

BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
VOL. 46. NO. 3, JULIO-SEPTIEMBRE 2012, PP 297 - 309
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA

OPTIMIZACIÓN DE PROTOCOLO PARA EXTRACCIÓN DE ADN DEL HONGO FITOPATÓGENO *MACROPHOMINA PHASEOLINA* (TASSI) GOID

Hernán Laurentin y Andrea Martínez-Hilders

Departamento de Ciencias Biológicas, Decanato de Agronomía,
Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado.

Vía Agua Viva, Cabudare C.P. 3023, estado Lara. Venezuela.
hlaurentin@ucla.edu.ve, andreahilders@hotmail.com

Resumen. *Macrophomina phaseolina* es un hongo fitopatígeno con un amplio rango de hospederos, el cual causa problemas económicos en muchas especies cultivadas. La caracterización molecular es de mucha importancia al diseñar estrategias de manejo del hongo que involucren la resistencia genética de las plantas. Para esta caracterización es indispensable poseer ADN en suficiente cantidad y calidad. El presente trabajo tuvo como objetivo establecer la forma más eficiente de producir micelio, así como determinar el protocolo más eficaz en la extracción de ADN y en su purificación. Hasta 13,50 mg de micelio se obtuvieron al colocar 10 microesclerocios en 200 μ L de caldo papa dextrosa contenido en 1 celda de placas de ELISA incubada a 30°C durante 7 días en oscuridad. La extracción más eficiente se logró usando el buffer de Dellaporta, y repitiendo dos veces el paso de precipitación de proteínas con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), para posteriormente completar la limpieza con la adición de acetato de amonio 5 M y ARNasa. *Recibido: 25 mayo 2012, aceptado 31 agosto 2012.*

Palabras clave: pudrición carbonosa, caracterización molecular, extracción ADN.

OPTIMIZING PROTOCOL FOR DNA EXTRACTION FROM THE PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *MACROPHOMINA PHASEOLINA* (TASSI) GOID

Abstract. *Macrophomina phaseolina* is a pathogenic fungus possessing a wide host range and causing economical loss for many crops. Molecular characterization of this species is very important when designing strategies to manage the fungus that involve genetic plant resistance. Obtaining DNA of good enough quality is the most important step for this kind of characterization. The objective of this research was to determine the most efficient method for producing mycelia and also,

to determine the best protocol for DNA extraction and purification. Up to 13.50 mg mycelia were obtained when 10 microsclerotia were placed in one ELISA plate cell containing 200 μ L of potato dextrose broth and incubated at 30°C in the dark for 7 days. The most efficient extraction was achieved using Dellaporta buffer, repeating the protein precipitation step twice with phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25:24:1), to later complete the cleaning with ammonium acetate 5M and RNAase. *Received: 25 mayo 2012 / Accepted: 31 agosto 2012.*

Keywords: charcoal rot, molecular characterization, DNA extraction.

INTRODUCCIÓN

Macrophomina phaseolina (Tassi) Goidanich es un hongo fitopatógeno de importancia en más de 300 especies cultivadas, destacándose su impacto negativo en Venezuela sobre cultivos como girasol, ajonjolí, sorgo y caraota. Es el agente causal de la enfermedad llamada pudrición carbonosa, cuyo daño se debe a la obstrucción que el patógeno causa en el sistema vascular de raíces y tallos (Wyllie 1989). El control de la enfermedad es hecho, como en cualquier otra, mediante prácticas culturales, control biológico (*e.g.* Ramezani 2008), control químico (*e.g.* Cohen *et al.* 2012) y desarrollo de cultivares resistentes (*e.g.* Iqbar *et al.* 2010). Esta última alternativa requiere de una amplia información sobre la variabilidad genética existente tanto dentro de la especie vegetal a mejorar como dentro de la especie del patógeno, lo cual puede ser logrado mediante la caracterización de poblaciones. Laurentin (2009) señala que existen dos estrategias para tal fin, hacerla mediante atributos morfológicos y lograrla mediante marcadores moleculares. Entre las ventajas que representa la caracterización molecular sobre la morfológica se tiene que es totalmente independiente de las condiciones ambientales, además de hacer un muestreo sobre gran parte del genoma (Laurentin, 2011). La utilización de este tipo de caracterización requiere de ADN como punto de partida. *M. phaseolina* es un hongo que en medios de cultivo produce microsclerocios en lugar de micelio, lo cual representa un problema al momento de disponer de suficiente material para lograr la extracción de ADN.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la forma más eficiente de producir micelio para la extracción de ADN, así como comparar varios protocolos para determinar el que resultase más eficaz en la extracción de ADN y en su purificación.

