

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y POR PCR DE *Rhizoctonia solani* KÜHN A PARTIR DE FRUTOS DE CALABAZA PIPIANA Y SU MANEJO EN INVERNADERO

MORPHOLOGICAL AND PCR IDENTIFICATION OF *Rhizoctonia solani* KÜHN ISOLATED FROM PIPIANA PUMPKIN FRUITS AND GREENHOUSE MANAGEMENT

José Francisco Díaz Nájera¹, Mateo Vargas Hernández², Sergio Ayvar Serna³, Omar Guadalupe Alvarado Gómez^{4*}, Juan Fernando Solís Aguilar⁵, José Aurelio Durán Ramírez³, Huizar Leonardo Díaz Cenicerós⁵ y Adrián Hernández Aguilar⁵

¹ Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia, Programa de Posgrado en Horticultura, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México C.P. 56230.

² Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Suelos, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México C.P. 56230.

³ Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Avenida Vicente Guerrero Núm. 81. Iguala, Guerrero, C.P. 40000.

⁴ Facultad de Agronomía, UANL. Av. Universidad s/n, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, N.L. CP66451.

⁵ Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México C.P. 56230.

RESUMEN

Cucurbita argyrosperma (calabaza pipiana), es un cultivo importante en el estado de Guerrero. El precio de venta por tonelada de semilla se ha incrementado de \$ 15, 500 en el año 2005 a \$ 35, 000 en 2011, lo que ha propiciado que se incremente la superficie sembrada. Los hongos del suelo causan pudrición en frutos reduciendo los rendimientos. El objetivo del estudio fue identificar al agente causal involucrado en la pudrición de frutos de calabaza pipiana y evaluar alternativas de control químico y biológico en invernadero. Durante los meses de agosto y septiembre de 2012, se recolectaron frutos, con diferentes síntomas y niveles de pudrición en la zona norte del Estado de Guerrero. Después de identificar morfológicamente se analizó molecularmente mediante el ADN del patógeno, las muestras se analizaron con la técnica de PCR, con los oligonucleótidos ITS-1/ ITS-4, los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS). Se identificó a *Rhizoctonia solani* en los frutos analizados. Los productos de amplificación fueron secuenciados presentando un 99 % de similitud con secuencias de Estados Unidos de acuerdo con el GenBank. La secuencia consenso fue depositada en GenBank con el número de acceso KJ652221. *Trichoderma asperellum* y los ingredientes activos iodo libre y quintozeno: PCNB, ejercieron el mejor control al retrasar la presencia del patógeno en frutos de calabaza pipiana.

Palabras clave: *Cucurbita argyrosperma*, patógeno, diagnóstico, manejo.

ABSTRACT

The pipiana pumpkin is an important crop in the state of Guerrero; the selling price per ton of the seeds has increased from \$15 500 in 2005 to \$35 000 in 2011, which means that the surface sown in this area has also increased.

The soil fungi cause severe problems by reducing fruit yields. This study aimed to identify the causal agent involved in fruit rot in pipiana pumpkin and evaluate alternative chemical and biological control in greenhouses. During the months of august and september 2012, pipiana pumpkin fruits with different symptoms and levels of fruit rot were collected in the northern part of state of Guerrero. After identifying morphologically, DNA extracts were analyzed using PCR with ITS – 1/ITS-4 primers, which amplify an intergenic internal spacer (ITS). *Rhizoctonia solani* was detected in fruits of pipiana pumpkin in the state of Guerrero. The amplification products were sequenced showing 99 % of similarity to sequences from the USA. The consensus sequence was deposited in GenBank with the accession number KJ652221. *Trichoderma asperellum* and the active ingredients free iodine and quintozeno: PCNB exercised better control by delaying the presence of the pathogen in pipiana pumpkin fruits.

INTRODUCCIÓN

La familia *Cucurbitaceae* incluye 118 géneros y 825 especies y México es uno de los más importantes centros de diversidad, teniendo un importante papel cultural y económico dentro de la sociedad (Lira *et al.*, 2002). La calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma*) es un cultivo importante en el estado de Guerrero (Ayvar *et al.*, 2007); siendo uno de principales estados productores de semilla a nivel nacional (SIAP, 2012); además, el precio de venta por tonelada de semilla ha aumentado de \$ 15 500 en el año 2005 a \$ 35 000 en 2011, lo que ha propiciado que se incremente la superficie sembrada en la entidad de 4228 a 5742 ha (SIAP, 2012). Sin embargo, durante el verano las condiciones cálidas y de alta humedad relativa favorecen la presencia de enfermedades, siendo un problema para la producción de cucurbitáceas en México

*Autor para envío de correspondencia: Omar Guadalupe Alvarado Gómez
Correo electrónico: omar-alvarado@prodigy.net.mx

