

Aislamiento e identificación morfológica y molecular de hongos asociados a plantas de zanahoria enfermas

Yunuen Montserrat Rodarte Díaz¹, Jesús Guzmán Moreno²,
Rosa María Ramírez Santoyo¹, Rosa Gabriela Reveles Hernández¹,
Luz Elena Vidales Rodríguez¹

¹ Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Ciencias Biológicas,
Avenida Preparatoria, Colonia Agronómica II, CP 98066, Zacatecas, Zac.

² Universidad Autónoma de Zacatecas, Área de Ciencias de la Salud,
Km 6, Carretera Zacatecas-Guadalajara S/N, Ejido la Escondida, CP 98160, Zacatecas, Zac.

yunardrt@gmail.com

Resumen: Se presenta el aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos en un cultivo de zanahoria (*Daucus carota*) con síntomas de infección fúngica. Los aislados fúngicos se identificaron mediante morfología colonial en diferentes medios de cultivo y caracterización microscópica mediante la técnica de microcultivo. Simultáneamente, los aislados fúngicos se identificaron molecularmente mediante la amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) y secuenciación de las regiones ITSs (Intergenic Spacers) de los genes ribosomales (rDNA). Se obtuvieron cuatro aislados fúngicos identificados como: *Penicillium chrysogenum*, *Actinomucor elegans*, *Alternaria tenuissima* y *Aspergillus pseudodeflectus*. La identificación oportuna de hongos fitopatógenos en los cultivos es indispensable debido a que permite determinar el riesgo biológico de las especies y los métodos de prevención y/o control más eficaces.

Palabras clave: hongos fitopatógenos, *Daucus carota*, regiones ITSs.

Abstract: The isolation and identification of phytopathogenic fungi in a sick carrot crop (*Daucus carota*) with fungal infection symptomatology is presented. Fungal isolates were identified throughout colony morphology in different media cultures and microscopically by the microculture technique. Simultaneously, the molecular identification of the isolates based on PCR amplification (Polymerase Chain Reaction) and sequencing of the ITS regions (Intergenic Spacers) of ribosomal genes was performed. Four fungal isolates were obtained and identified as *Penicillium chrysogenum*, *Actinomucor elegans*, *Alternaria tenuissima* and *Aspergillus pseudodeflectus*. A timely identification of phytopathogenic fungi in crops is essential because it allows to determine the biological risk of the species and the methods of more effective prevention and / or control.

Keywords: Phytopathogenic fungi, *Daucus carota*, ITS regions.

1. Introducción

El cultivo de Zanahoria (*Daucus carota* L.), es el más conocido y el más importante de las hortalizas de raíz por su alta demanda. Globalmente, su producción y consumo ha aumentado significativamente en los últimos 10 años, pues ha pasado de una producción de 22 millones a 36 millones de toneladas [1]. En el caso de la producción en México, el estado de Zacatecas se encuentra como uno de los principales estados productores [2].

El cultivo de zanahoria es susceptible al ataque de microorganismos entre los que destacan los hongos patógenos, los cuales pueden provocar grandes pérdidas económicas en la producción, ya sea por la podredumbre que ocasiona en los cultivos, o bien, por la disminución del valor del producto en el mercado [3]. Se ha reportado una amplia gama de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de la zanahoria, entre éstos se encuentran principalmente especies de los géneros *Alternaria*, *Diplodia*, *Monilia*, *Penicillium*, *Phommopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor* [4].

2. Marco Teórico

2.1 Hongos fitopatógenos

Las especies de hongos que con frecuencia causan deterioro patológico de frutos, hojas, tallos y productos subterráneos (raíces, tubérculos, cormos, etc.) y provocan importantes pérdidas; son llamados hongos fitopatógenos (*phyton*="planta", y *pathos*="dolencia o enfermedad") [4]. Los hongos actúan como patógenos porque han desarrollado diferentes mecanismos de infección, ya sea la síntesis y liberación de enzimas que degradan la pared celular vegetal, la formación de estructuras especializadas, y/o la producción de metabolitos fitotóxicos conocidos como fitotoxinas [5, 6].

