in the South-West of France were isolated. The macroscopic and microscopic observations of the colonies showed that: 10 (42A, 42B, 25A, 37B, 22A, 12B, 2A, 22B 12A and 25B) of the 50 strains; presented cottony-looking mycelia, light red or brown pigmentation of Malt Agar Extract (MAE), elongated and unbranched conidiophores, oval conidia with transverse and longitudinal septa.

The monospore was realized of the 10 strains with self characteristics of *A. dauci*, 40 pure strains were obtained. Of which, the molecular identification with the PCR was possible to amplify the DNA of 30 strains with the universal primers ITS1/ITS4 with a size of 600 bp, and the verification of these strains with the PCR using the specific primers Ada3 and Ada5 of *A. dauci*, revealed that 9 pure strains: M25AA<sub>1</sub>, M12BA<sub>1</sub>, M12AA<sub>2</sub>, M37BA<sub>2</sub>, M22BB<sub>2</sub>, M25BB<sub>2</sub>, M42AB<sub>1</sub>, M42BB<sub>1</sub>, and M42BB<sub>2</sub> belong to the *A. dauci* species with a molecular weight corresponding to 159 bp.

**Keywords:** carrot; daucus carota; alternaria dauci; morphological identification.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de zanahoria (*Daucus carota* L.) tiene gran importancia económica y agrícola debido a que es la hortaliza más consumida en el mundo (Iorizzo et al., 2016). Francia, es el segundo país productor mundial de semillas de zanahoria después de los Estados Unidos y el tercer país productor europeo de raíces de zanahoria (Le Clerc et al., 2016). Sin embargo, el rendimiento de este cultivo se ve afectado por el hongo necrotrófico *A. dauci*, que es el responsable de la enfermedad foliar más perjudicial de la zanahoria conocido como el tizón o la quemadura de las hojas; dicha enfermedad está presente en todas las regiones del mundo donde se cultiva la zanahoria (Souza et al., 2001); causando daños en las raíces, así como en la producción de semillas. Los síntomas característicos son lesiones de color marrón verdoso, generalmente en los márgenes de los folíolos, que reducen considerablemente la actividad fotosintética; las pérdidas en rendimiento asociados a esta enfermedad puede alcanzar hasta un 90 % (Soylu et al., 2005). En este contexto, el propósito del presente trabajo de investigación es identificar mediante técnicas convencionales la morfología, y a nivel molecular las cepas de *A. dauci*, para implementar adecuadas estrategias de control de la enfermedad. Asimismo, el trabajo tiene especial importancia ya que los resultados serán utilizados para estudiar la diversidad genética de las cepas de *A. dauci* y con ello comprender los mecanismos fundamentales de la resistencia del cultivo de zanahoria al patógeno.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron 50 muestras de hojas de zanahoria infectadas por las quemaduras foliares de una parcela ubicada en el departamento de Landes al sudoeste de Francia; estas muestras se recopilaron de una variedad susceptible a *A. dauci* (variedad Presto). Para la recolección se utilizaron fundas plásticas Kraft y fueron llevadas al laboratorio y almacenadas a 4°C para su posterior aislamiento.

En el laboratorio, para cada muestra, se seleccionaron dos pequeñas submuestras de 5 a 10 mm<sup>2</sup> a partir del material vegetal con lesiones de quemaduras foliares, las que luego fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio 1% clorométrico durante 1 a 2 min y se enjuagaron en agua destilada con intervalos de 10 a 15s para eliminar el hipoclorito; luego se las secó con papel absorbente estéril, para eliminar el exceso de agua. Con una pinza desinfectada se colocaron las dos submuestras en cajas Petri que contenían el Extracto de Malta Agar (EMA) previamente solidificado y se las dejó incubando en el *chambre mycothèque* (cámara de hongos) a 22°C durante 7 días con una fuente de luz para estimular la esporulación.

### 1. Extracción de ADN de las cepas puras

Aproximadamente 125 mm<sup>3</sup> de micelio de 40 cepas puras fueron extraídos y puestos en los tubos Eppendorf de 1.5 mL. En cada uno de estos tubos se añadieron 100 µL de tampón de lisis (50 mM de Tris-HCl pH 7,2; 50 mM EDTA, 3% SDS, 1% 2-mercaptoéthanol).