MATERIALES Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE MICELIO

Se utilizó material de un aislamiento obtenido a partir de plantas enfermas de ajonjolí en siembras comerciales ubicadas en la localidad de El Playón, Municipio Santa Rosalía del estado Portuguesa. Se compararon tres metodologías para determinar la forma más eficiente de lograr obtener micelio: 1) En cápsulas de Petri con el hongo creciendo en papa dextrosa agar, 2) En tubos plásticos de capacidad de 1,5 mL con el hongo creciendo en caldo papa dextrosa. 3) En placas de ELISA con el hongo creciendo en caldo papa dextrosa.

1) Hongo creciendo en papa dextrosa agar en cápsulas de Petri

Se tomó una sección de 1 cm² del hongo en crecimiento activo sobre papa dextrosa agar, y se colocó en el centro de una cápsula de Petri que contenía 15 mL del mismo medio de cultivo. Esto se hizo con 16 cápsulas de Petri, colocando 8 de ellas en un régimen de oscuridad durante las 24 h del día a 30°C, y las otras 8 en un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad también a 30°C. Al darse el crecimiento micelial y abarcar la totalidad de la superficie, lo cual ocurrió en 1 semana, se raspó con una hojilla previamente esterilizada sobre toda el área de una forma muy superficial con el objetivo de extraer únicamente el micelio que se encontraba creciendo sobre el medio de cultivo. El micelio proveniente de cada cápsula de Petri fue pesado en una balanza electrónica con precisión de 1 mg.

2) Hongo creciendo en tubos plásticos de 1,5 mL de capacidad, en caldo de papa dextrosa

Con un sacabocado se obtuvo 1 cm^2 del borde de una cápsula de Petri que contenía al hongo creciendo durante 1 semana bajo un régimen de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, a 30°C . Esta porción de medio PDA con micelio y microesclerocios se maceró en 5 mL de caldo papa dextrosa previamente esterilizado a 121°C por 15 minutos. Se ajustó la concentración de microesclerocios a 50 por cada mL mediante la adición de caldo papa dextrosa. Ochocientos microlitros de esta suspensión de microesclerocios en caldo de papa dextrosa (40 microesclerocios) fueron colocados en 1 tubo plástico de 1,5 mL de capacidad, incubándose por 7 días a 30°C . Este procedimiento se hizo con 16 tubos de 1,5 mL de capacidad, colocando 8 bajo un régimen de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, y otros 8 bajo un régimen de total oscuridad durante las 24 horas del día. Al cabo de los 7 días, el micelio obtenido se filtró y se removió el exceso de humedad con papel absorbente, dejándolo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se pesó el micelio obtenido en cada tubo con una balanza electrónica de 1 mg de apreciación.