El principal daño producido por los hongos a las plantas es la muerte del tejido que infectan (necrosis), cuyos signos se observan como manchas foliares, tizón o putrefacción de la raíz. Además, los hongos pueden ocasionar atrofia de la planta completa o de algunas de sus partes, o bien, generar hiperatrofia (crecimiento excesivo), cuyo signo en estos casos es la aparición de agallas,

verrugas o tumores en la raíz [4]. Por último, si el hongo afecta la raíz ocasiona un color amarillo (clorosis) en la planta y marchitez [4]. Todos los efectos mencionados pueden causar atrofia o disminución de la vitalidad de la planta, lo que ocasiona su muerte e improductividad [4].

2.2 Enfermedades de *D. carota*

Las principales enfermedades de la zanahoria son el tizón en las hojas producida por *Alternaria dauci* y *Cercospora carolae*, las cuales se ha reportado que llegan a destruir completamente el follaje de los cultivos en Europa [7].

Otras enfermedades incluyen el moho polvoriento (*Erysiphe polygoni* y *Erysiphe heraclei*), el tizón bacteriano (*Xanthomonas campestris pv carolae*), puntos negros en la raíz (*Alternaria radicina*), y la podredumbre púrpura de la raíz (*Helicobasidium brebisonii*) [7].

2.3 Identificación morfológica y molecular de hongos

Debido a la patogenia de los hongos y la rapidez con la que infectan los cultivos, deben ser identificados en el menor tiempo posible y con un diagnóstico acertado. Los hongos son el segundo grupo más diverso de organismos [8], y aunque tienen una gran variedad de formas entre diferentes taxones, es difícil distinguirlos unos de otros a niveles específicos (por ejemplo a nivel de especie), debido a su similitud morfológica y biológica. Es por esto, que los avances en biología molecular y genómica han cobrado importancia, ya que son herramientas mediante las cuales se generan grandes cantidades de datos utilizando marcadores moleculares que se correlacionan con numerosas divergencias morfológicas y fisiológicas dentro de un grupo de hongos [8].

3. Metodología

3.1 Muestreo

Las muestras se obtuvieron en un predio localizado en la comunidad de “El Bordo” en el municipio de Guadalupe, del estado de Zacatecas. Las muestras fueron seleccionadas de cultivos de zanahoria cuyas plantas presentaban un adelgazamiento y poco desarrollo de la raíz primaria, así como lesiones (manchas foliares necróticas) en las partes aéreas de las plantas, principalmente en las hojas (figura 1).

3.2 Aislamiento de hongos filamentosos

Se preparó una suspensión madre con 1 g de una muestra compuesta de raíces, a partir de la cual se hicieron diluciones seriadas y se sembraron 0.1 mL de cada dilución en dos medios de cultivo diferentes, agar Sabouraud y PDA (Potato Dextrosa Agar); se incubaron a 28°C hasta el desarrollo de colonias fúngicas visibles. Las colonias fúngicas distinguibles y lo suficientemente separadas unas de otras, se aislaron mediante resiembra en medio PDA, y se incubaron durante 3 días a 28°C. Una vez desarrolladas las colonias se realizó la descripción colonial de cada aislado; se cosecharon y guardaron a 4°C para su conservación y posterior uso.



Fig. 1. Muestras de plantas de zanahoria con sintomatología de infección fúngica.

3.3 Identificación morfológica de aislados fúngicos

Los aislados fúngicos obtenidos se identificaron con base en la morfología colonial y microscópica.

3.3.1 Morfología colonial: Cada uno de los aislados fúngicos se sembró en cajas de Petri conteniendo 3 diferentes medios de cultivo (agar Czapek, PDA y Sabouraud), y se incubaron a 28°C durante 7 días. Se registró el crecimiento de las colonias mediante fotodocumentación a los días 3, 6 y 7 días de crecimiento.