Los tubos Eppendorf fueron puestos en seguida en el horno microonda (potencia: 850 W) con las tapas abiertas durante 30s (primero 15s, luego 10s y 5s; entre cada intervalo de tiempo esperar 5 a 10s). Luego, se agregaron 300 µL de tampón de lisis previamente calentado a 80°C y los tubos se taparon e incubaron en el baño de maría a 80°C durante 10 min. Posteriormente, se añadieron 400 µL de Fenol-Cloroformo-alcohol Isoamílico (25: 24: 1) y los tubos se centrifugaron a 11000 rpm durante 15 min. La fase acuosa sobrenadante se recuperó y se depositó en un nuevo tubo, enseguida se añadieron 10 µL de acetato de sodio 5 M y 0.5 volumen (180 µL) de isopropanol. Las muestras fueron puestas 5 min en el hielo y centrifugadas durante 10 min a 10000 rpm. El sobrenadante se eliminó y la parte sólida se lavó con 250 µL de etanol a 80%, la nueva muestra se centrifugó durante 5 min a 10000 rpm y el sobrenadante se eliminó. El secado de los tubos se realizó en el evaporador rotativo (Speed-vac) durante 5 min. Por último, el ADN se recuperó en 100 µL de tampón TE (10 mM Tris-HCL, 0,1 Mm EDTA, pH 8,0).

### 2. Identificación molecular de las cepas de *A. dauci*

La verificación de la extracción del ADN fúngico se realizó con la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) utilizando un par de primers universales de los hongos ITS1

e ITS4 (espaciadores internos transcritos) correspondientes a la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 de ADN ribosómico (White et al., 1990).

- ITS1 Sentido: 5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'
- ITS4 Antisentido: 5'TCCTCCGCTTAT'TGATATGC3'

La amplificación se realizó en un volumen de 20  $\mu$ L que contenía 0,8  $\mu$ L de ADN fúngico, 4  $\mu$ L de tampón de reacción 5X [75 mM Tris-HCl pH 9,50 mM KCL; 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ]; 1,2  $\mu$ L de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 0,4  $\mu$ L de dNTPs a 10 mM, 0,4  $\mu$ L de cada primers a 20  $\mu$ M, 0,08  $\mu$ L de Taq polimerasa (Uptitherm, Interchim) a 5 U/ $\mu$ L y 12,75  $\mu$ L de agua ultra puro. Los reactivos se colocaron en una matriz de microtubos y las muestras fueron puestas en el termociclador y la PCR se realizó con el siguiente programa:

Después de una etapa de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, la mezcla de reactivos se sometió a 35 ciclos que comprende, una primera etapa de desnaturalización a 94°C durante 30 s, luego la hibridación de los primers a 52°C durante 45 s y una etapa final de elongación a 72°C durante 1 min. Un último ciclo se realizó a 72°C durante 7 min y los productos de PCR se conservaron a 10°C.

Para identificar que las 40 cepas puras corresponden efectivamente a la especie *A. dauci*, se utilizó para la PCR un par de primers específicos Ada3 y Ada5 de la región ITS1 de *A. dauci* (Bénichou et al., 2009).

- Ada5 Sentido: 5'TGGCACCTCTCGGGGTGGCA3'
- Ada3 Antisentido: 5' GTTGAAAGTTGTAATTAT'TATG 3'

La PCR se realizó con el mismo programa descrito en el párrafo anterior.

Los productos de amplificación de la secuencia de ADN se visualizaron en el gel de agarosa a 1% en el tampón TAE concentrado 1X (40 mM Tris-acetato, EDTA 1 mM pH 8). Para ello, se depositaron en los pocillos de gel 10  $\mu$ L de productos PCR adicionado de 2  $\mu$ L de tampón de carga (azul de bromofenol 0,02%, xileno cianol 0,02%, glicerol 3%, TBE 0,5 X) y 5  $\mu$ L de marcador de talla (Smart Ladder) en el primer pocillo, para determinar la talla de los fragmentos de ADN por comparación de su distancia de migración, la cual se efectuó en la cubeta de electroforesis bajo la tensión de 135 V durante 16 min. A continuación, el gel se sumergió en un baño de BET (bromuro de etidio 0,01%) durante 15 min y revelado por exposición a las radiaciones UV (310 nm). Por último, el gel se fotografió usando un sistema de adquisición de imágenes Visión Capt.

## RESULTADOS

### 1. Caracterización morfológica macroscópica y microscópica

A partir de 50 cepas del hongo aisladas en las cajas de Petri, solo 10 cepas con códigos: 42A, 42B, 25A, 37B, 22A, 12B, 2A, 22B, 12A y 25B presentaron colonias de consistencia algodonosa con bordes regulares, relieve elevado, micelios con septos de color marrón a gris y pigmentación rojo claro a marrón rodeando al medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA).