Recibido: 18 de febrero de 2014

Aceptado: 12 de mayo de 2014

(Zitter *et al.*, 2004) y varias partes del mundo (Cohen *et al.*, 2007). En algunas zonas del estado de Guerrero, se cultiva calabaza pipiana en suelos planos, pesados y mal drenados, que se conjuntan con el hábito de crecimiento rastrero e indeterminado del cultivo, para generar un microclima con condiciones óptimas para la proliferación de hongos fitopatógenos habitantes del suelo, causando pérdidas importantes en el rendimiento, disminuyendo los ingresos económicos de los productores dedicados a esta actividad (Ayvar *et al.*, 2007). Los patógenos se controlan normalmente con fungicidas sistémicos que son compuestos capaces de penetrar la cutícula de las hojas y dispersarse en la planta. Se caracterizan por sus propiedades protectoras y curativas, muy efectivos a bajas concentraciones para el control de la enfermedad durante largos periodos de tiempo (Gisi y Sierotzki, 2008). Sin embargo, su uso excesivo ha provocado contaminación ambiental y su eficacia disminuye con el paso del tiempo, debido a la evolución de patógenos resistentes (Bartlett *et al.*, 2002). En los agrosistemas, recientemente ha crecido la tendencia del control de enfermedades de las plantas sin utilizar productos químicos (Guigón *et al.*, 2010). En los últimos 30 años, se han utilizado otras alternativas, incluido el uso de microorganismos para el control biológico; esta práctica se basa en el uso de organismos enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Lim y Kim, 2010; Yang *et al.*, 2012). No obstante de los éxitos comerciales, hasta el momento, son todavía limitados y se basan principalmente en hongos de los géneros *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Streptomyces*, *Coniothyrium* y *Candida*, así como bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Agrobacterium* (Harman *et al.*, 2010; Pliego *et al.*, 2011). La mejor estrategia para el control de las enfermedades, es el manejo integrado (Antonopoulos *et al.*, 2010; Bi *et al.*, 2012). El objetivo de la presente investigación fue identificar morfológica y molecularmente al agente causal de la pudrición de frutos de calabaza pipiana y evaluar alternativas de control químico y biológico en invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Identificación morfológica del hongo presente en frutos de calabaza pipiana

Durante los meses de agosto y septiembre del 2011 se recolectaron frutos de *C. argyrosperma*, con diferentes síntomas y nivel de pudrición, en el campo experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, localizado en el municipio de Cocula, Gro., localizado en la zona norte de Guerrero, ubicado geográficamente a 18° 19' N, 99° 39' O del meridiano de Greenwich, a una altitud de 640 m (Martínez *et al.*, 2011). El tamaño de muestra y tipo de muestreo se realizó bajo la metodología propuesta por Pedroza (2009), se utilizó un muestreo sistemático en transecto en W. Los síntomas considerados fueron pudriciones de frutos con lesiones acuosas, de color pardo a marrón, en ocasiones hundidas, con cráteres e irregulares, el área con cráteres en ocasiones con apariencia costrosa (Zitter *et al.*, 2004). De los

frutos de calabaza con síntomas y signos de pudrición, se tomaron 5 trozos de tejido de 0.5 cm² de la zona de avance de la enfermedad, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % por dos minutos; se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril; se sembraron 100 muestras de tejido en cajas petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), elaborado según Singlenton *et al.* (1992). Cada colonia desarrollada se aisló y se purificó por el método punta de hifa. De las cepas puras del último reaislamiento se hicieron preparaciones permanentes para observar al microscopio las características morfológicas del agente causal. Se midió el largo y ancho de 50 estructuras representativas del aislamiento. La identificación a nivel género se realizó siguiendo las claves de Singlenton *et al.* (1992) y Wantanabe (2002).

Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron 20 frutos en etapa de cosecha del genotipo criollo Apipilulco, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % por dos minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril, se utilizó un fruto como unidad experimental con cuatro repeticiones en un arreglo completamente al azar. El aislamiento mencionado se cultivó en medio PDA para el incremento de inóculo. Después de 15 días de crecimiento, se prepararon suspensiones de inóculo en agua destilada estéril; se ajustó a una concentración a 80×10³ propágulos mL⁻¹, cada fruto se inoculó mediante aspersion de 2.5 mL de la suspensión; como testigo se utilizaron 5 frutos, los cuales se inocularon con agua destilada estéril con el mismo procedimiento. Los 25 frutos inoculados se colocaron en charolas de unicel de 60×40 cm, desinfectadas con etanol al 70 %. Se incubaron a 26°C y 80 % de humedad relativa, los síntomas se registraron diariamente por ocho días. De las zonas de avance del hongo en los tejidos dañados, se tomaron 10 muestras de éstos (0.5 cm²) y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min, posteriormente se enjuagaron tres veces consecutivas con agua destilada estéril y se sembraron en PDA. Las características morfológicas de la colonia y hongo reaislado se compararon con las originalmente inoculadas, para comprobar los postulados de Koch. El hongo reaislado, se purificó e incubó durante 15 días en medio de cultivo PDA para la extracción de ADN.