3.3.2 Morfología microscópica: A partir de cada aislado fúngico se realizaron 3 microcultivos en cámara húmeda en tres diferentes medios: agar Czapek, PDA y agar Sabouraud; se incubaron a 28°C durante 6 días y se observaron al microscopio óptico diferentes características microscópicas tales como el micelio, estructuras de reproducción y conidias. Para la observación de algunas características también se prepararon muestras de algunos aislados con cinta adhesiva (método Scotch) y tinción con azul de algodón (0.1%).

3.4 Identificación molecular de aislados fúngicos

A partir de cultivos sólidos de cada aislado fúngico incubados a 28°C por 7 días, se extrajo el ADN siguiendo el protocolo descrito por Raeder y Broda (1985) [9].

Posteriormente se realizó la amplificación de regiones del ADN ribosomal (rDNA) mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se amplificaron las regiones ITS utilizando los oligonucleótidos directo ITS1, que corresponde a la región final del gen 18S (5'-TCCGTAGGTGAACCTGGGG-3') y reverso ITS4, que corresponde al inicio del gen 28S (5'-TQCTCCGCTTATTGATATGC-3') [10]; así como las regiones del gen ribosomal 18S, utilizando los oligonucleótidos directo NS3, que corresponde a la región intermedia del gen 18S (5'-GCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC-3') y reverso NS8, que corresponde al final del gen 18S (5'-TCCGCAGGTTACCTACGGA-3') [10].

Los productos de PCR se purificaron con el kit comercial Wizard® SV Gel and PCR Cleanup Systems (Promega) de

acuerdo con las instrucciones del proveedor y se enviaron a secuenciar al Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad del CINVESTAV (LANGEBIO-CINVESTAV) Unidad Irapuato.

Posteriormente, para la identificación de cada aislado se compararon las secuencias de ADN obtenidas con las secuencias disponibles en el banco de genes (GenBank) del servidor National Center for Biotechnology Information (NCBI) mediante un análisis tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Con base en el resultado del análisis de cobertura e identidad con las secuencias depositadas en dicho banco, se determinó la especie a la que pertenece cada uno de los aislados.

4. Resultados

4.1. Aislamiento de hongos filamentosos

Como resultado del aislamiento de hongos filamentosos, se obtuvieron 4 cultivos fúngicos puros con diferente morfología (figura 2).

4.2 Identificación morfológica de aislados fúngicos

A continuación se describe la morfología colonial y microscópica de cada uno de los aislados fúngicos.

4.2.1 Aislado Z1: En los medios PDA y Sabouraud, las colonias presentaron un aspecto aterciopelado, coloración verde opaco con borde blanco y en la superficie presentaron exudados color amarillo y surcos transversales. El reverso de la colonia presentó una coloración amarilla (figura 3). En agar Czapek, desarrolló colonias amarillas en el centro y color blanco y aspecto aterciopelado en la periferia. Se observaron exudados anaranjados brillantes y surcos transversales sobre la superficie de la periferia (figura 3). Por el reverso presentó estrías visibles y un color amarillo opaco.

Microscópicamente se determinó la presencia de conidióforos ramificados y micelio septado (figura 4E) con aspecto de penacho o pincel (figura 4 B-D). Los conidióforos presentan métulas compactas (figura 4 E-a) y fiálides en forma de botella (figura 3E-b) donde nacen los conidios elipsoidales (Figura 4E-c). El aislado Z1 se identificó como un hongo perteneciente al género *Penicillium* de acuerdo con la morfología descrita por Watanabe para este género [11].

4.2.2 Aislado Z2: En agar Czapek, formó colonias blancas de aspecto fibroso y con micelio aéreo que abarcaron el 100% de la superficie de la caja Petri, por el reverso presentó un color beige claro (figura 5). En PDA desarrolló una colonia café opaco y consistencia algodonosa de aspecto denso y compacto. Por el reverso la colonia presentó color negro en el centro y púrpura rojizo en la periferia (figura 5). En agar Sabouraud, desarrolló una colonia blanca algodonosa de aspecto fibroso con micelio aéreo sobre toda la superficie del agar. El reverso de la colonia presentó un color café (figura 5).