3) Hongo creciendo en celdas de placas de ELISA, en caldo de papa dextrosa

Se obtuvo una suspensión de microesclerocios en caldo de papa dextrosa, de la misma forma explicada en la metodología anterior. Igualmente se ajustó la concentración a 50 microesclerocios por cada mL. En celdas individuales de una placa de ELISA de fondo plano, se colocaron 200 μL de dicha suspensión (10 microesclerocios) (la máxima capacidad de estas celdas es de 300 μL). Para poder hacer la comparación directa con la metodología anterior, el procedimiento descrito se hizo en 4 celdas, para que el volumen resultante fuese 800 μL (lo mismo que en la segunda metodología). Este procedimiento se hizo 8 veces (es decir en 32 celdas), y esta placa se incubó por 7 días a 30°C con 12 horas de iluminación y 12 horas de oscuridad. Se preparó otra placa de forma similar a la explicada, y se incubó también por 7 días a 30°C pero bajo un régimen de total oscuri-

dad. Al cabo de los 7 días, el micelio obtenido cada 4 celdas se filtró y se removió el exceso de humedad con papel absorbente, dejándolo a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se pesó el micelio obtenido cada 4 celdas con una balanza electrónica de 1 mg de apreciación.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS DE LAS METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN DE MICELIO

Se utilizó un diseño de experimentos completamente al azar con 6 tratamientos (cada una de las 3 metodologías explicadas bajo 2 regímenes de luz) y 8 repeticiones. Las unidades experimentales consistieron en una cápsula de Petri para la primera metodología explicada, en un tubo de plástico de 1,5 mL de capacidad para la segunda metodología, y en 4 celdas de las placas de ELISA para la tercera. Los valores de peso obtenidos para las 48 unidades experimentales se sometieron a la prueba no paramétrica de Kruskal y Wallis para determinar la existencia o no de diferencias estadísticas en el peso de micelio obtenido entre las metodologías. Esta prueba fue realizada con el programa Statistix for Windows v. 8.0.

EXTRACCIÓN DE ADN

La extracción de ADN se ensayó de 6 formas distintas, sobre el mismo aislamiento del hongo sobre el cual se probaron las 6 metodologías de obtención de micelio. La metodología que permitió la mayor obtención de micelio fue la utilizada para generar el tejido utilizado en la extracción de ADN. Los protocolos fueron los siguientes:

1. Se tomaron 150 mg de micelio los cuales se maceraron con 1 mL de buffer CTAB (100 mM Tris HCl, 1 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% hexadeciltrimetil-bromuro de amonio [CTAB] p/v) en presencia de 10 μ L de mercaptoetanol y 10 μ L de proteinasa K (20 mg mL⁻¹). Esta suspensión se colocó en un tubo de plástico con tapa de 1,5 mL de capacidad, y se incubó durante 20 minutos a una temperatura de 65°C. Se agregaron 500 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) para precipitar las proteínas, agitando posteriormente los tubos de forma constan-

te durante 5 minutos. La suspensión se centrifugó por 10 minutos a 14000 rpm, la fase superior o sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo de plástico con 1,5 mL de capacidad, agregándose 750 μL de isopropanol previamente frío y 5 μL de acetato de amonio. La suspensión se dejó en reposo por 30 minutos en hielo, se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, y el pellet resultante se lavó dos veces con 200 μL de etanol al 80%. Se agregaron 50 μL de buffer TE para lograr la resuspensión del pellet.

2. La segunda metodología de extracción fue igual a la ya descrita pero haciendo dos veces el paso de precipitación de proteínas.
3. La tercera metodología de extracción fue igual a la primera ya descrita, pero utilizando buffer Dellaporta (Dellaporta *et al.* 1983) (100 mM Tris, 500 mM NaCl, 50 mM EDTA).
4. La cuarta metodología de extracción fue igual a la segunda ya descrita, pero utilizando buffer Dellaporta.
5. La quinta metodología de extracción fue igual a la primera ya descrita pero utilizando el buffer utilizado por Cenis *et al.* (1993) (200 mM Tris HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS p/v).
6. La sexta metodología de extracción fue igual a la segunda ya descrita pero utilizando buffer utilizado por Cenis *et al.* (1993).