Los resultados de las observaciones microscópicas del hongo con Leica DM4500B objetivo X400 mostraron que las colonias poseen hifas hialinas y ramificadas de color marrón hasta marrón oscuro con la edad, conidióforos alargados y no ramificados de color café-olivo de aproximadamente 80  $\mu\text{m}$  de largo y 10  $\mu\text{m}$  de espesor, macroconidios y microconidios ovalados con septos transversales y longitudinales que se les conoce también como dictiosporas. Además, los conidios maduros poseen un pico terminal filamentoso.

En base a todas estas características morfológicas propias de la especie *A. dauci*, las 10 cepas seleccionadas se purificaron en 40 cepas puras con la técnica del monosporage con la finalidad de realizar la identificación molecular.

### 2. Identificación molecular de las cepas de *A. dauci*

Después de realizar la extracción del ADN de 40 cepas puras, para evidenciar si el material genético es amplificable, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa; con lo cual se obtuvieron 30 extracciones de ADN amplificables utilizando los primers universales ITS1 e ITS4; el ADN de las 10 cepas restantes no fue amplificado con dicho primer.

El resultado de la electroforesis de algunas de las cepas puras se muestran en la figura 1, en la cual se observa que los carriles de 1 a 12 representan las migraciones de los fragmentos del ADN de las cepas puras de M42AA<sub>1</sub>, M42AB<sub>1</sub>, M42BA<sub>1</sub>, M42BB<sub>2</sub>, M25AA<sub>1</sub>, M25AB<sub>2</sub>, M37BA<sub>2</sub>, M37BB<sub>2</sub>, M22AA<sub>2</sub>, M22AB<sub>2</sub>, M12BA<sub>1</sub>, M22BB<sub>2</sub> con bandas idénticas; cuya talla de los fragmentos obtenidos es aproximadamente de 600 pb.

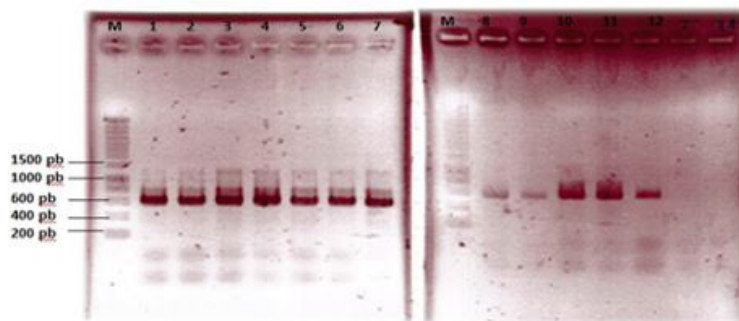


Figura 1. Revelación en el gel de agarosa 1 % de los productos de amplificación de ADN fúngico por PCR. M: marcador de peso molecular 1000 pb, T-: control negativo (H<sub>2</sub>O), T+: control positivo (*Alternaria alternata*)

Con la finalidad de verificar si estas 30 cepas puras de ADN amplificable corresponden realmente a la especie *A. dauci* se realizó la PCR empleando un par de primers específicos Ada3 y Ada5 de *A. dauci*, con lo cual se logró amplificar la región ITS1 del ADN ribosómico de 9 cepas. Luego, por la revelación de los productos PCR en el gel de agarosa se encontró que las cepas puras M37BA<sub>2</sub>, M22BB<sub>2</sub>, M25BB<sub>2</sub> ubicadas en los carriles 3, 6 y 7 pertenecen a la especie *A. dauci* con un peso molecular correspondiente a 159 pb, y las cepas puras M42AA<sub>2</sub>, M42BA<sub>2</sub>, M22AA<sub>2</sub>, M2AB<sub>1</sub> que se encuentran en los carriles 1, 2, 4 y 5 no corresponden a la especie *A. dauci* tal como se observa en la figura 2.

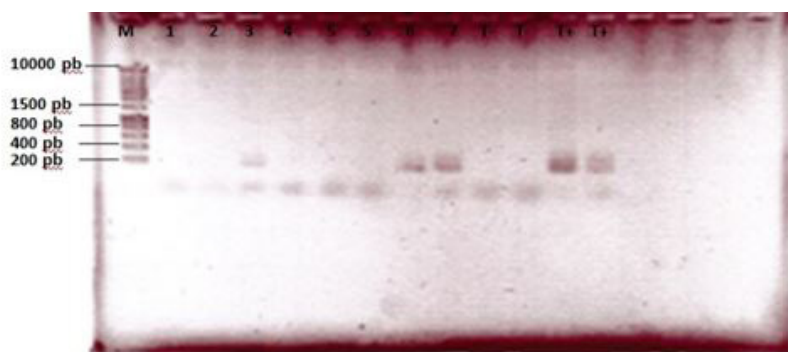


Figura 2. Productos de amplificación por PCR del ADN de las cepas puras con los primers específicos Ada3 y Ada5 de *A. dauci*. M: marcador de peso molecular de 1000 pb, T-: *Alternaria brassicicola* (cepa Abra43), T+: *A. dauci* (cepa 76)