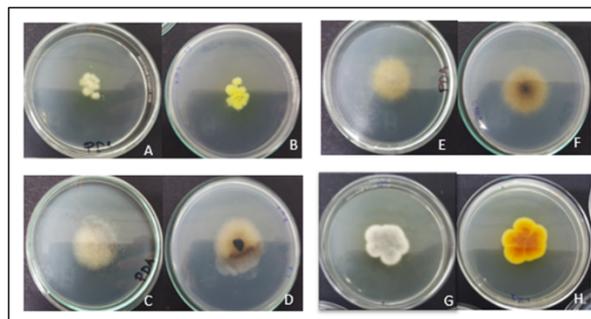


Fig. 2. Aislados fúngicos obtenidos a partir de muestras de zanahoria enfermas. *Panel superior izquierdo:* Aislado Z1 en medio PDA con 4 días de crecimiento; A) anverso y B) reverso de colonia. *Panel superior derecho:* Aislado Z2 con 4 días de crecimiento; C) anverso y D) reverso de la colonia. *Panel inferior izquierdo:* Aislado Z3 con 4 días de crecimiento; E) anverso y F) reverso de la colonia. *Panel inferior derecho:* Aislado Z3 con 4 días de crecimiento; G) y H) reverso de colonia.

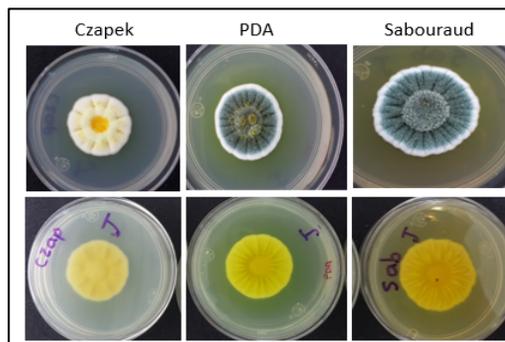


Fig. 3. Morfología colonial del aislado Z1. Cultivos fúngicos de 7 días de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Anverso del cultivo (*panel superior*) y reverso del cultivo (*panel inferior*).

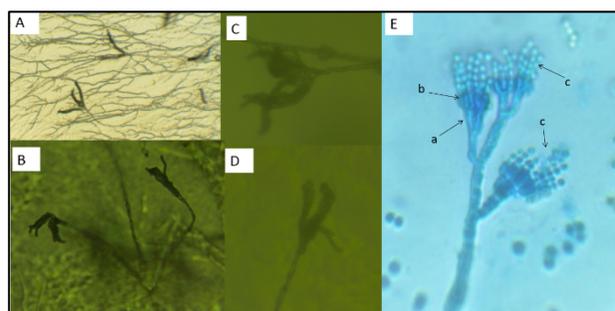


Fig. 4. Características microscópicas del aislado Z1. Preparaciones con la técnica cinta adhesiva Scotch y tinción con azul de algodón a partir de cultivos de 7 días de crecimiento en medio PDA. Amplificación 40X. Se observan la métula (a), fiálides (b) y microconidios (c).

Microscópicamente el aislado Z2 presentó micelio cenocítico (Figura 6A) con esporangióforos ramificados verticiladamente

(figura 6B y F-a) de varias longitudes, y esporangios con forma globosa (figura 6C y D-b), algunos presentaron paredes con cristales (figura 6F y G-c). Estas características morfológicas coinciden con la descripción bibliográfica de *Actinomucor* [12], por lo que se identificó como un hongo perteneciente al dicho género.