Cada uno de los protocolos evaluados para la extracción de ADN se repitió tres veces. Las suspensiones resultantes de las seis metodologías utilizadas para la extracción de ADN fueron sometidas a electroforesis, junto a un marcador de PCR (Promega, Estados Unidos) de seis fragmentos, cada uno con una masa de aproximadamente 40 ng ($5 \mu\text{L}$)⁻¹ en un sistema horizontal de geles modelo MGU-252T (C.B.S., Estados Unidos) durante 60 minutos a 60 voltios en agarosa al 0,8%. Luego de ser teñido con bromuro de etidio se colocó en un transiluminador con luz ultra violeta y la imagen obtenida fue registrada mediante un sistema de fotodocumentación Visi-Doc-It (UVP, Cambridge, Reino Unido). Para tener un estimado de la cantidad de ADN obtenido con cada protocolo de extracción, en los geles se comparó la intensidad de las bandas de ADN obtenidas, con la intensidad de los fragmentos del marcador de PCR, cada uno

de los cuales corresponde a la cantidad de 40 ng de ADN. Esta comparación fue cualitativa, mediante apreciación visual.

LIMPIEZA DE ADN

Se probaron 3 metodologías de limpieza, las cuales se repitieron tres veces. Estos protocolos se efectuaron sobre la metodología de extracción de ADN que resultó con mayor rendimiento de ADN y menor presencia de ARN. La primera consistió en agregar ARNasa, la segunda consistió en una limpieza con acetato de amonio, y la tercera en una limpieza con acetato de amonio y ARNasa. Para la primera metodología se agregaron 1,25 μL de ARNasa a 20 μL de la suspensión de ADN, incubándose por 1 hora a 37°C. Para la segunda metodología se tomaron 20 μL de la suspensión de ADN y se le agregaron 70 μL de acetato de amonio 5M, se incubó por 30 minutos a 0°C y se centrifugó por 20 minutos a 14000 rpm. Ochenta microlitros de sobrenadante se transfirieron a un nuevo tubo de plástico con 1,5 μL de capacidad, lográndose la precipitación del ADN con 80 μL de isopropanol frío. Esta suspensión fue centrifugada a 14000 rpm durante 10 minutos, el pellet obtenido fue lavado dos veces con etanol 80% y resuspendido en 50 μL de buffer TE. Para la tercera metodología, se aplicó el mismo procedimiento explicado para la segunda metodología, y posteriormente se le agregaron 1,25 μL de ARNasa, incubándose por 1 hora a 37°C. Las suspensiones logradas en cada una de las metodologías se sometieron a electroforesis de forma similar a la explicada anteriormente. La calidad del ADN obtenido fue evaluada cualitativamente según la integridad que presentara la banda de ADN (mientras más íntegra mayor calidad) y según la cantidad de ARN observada (mientras mas ARN peor calidad del ADN). El ARN no fue cuantificado, lo que se hizo fue una apreciación cualitativa del tamaño de la zona del gel ocupada por ARN. Adicionalmente, para evaluar la calidad del ADN, se hizo una reacción en cadena de la polimerasa con el oligonucleótido OPA-01 para todas las muestras obtenidas, asumiendo que una amplificación efectiva indicaba ADN de buena calidad, mientras que la ausencia de amplificación

indicaba ADN de mala calidad o asociado a algunas moléculas que impedían la reacción en cadena de la polimerasa.

RESULTADOS

No fue posible obtener una cantidad mayor a 1 mg de micelio al usar cápsulas de Petri con medio PDA, o tubos de plástico de 1,5 mL conteniendo caldo de papa dextrosa. La tercera metodología descrita, en la cual se usaron placas de ELISA fue la única que permitió obtener una cantidad mayor a 1 mg de micelio (Fig. 1). Incubar las placas de ELISA en la oscuridad representó la obtención de más del doble de micelio que el obtenido al colocarlas en un régimen de oscuridad-claridad, permitiendo así obtener hasta 54 mg (13,50 mg por cada celda utilizada).