Manteniendo las mismas condiciones de PCR descritas anteriormente y los primers específicos del patógeno; se detectó que 9 de las 30 cepas puras del hongo aisladas a partir de una parcela de zanahoria pertenecen a la especie *A. dauci* y fueron codificadas de la siguiente manera: M25AA<sub>1</sub>, M12BA<sub>1</sub>, M12AA<sub>2</sub>, M37BA<sub>2</sub>, M22BB<sub>2</sub>, M25BB<sub>2</sub>, M42AB<sub>1</sub>, M42BB<sub>1</sub> y M42BB<sub>2</sub>, tal como se observa en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados del número de cepas puras de *A. dauci*

Cepas	Código de cepas puras	PCR ITS1/ITS4	PCR Ada3/Ada5
42A	M42AA <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M42AA <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
	M42AB <sub>1</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
	M42AB <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
42B	M42BA <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M42BA <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
	M42BB <sub>1</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
	M42BB <sub>2</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
25A	M25AA <sub>1</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
	M25AA <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
	M25AB <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M25AB <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
37B	M37BA <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M37BA <sub>2</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
	M37BB <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M37BB <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
22A	M22AA <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M22AA <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
	M22AB <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M22AB <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
12B	M12BA <sub>1</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
	M12BA <sub>2</sub>	*	
	M12BB <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M12BB <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
2A	M2AA <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M2AA <sub>2</sub>	*	
	M2AB <sub>1</sub>	ADN amplificable	-
	M2AB <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
22B	M22BA <sub>1</sub>	*	
	M22BA <sub>2</sub>	ADN amplificable	-
	M22BB <sub>1</sub>	*	
	M22BB <sub>2</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
12A	M12AA <sub>1</sub>	*	
	M12AA <sub>2</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
	M12AB <sub>1</sub>	*	
	M12AB <sub>2</sub>	*	
25B	M25BA <sub>1</sub>	*	
	M25BA <sub>2</sub>	*	
	M25BB <sub>1</sub>	*	
	M25BB <sub>2</sub>	ADN amplificable	<i>A. dauci</i>
*	ADN non amplificable		
-	PCR negativo con primers específicos de <i>A. dauci</i>		

## DISCUSIÓN

El número reducido de 10 cepas de *A. dauci* a partir de 50 cepas aisladas podría explicarse por el hecho de que los síntomas en las hojas de la zanahoria estuvieron poco visibles al momento del muestreo en la parcela, debido a las condiciones climáticas poco favorables (temperatura elevada) para el desarrollo del hongo y al periodo tardío de la siembra del cultivo. También es posible que las quemaduras foliares hayan sido provocadas por otros agentes patógenos, tales como: la bacteria *Xanthomonas hortorum* pv *carotae* o el hongo *A. radicina* como lo mencionan Meier, Drechsler y Eddy (1922).

En el medio Extracto de Malta Agar (EMA) las colonias de *A. dauci* son típicamente de color gris oscuro con el micelio algodonoso y producen un distintivo pigmento rojo claro a marrón que rodea al medio de cultivo EMA, los cuales coinciden con los reportados por Konstantinova et al. (2002). Los conidióforos de *A. dauci* son de color café-olivo que producen los conidios con septos transversales y longitudinales tal como señalan los estudios reportados por Farrar, Pryor y Davis (2004), con la excepción de que solo en algunas de las 10 cepas se observaron conidios maduros con picos filamentosos; por lo que se realizó la verificación molecular con la PCR, debido a que el criterio de conidios con septos no es suficiente para identificar a la especie *A. dauci*, en vista de que todos los conidios del género *alternaria* tienen septos transversales y longitudinales como señala Simmons (1995).

Con respecto al estudio molecular de las 40 cepas puras, el ADN de 30 cepas amplificadas con los primers ITS1 e ITS4 mostraron una sola banda esperada de aproximadamente 600 pb. Asimismo, las PCR realizadas con los primers específicos de la región ITS1 para identificar a la especie *A. dauci* revelaron bandas de 159 pb, lo cual concuerda con los resultados de la tesis efectuada por Bénichou et al. (2009) sobre la variabilidad genética de *A. dauci*.