4.2.3 Aislado Z3: En agar Czapek desarrolló colonias de aspecto algodonoso aterciopelado, de color café muy claro en el centro y rosa claro en la periferia. Por el reverso, desarrolló una colonia café claro en el centro y beige en la periferia (figura 7). En agar Sabouraud, las colonias presentaron aspecto aterciopelado con elevación umbiliforme, de color café claro en el centro y verde opaco en la periferia. Además, presentó estrías transversales que dividen la colonia y por el reverso desarrolló colonias café oscuro y beige en la periferia (figura 7). En PDA desarrolló una colonia gris verdosa de consistencia algodonosa y aterciopelada en el centro y gris claro en la periferia. Por el reverso desarrolló un color café oscuro en el centro y blanco en la periferia (figura 7).

Microscópicamente, presentó micelio septado (figura 8 C-a, D-a y G-a), conidióforos macronematosos marrones (figura 8 A-b y B-b), conidios en cadena fácilmente reconocibles debido a su forma obclavada, superficie lisa, y tabicación longitudinal y transversal (figura 8 E-c, F-c, H-c). Con base en estas características [13], el aislado Z3 se identificó como un hongo perteneciente al género *Alternaria*.

4.3 Identificación molecular de aislados fúngicos.

Los aislados fúngicos se identificaron molecularmente mediante el análisis de la secuencia del gen ribosomal 18S (aislado Z1) o de las regiones ribosomales ITS (aislados Z2, Z3 y Z4). Dicha identificación se realizó mediante el alineamiento independiente de las secuencias directa y reversa de los fragmentos de DNA amplificados ya que no fue posible ensamblar las secuencias complementarias para obtener una secuencia consenso. En la tabla 1 se muestran los porcentajes de identidad y cobertura de las secuencias obtenidas mediante análisis BLAST (NCBI), así como la identificación de los aislados fúngicos con base en el resultado del alineamiento de secuencias.

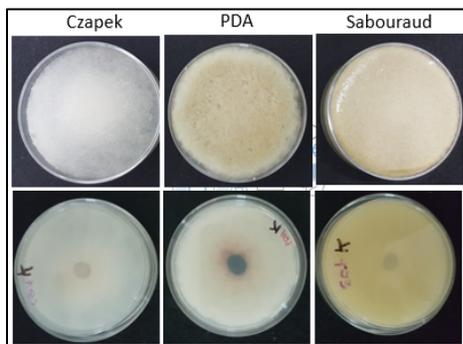


Fig. 5. Morfología colonial del aislado Z2 a los 7 días de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Anverso del cultivo (*panel superior*) y reverso del cultivo (*panel inferior*).

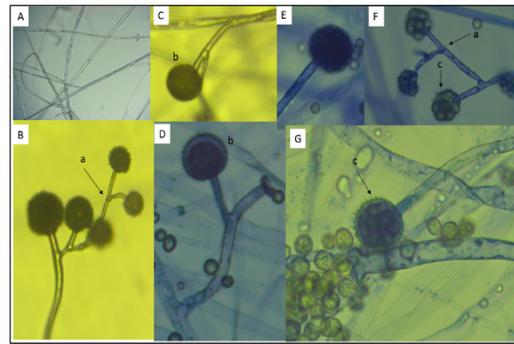


Fig. 6. Características microscópicas del aislado Z2. A, F y G) Técnica cinta adhesiva y tinción con azul de algodón, medio PDA a los 6 días de crecimiento. B y C) Microcultivo en agar Czapek. D y E) Microcultivo en PDA. Micelio cenocítico a 10X (A). Esporangióforos globosos a 20X (C-b) con ramificación verticilada (B-a). Esporangióforos con cristales a 100X (F-c, G-c).

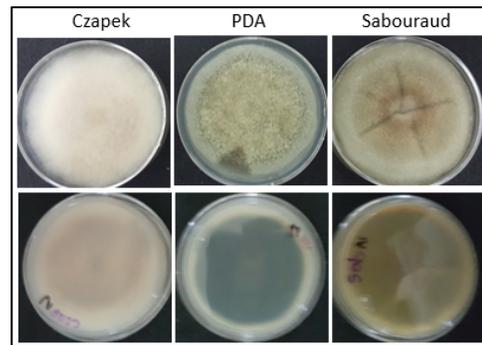


Fig. 7. Morfología colonial del aislado Z3 a los 7 días de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Anverso del cultivo (*panel superior*) y reverso del cultivo (*panel inferior*).