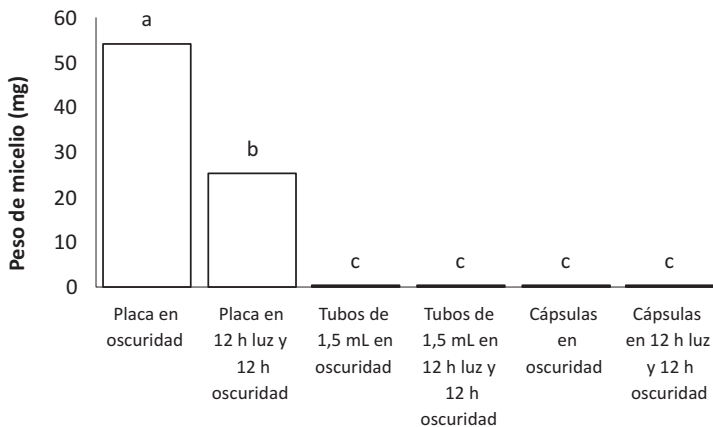


Figura 1. Peso de micelio obtenido bajo seis tratamientos. Las columnas identificadas con la misma letra no difieren estadísticamente ($P < 0,05$) según la prueba de Kruskal y Wallis.

En cuanto a la determinación de la metodología más efectiva para la extracción de ADN, dentro de cada protocolo no hubo diferencias entre las tres repeticiones. Tres de las metodologías permitieron la obtención de aproximadamente $40 \text{ ng } (5 \mu\text{L})^{-1}$ (Figura 2). La que arrojó mejores resultados fue la cuarta metodología descrita, en la que se utilizó buffer Dellaporta y se realizó la doble precipitación

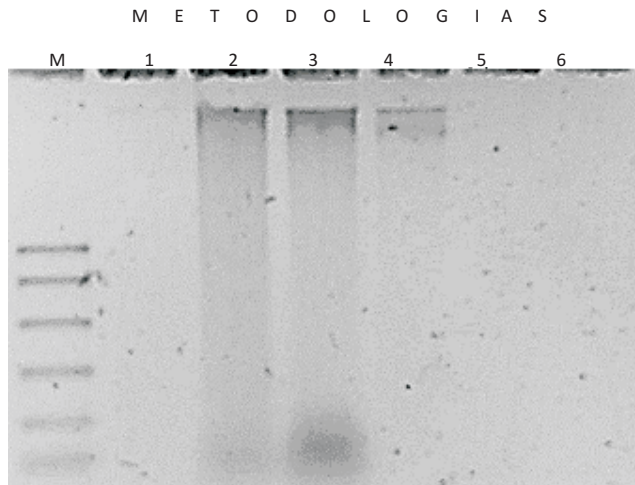


Figura 2. Gel mostrando el ADN obtenido por las seis metodologías aplicadas para su extracción (1. buffer CTAB y un paso de precipitación de proteínas, 2. buffer CTAB y dos pasos de precipitación de proteínas, 3. buffer Dellaporta y un paso de precipitación de proteínas, 4. buffer Dellaporta y dos pasos de precipitación de proteínas, 5. buffer Cenis y un paso de precipitación de proteínas, 6. buffer Cenis y dos pasos de precipitación de proteínas). M es un marcador de PCR donde cada segmento representa 40 ng.

de proteínas con fenol:cloroformo:alcoholisoamílico (25:24:1), obteniéndose ADN en una cantidad aproximada a $40 \text{ ng } (5 \mu\text{L})^{-1}$ y de buena calidad, puesto que es muy pequeña la cantidad de ARN observada. La cantidad de ADN obtenido con las metodologías 2 y 3 está alrededor de los $40 \text{ ng } (5 \mu\text{L})^{-1}$ pero asociado a ARN o ADN degradado. En el protocolo 1 la visualización de ADN fue muy baja y nula en el quinto y sexto.