Para las 10 cepas puras que no fueron amplificables los problemas pueden venir ya sea de la extracción de ADN o ya sea de la PCR. Las causas pueden ser múltiples, tales como: la falta de inactivación de enzimas intracelulares por el tampón de lisis durante la extracción de ADN, el uso de ADN para la PCR con demasiadas impurezas (tipo polifenoles, proteínas y otros). Una manera sencilla de minimizar este problema consiste en verificar la pureza del ADN, midiendo la densidad óptica de las soluciones de ADN en un espectrofotómetro.

Finalmente, el estudio constituye un acercamiento en materia de métodos moleculares para la detección e identificación con mayor rapidez y precisión las de cepas de *A. dauci* para combatir oportuna y eficazmente la quemadura foliar en el cultivo de la zanahoria.



## CONCLUSIONES

Los resultados morfológicos macroscópicos y microscópicos muestran que las cepas de *A. dauci* presentan colonias de consistencia algodonosa y micelios con septos de color marrón a gris, también las cepas de *A. dauci* segregan un pigmento distintivo de color rojo claro a marrón que rodea al medio de cultivo Extracto de Malta Agar (EMA). Los conidióforos son alargados y no ramificados de color café-olivo de aproximadamente 80 µm de largo y 10 µm de espesor, que producen conidios ovalados con septos transversales y longitudinales, además, los conidios maduros presentan picos terminales filamentosos propios de *A. dauci*.

En el análisis molecular con la PCR de las 40 cepas puras, utilizando los primers universales ITS1/ITS4, se logró amplificar las secuencias ITS1 e ITS2 del material genético de 30 cepas y, a través del análisis electroforético, se observaron las bandas bien definidas de 600 pb. Luego, la identificación de estas 30 cepas puras amplificando la región ITS1 del ADN genómico con los primers específicos Ada3 y Ada5 de *A. dauci* reveló que solo 9 cepas puras: M25AA<sub>1</sub>, M12BA<sub>1</sub>, M12AA<sub>2</sub>, M37BA<sub>2</sub>, M22BB<sub>2</sub>, M25BB<sub>2</sub>, M42AB<sub>1</sub>, M42BB<sub>1</sub> y M42BB<sub>2</sub> pertenecen a la especie *A. dauci* con un peso molecular correspondiente a 159 pb.

## AGRADECIMIENTOS

Al PhD. Pascal POUPARD y al PhD. Valérie LE CLERC, profesores investigadores de la University of Angers y Agrocampus Ouest de Francia, por sus apoyos a la elaboración de esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bénichou, Soumaya et al. 2009. «Isolation and characterization of microsatellite markers from the phytopathogenic fungus *Alternaria dauci*». *Molecular Ecology Resources*. 9 (1): 390-392.
- Farrar, James J.; Pryor, Barry M. y Davis, Michael R. 2004. «*Alternaria* diseases of carrot». *Plant disease*. 88 (8): 776–784.
- Iorizzo, Massimo et al. 2016. «A High-Quality Carrot Genome Assembly Provides New Insights into Carotenoid Accumulation and Asterid Genome Evolution». *Nature Genetics*. 48 (6): 657-666.
- Konstantinova, Pavlina et al. 2002. «Development of specific primers for detection and identification of *Alternaria* spp. in carrot material by PCR and comparison with blotter and plating assays». *Mycological Research*. 106 (1): 23-33.

- Le Clerc, Valérie et al. 2016. «Etude de la résistance partielle de la carotte à *Alternaria dauci* par une approche de phénotypage multi critères». *Innovations Agronomiques*. 50: 101-109.
- Meier, F. C.; Drechsler, C. y Eddy, E. D. 1922. «Black rot of Carrots caused by *Alternaria radicina* n. sp.». *Phytopathology*. 12 (4): 157-166.
- Simmons, E.G. 1995. «*Alternaria* themes and variations (112-144)». *Mycotaxon*. 55: 55-163.
- Souza, Rosemari et al. 2001. «Frequência de *Alternaria dauci* E *Cercospora carotae* como agentes da queima das folhas da cenoura em Passo Fundo, RS». *Fitopatologia Brasileira*. 26 (3): 614-618.
- Soylu, S. et al. 2005. «First Report of *Alternaria* Leaf Blight Caused by *Alternaria Dauci* on Carrot in Turkey». *Plant Pathology*. 54 (2): 252-252.
- White, T. et al. 1990. *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, in PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Editado por Innis, M., Gelfand, D., Shinsky, J. y White, T. San Diego: Academic Press.

**Recepción: 23/04/2018**

**Aceptación: 23/05/2018**

### **Correspondencia**

Adan Acevedo Cruz

acevedo.libra@hotmail.com