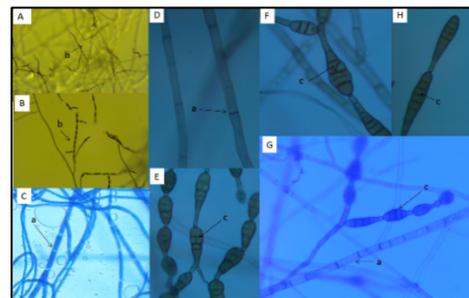


Fig. 8. Características microscópicas de aislado Z3. A, B) Microcultivo en agar Czapek, 10X, se observan conidióforos ramificados (b). C, D, G) Microcultivo en PDA, 40X, tinción azul de algodón, se muestran hifas septadas (a) y macroconidias con septos (G-c). E, F, H) Estructuras en PDA, técnica de cinta adhesiva y tinción azul de algodón, 100X, se muestran macroconidias con septos longitudinales y transversales (c).

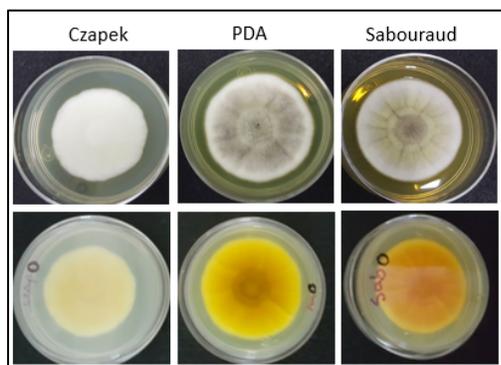


Fig. 9. Morfología colonial del aislado Z4 a los 7 días de crecimiento en diferentes medios de cultivo. Anverso del cultivo (*panel superior*) y reverso del cultivo (*panel inferior*).

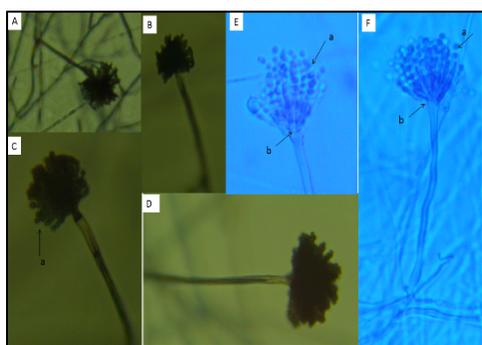


Fig. 10. Características microscópicas de aislado Z4. Se muestran conidióforos con forma de plumero (A-D) con numerosas fiálides y conidios en cadena (E-a y F-a), a 10X (Ay B), y 40X (C - F). Se muestran conidióforos con inflamación apical globosa (E-b y F-b). A-D) Microcultivo en PDA. E y F) Estructuras en agar Czapek y agar Sabouraud, respectivamente, técnica de cinta adhesiva y tinción azul de algodón.

5. Discusión

La identificación oportuna de hongos que afectan cultivos específicos es indispensable, debido a que permite determinar el riesgo biológico que implican las especies y los métodos de prevención y/o control más eficaces para erradicarlos; ya sea mediante control biológico, uso de fungicidas, etc. esto a su vez ayuda a reducir las pérdidas económicas de los productores.

Los 4 aislados fúngicos obtenidos y analizados en este trabajo se identificaron tomando en cuenta sus características fenotípicas, y dicha identificación se complementó con la identificación molecular de los aislados. El uso de ambos enfoques fue especialmente importante en el caso de las especies de *Alternaria* y *Aspergillus* identificadas en este estudio, pues aunque la caracterización basada en características morfológicas micro y macroscópicas solo permitió la identificación de dichos aislados a nivel de género, la identificación molecular basada en la técnica

Tabla 1. Identificación molecular de aislados fúngicos obtenidos de plantas de zanahoria