Con relación a las tres limpiezas de ADN ensayadas, visualmente pudo observarse que el equilibrio entre unos $40 \text{ ng } (5 \mu\text{L})^{-1}$ de ADN y la mínima cantidad de ARN y/o ADN degradado se logró con la limpieza con acetato de amonio y ARNasa. La calidad de ADN obtenido con esta metodología de limpieza se corroboró al hacer PCR, pues sólo el uso de éste fue el que logró productos de amplificación (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

Una gran cantidad de protocolos de extracción de ADN de hongos requieren de alrededor de 50-500 mg de micelio (*e.g.* Plaza *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 2006; Gonzáles-Mendoza *et al.*, 2010). La obtención de 13,50 mg de micelio en cada celda de una placa de ELISA incubada a 30°C en la oscuridad, permite señalar que el uso de 40 celdas permitiría la obtención de suficiente micelio para la extracción de ADN mediante cualquiera de los protocolos reportados por los autores mencionados. Los resultados del presente trabajo con relación a la metodología más eficiente en la extracción de ADN no son coincidentes con los protocolos de extracción de ADN reportados en otras caracterizaciones moleculares de *M. phaseolina*, puesto que en ninguna de éstas se usó el buffer de Dellaporta. Almeida *et al.* (2003), Jana *et al.* (2003), Jana *et al.* (2005) y Purkayastha *et al.* (2006) al hacer extracción de ADN de *M. phaseolina*, tuvieron en común con el presente trabajo que el micelio fue obtenido en medio líquido de caldo papa dextrosa, con una temperatura de incubación entre 26 y 30°C. La diferencias en los protocolos de extracción se dan en el buffer utilizado (CTAB para los tres primeros trabajos mencionados y 50 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM EDTA y 3% SDS para el último trabajo mencionado) así como en el tiempo de incubación del hongo para la utilización del micelio, desde 3 hasta 14 días. En este trabajo también se evaluó el buffer CTAB, pero la asociación que resultó entre el ADN extraído y grandes cantidades de ARN hacen que este buffer no sea considerado adecuado, debido a que el ARN pudiera actuar como inhibidor de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sawyer *et al.* 2004), o pudiera reemplazar al ADN al servir de molde para eventuales amplificaciones de PCR que conducirían a caracterizaciones erróneas. Para el uso de este buffer en la extracción de ADN de *M. phaseolina* es requerida la remoción del ARN antes de la utilización de ADN en PCR.

Los resultados de este trabajo indican que la presencia de ARN y/o impurezas que coprecipitan con el ADN inhiben la reacción en cadena de la polimerasa, y logran ser eliminados mediante la acción

enzimática de la ARNasa y la adición de acetato de amonio. Rads-trom *et al.* (2004) señalan que los inhibidores de PCR actúan inactivando la polimerasa del ADN, o degradando el ácido nucleico de la muestra. La ARNasa elimina el ARN que precipita junto al ADN en el proceso de extracción, mientras que el acetato de amonio, al incrementar el gradiente salino, contribuye con la remoción de las proteínas que coprecipitan junto a los ácidos nucleicos (Aidar y Peres, 2007; Doosty *et al.*, 2012) así como de algunos polisacáridos en forma similar a como lo hace el acetato de potasio (Ribeiro y Lovato, 2007). Esta remoción se logra mediante la precipitación de estos compuestos partiendo de la suspensión que contiene ADN en la fase líquida.

Los resultados de este trabajo son una importante contribución al logro de futuras caracterizaciones moleculares de *Macrophomina phaseolina*, puesto que determinan la forma más eficiente de lograr suficiente micelio para la extracción de ADN, así como el protocolo más efectivo en la obtención y purificación de este ácido nucleico.