Aislado	Oligo/Marcador	ID NCBI	Identidad (%)	Cobertura secuencia (%)
Z1	NS3/ 18S	<i>Penicillium sp</i>	99.76	99
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	99.07	100
Z1	NS8/ 18S	<i>Penicillium spp</i>	98.99	100
		<i>Penicillium chrysogenum</i>	98.74	100
Z2	ITS1/ ITSs	<i>Actinomucor elegans</i>	99.69	99
		<i>Actinomucor elegans</i>	99.43	98
Z3	ITS1/ ITSs	<i>Alternaria alternata</i>	100	100
		<i>Alternaria tenuissima</i>	100	100
		<i>Alternaria sp</i>	99.76	99
Z4	ITS4/ ITSs	<i>Aspergillus ustus</i>	99.13	99
		<i>Aspergillus calidoustus</i>	99.13	99
		<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	99.13	99
		<i>Aspergillus pseudodeflectus</i>	98.86	100

de PCR, permitió la identificación de los aislados a nivel de especie; la identificación molecular a su vez se complementó con datos fenotípicos que permitieron la diferenciación entre especies.

En cuanto a la diversidad de la microbiología del suelo, se conoce que es el hábitat primordial de los hongos [16], algunos son saprofitos comúnmente encontrados en tejidos de plantas senescentes, pero algunos otros son fitopatógenos oportunistas que en conjunto causan una serie de enfermedades con un impacto económico considerable en una gran variedad de cultivos de importancia como son cereales, plantas ornamentales, vegetales y frutas [17].

Los síntomas presentes en las plantas de zanahoria analizadas, sugieren la participación de uno o varios hongos. Por lo que es posible que los aislados identificados como *Alternaria tenuissima* (Z3) y *Actinomucor elegans* (Z2) sean los hongos responsables de la sintomatología observada en las plantas de zanahoria y que de manera sinérgica participen en el proceso de infección de la planta, dado que ambos se han reportado como agentes patógenos en gran variedad de cultivos [18-20]. *A. elegans* es un anaerobio facultativo de naturaleza ubicua, es un organismo saprofito, y se

ha identificado como agente patógeno de la raíz de *Rehmannia glutinosa*, donde ha ocasionado la descomposición de la raíz, actuando de manera sinérgica con otros hongos como *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium solani* y *Aspergillus tubingensis* [18]. En particular, *Alternaria tenuissima* crece como saprófito en el suelo y en una variedad de otros sustratos orgánicos, y se ha registrado en numerosos estudios [19, 20] como agente patógeno en gran variedad de cultivos tales como brócoli, haba, fresa, tomate, papa, chile, etc.

6. Conclusiones

Los 4 aislados fúngicos obtenidos se identificaron como especies de *Penicillium chrysogenum*, *Actinomyces elegans*, *Aspergillus pseudodeflectus* y *Alternaria tenuissima*, de los cuales 2 han sido reportados como patógenos. Es muy probable que los aislados identificados como *Alternaria tenuissima* (Z3) y *Actinomyces elegans* (Z2) sean los hongos responsables de la sintomatología observada en las plantas de zanahoria. De acuerdo a lo reportado, de los hongos identificados en este trabajo, *A. tenuissima* es el de mayor patogenicidad, mientras que *A. elegans* es más bien un hongo oportunista que puede exacerbar el proceso de infección en *Daucus carota*. Por lo anterior, la participación de estos hongos como agentes causales de la infección de *Daucus carota* deberá ser complementada con estudios basados en el cumplimiento de los postulados de Koch.

7. Reconocimientos

Agradecemos al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas de la Unidad Académica de Ciencias Biológicas de la UAZ, por la infraestructura, equipo y materiales utilizados en el desarrollo de este proyecto.

Referencias

- Dansa A.M., Bougardt F. y Nocera P., “Perfil del mercado de zanahoria”. Disponible en https://www.magyp.gov.ar/sitio/areas/ss_mercados_agropecuarios/areas/hortalizas/archivos/000030_Informes/000996_Perfil%20de%20Mercado%20de%20Zanahoria%202017.pdf [consultado en 2019].
- SAGARPA, “Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación”. Disponible en www.sagarpa.gob.mx [consultado en marzo 2019].
- Trigos A., Ramírez K. y Salinas A., *Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria*, Revista Mexicana de Micología, 2008, No. 28, pp. 125-129.
- Juárez G. P., Sosa M. E. y López A., *Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control*, Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos, 2010, No. 4, Vol. 2, pp.14-23.
- Knogge W., *Fungal Infection of Plants*. The Plant Cell, 1996, No. 8, pp.1711-1722.
- Jeng Sheng H., “Plant Pathogenesis and resistance: Biochemistry and Physiology of Plant-Microbe Interactions”, Ed. Kluwer Academic Publishers, 1ra edición, London, 2001, pp. 51-130.
- Gaviola J. C., “Manual de producción de zanahoria”. Ed. INTA, 1ra edición, 2013, pp. 153-166.
- Chattopadhyay A., Tiwari K. K., Chaudhary K. y Pratap D., “Genic molecular markers in fungi: availability and utility for bioprospection”, en “Molecular Markers in Mycology”, Ed. Springer, Switzerland, 2017, pp. 151-176.
- Raeder U. y Broda P., *Rapid preparation of DNA from filamentous fungi*, Letters in Applied Microbiology, 1985, No. 1, Vol. 1, pp. 17-20.
- White T. J., Bruns T., Lee S. J. W. T. y Taylor J., “Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics”, en “PCR protocols: a guide to methods and applications”, Ed. Academic Press, 1990, pp. 315-22.
- Watanabe T., “Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species”, Ed. CRC Press, 3ra edición, USA, 2010, pp. 404.
- Nguyen T. T., Jung H. Y., Lee Y. S., Voigt K. y Lee H. B., *Phylogenetic status of two undescribed zygomycete species from Korea: Actinomyces elegans and Mucor minutus*, Mycobiology, 2017, No. 45, Vol. 4, pp.344-352.
- Elfar K., Zoffoli J. P. y Latorre B. A., *Identificación and characterization of Alternaria species associated with moldy core of apple in Chile*, Plant disease, 2018, No. 102, Vol. 11, pp. 2158-2169.
- Ait Ammar N., Levesque E., Murat J. B., Imbert S., et al., *Aspergillus pseudodeflectus: a new human pathogen in liver transplant patients*, BMC Infectious Diseases, 2018, No. 18, Vol. 1, pp. 648.
- Piontelli E., *Aportes morfotaxonomicos en el género Aspergillus Link: claves para las especies ambientales y clínicas más comunes*. Boletín Micológico, 2008, No. 23, pp. 49 – 66.
- Sarmiento M. M., Mangiaterra M., Bojanich M. V., et al., *Hongos queratinofílicos en suelos de parques de la ciudad de Corrientes*, Revista Iberoamericana de Micología, 2016, No. 33, Vol. 1, pp. 7-12.
- Herrera F. A., 2016. “Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de Patogenicidad de *Alternaria spp.* sobre botones de Rosa (*Rosa sp*) y plantas de brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*)”. Tesis de grado, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad San Francisco de Quito, diciembre 2016, pp. 43.
- Wang R., Wang Y., Yang Q., Kang C., Li M., *Unraveling the characteristics of the microbial community and potential pathogens in the rhizosphere soil of Rehmannia glutinosa with root rot disease*. Applied Soil Ecology, 2018, No. 130, pp. 271-279.
- CABI, “Invasive Species Compendium. Draft review of policy: *Alternaria tenuissima*”. Disponible en: <https://www.cabi.org/ISC> [consultado en mayo 2020].
- Fraire M. D., Nieto D., Cárdenas E., et al., 2010. *Alternaria tenuissima, A. alternata y Fusarium oxysporum hongos causantes de la pudrición del florete de brócoli*. Revista Mexicana de Fitopatología, 2010, No. 28, Vol. 1, pp. 25-33.