LITERATURA CITADA

- AIDAR, M. y S. PERES. 2007. A single and cost-effective protocol for DNA isolation from bucal epithelial cells. *Brazilian Dentist Journal* 18:148-152.
- ALMEIDA, A., R. ABDELNOOR, C. ARRABAL, V. CARVALHO, D. JACOUD, L. MARIN, M. BENATO y C. CARVALHO. 2003. Genotypic diversity among Brazilian isolates of *Macrophomina phaseolina* revealed by RAPD. *Fitopatología Brasileira* 28:279-285.
- CENIS, J., P. PEREZ y A. FERERES. 1993. Identification of aphid (Homoptera:Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America* 86(5): 545-550.
- COHEN, R., N. OMARI, A. PORAT y M. EDELSTEIN. 2012. Management of *Macrophomina* wilt in melons using grafting or fungicide soil application: pathological, horticultural and economical aspects. *Crop Protection* 35:58-63.

- DELLAPORTA, S., J. WOOD y J. HICKS. 1983. A plant DNA minipreparation: versión II. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1:19-21.
- DOOSTY, B., R. DRIKVAND, E. SALAHUARZI y H. AMIR. 2012. Comparative analysis and optimization of different DNA extractions protocols in *Satureja khuzistanica*. *International Journal of Biology* 4:4.
- GONZÁLEZ-MENDOZA, D., R. ARGUMEDO-DELIRA, A. MORALES-TREJO, A. PULIDO-HERRERA, L. CERVANTES-DÍAZ, O. GRIMALDO-JUAREZ y A. ALARCÓN. 2010. A rapid method for isolation of total DNA from pathogenic filamentous plant fungi. *Genetics and Molecular Research* 9:162-166.
- IQBAR, U., T. MUKHTAR, S. MUHAMMAD, I. UL-HAQUE y S. RIAZ. 2010. Host plant resistance in backgram against charcoal rot (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.). *Pakistan Journal of Phytopathology* 22:126-129.
- JANA, T., T. SHARMA, R. PRASAD y D. ARORA. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. *Microbiological Research* 158:249-257.
- JANA, T., T. SHARMA y N. SINGH. 2005. SSR-based detection of genetic variability in the charcoal root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. *Mycological Research*. 109:81-86.
- LAURENTIN, H. 2009. Data analysis for molecular characterization of plant genetic resources. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56: 277-292.
- LAURENTIN, H. 2011. *Genética Agrícola*. Editorial Académica Española. Saarbrücken. Alemania. 233 pp.
- MELO, S., C. PUNGARTNIK, J. CASCARDO y M. BRENDEL. 2006. Rapid and efficient protocol for DNA extraction and molecular identification of the basidiomycete *Crinipellis pernicioso*. *Genetics and Molecular Research* 5:851-855.
- PLAZA, G., R. UPCHURCH, R. BRINGMON, W. WHITMAN y K. ULFIG. 2004. Rapid DNA extraction for screening soil filamentous fungi using PCR amplification. *Polish Journal of Environmental Studies* 13:315-318.

- PURKAYASTHA, S., B. KAUR, N. DILBAGHI y A. CHAUDHURY. 2006. Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathology* 55:106-116.
- RIBEIRO, R. y M. LOVATO. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. *Genetic Molecular Research* 6:173-187.
- RADSTROM, P., R. KNUTSSON, P. WOLFFS, M. LOVENKLEV y C. LOFSTROM. 2004. Pre-PCR processing: strategies to generate PCR-compatible samples. *Molecular Biotechnology* 26:133-146.
- RAMEZANI, H. 2008. Biological control of root-rot of eggplant caused by *Macrophomina phaseolina*. *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Sciences* 4:218-220.
- SAWYER, M., G. RENSEN, W. SMITH, A. WONG, B. OSBURN y J. CULLOR. 2004. Overcoming RNA inhibition in the fluorescent chain reaction assay to enhance detection of bovine DNA in cattle feeds. *Foodborne Pathogen Diseases* 1:105-113.
- WYLLIE, T. 1989. Charcoal rot. In: *Compendium of soybean diseases*. 3era. edición. J.B. Sinclair y P.A. Backman eds. Páginas 30-33. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.