Identificación molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de 50 a 100 mg de micelio utilizando el kit DNeasy^{MR}, siguiendo el procedimiento del fabricante (Qiagen, 2012). El procedimiento fue repetido a partir de 4 muestras del hongo. Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos con los oligos ITS-1fu 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tctccgcttattgatatgc-3' (White *et al.*, 1990); los cuales amplifican un espaciador intergénico interno (ITS) y generan un producto de talla variable entre 500 y 900 pares de bases (pb) aproximadamente. Esta práctica se realizó con una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL, cuyos componentes finales fueron: amortiguador de reacción 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 200 nM de cada uno, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de *Taq*

DNA polimerasa. El programa térmico consistió en mantener 2 min a 94°C (un ciclo), seguido de 30 seg a 94°, 30 seg a 55° y 1 min a 72°C (35 ciclos) y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.5 %, y las bandas se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP y se tomaron fotografías. Los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciados directamente y los resultados se compararon con las secuencias de hongos disponibles en el banco de genes (GenBank) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) del Instituto Nacional de Salud (NIH) de E.E.U.U.

Manejo en invernadero

Con la finalidad de comparar el efecto de diferentes ingredientes activos sobre el patógeno aislado, la presente investigación se realizó en el invernadero de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo México. El material vegetal utilizado fue el genotipo AP de calabaza pipiana (*C. argyrosperma*), utilizando solo frutos tiernos de 150 g de peso fresco.

Obtención, aplicación del inóculo y tratamientos

Del muestreo previamente realizado sobre frutos con diferentes síntomas y niveles de daño; se obtuvo un aislamiento monospórico, mismo que fue sembrado en PDA para su incremento masivo (Singlenton *et al.*, 1992). El material se incubó a temperatura ambiente (24 ± 3 °C) por diez días con la finalidad de que el patógeno cubriera en su totalidad la caja petri. Posteriormente, se ajustó una suspensión de propágulos a una concentración de $80 \times 10^3 \text{ mL}^{-1}$. Se aplicaron los tratamientos (Tabla 1), con un aspersor manual marca RL FLO MASTER con capacidad de 2 L, asperjando sobre la superficie de los frutos con un gasto de agua de 300 L ha⁻¹

Tabla 1. Productos químicos y biológicos evaluados contra *R. solani* aislada a partir de frutos de calabaza pipiana (*C. argyrosperma*).

Table 1. Chemical and biological products tested against *R. solani* isolated from fruits of pipiana pumpkin (*C. argyrosperma*).

No.	Tratamiento	Ingrediente activo	DosisL ⁻¹
1	Trichoderma cepa CSAEGro	<i>Trichoderma asperellum</i>	1×10^8 UFC mL ⁻¹
2	PHC® Biopak-F®	<i>Bacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.	3 g
3	PHC® Root Mate®	<i>Trichoderma virens</i> cepa G-41	3 g
4	Q 2000	Yodo libre	5 mL
5	Benomil	benomilo	1.6 g
6	Pentaclor*600 F	quintozeno: PCNB 46 %	8mL
7	Testigo	Sin aplicación	--

Fuente: Thompson (2012).

previa calibración, se dejó transcurrir 5 horas para permitir la reentrada de los productos y transcurrido ese tiempo se asperjó 2.5 mL de la concentración ajustada del patógeno previa calibración.

Variable evaluada

La variable evaluada fue días a la presencia de *R. solani*, la cual se consideró determinando en cuantos días después de aplicar los tratamientos e inoculación del patógeno, iniciaban la aparición de colonias sobre los frutos de calabaza.

Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por cuatro frutos, por las características del experimento se consideró a toda la unidad experimental como parcela útil. A los datos obtenidos de la variable de estudio, se le realizó un análisis de varianza. De igual forma, se efectuó una prueba de comparación múltiple de medias utilizando el método Tukey con nivel de significancia al 5 % y una prueba de contrastes ortogonales para comparar el grupo de tratamientos químicos contra el grupo de tratamientos biológicos. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software Statistical Analysis System (SAS, 2009).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación morfológica del hongo presente en frutos de calabaza pipiana

Las colonias de las cepas aisladas de los frutos inoculados mostraron un crecimiento micelial de color marrón a castaño algodonoso; similar al aislamiento original. Este patógeno mostró micelio maduro formando ramas en ángulo recto, hifas de 5-8 µm de ancho y esclerocios de 1-3 mm de diámetro, típico de *R. solani* (Sneh *et al.*, 1991; Wantanabe, 2002). Por las características de este hongo se demostró que se trató de *R. solani* (Zitter *et al.*, 2004) (Figura 1).



Figura 1. Características morfológicas de *R. solani*. 1) constricción, 2) septas y 3) ramificación en ángulo recto.

Figure 1. Morphological characteristics of *R. solani*. 1) hypha constrict, 2) septa and 3) branching at right angles.

Identificación molecular

Las regiones intergénicas internas ITS de los genes ribosomales (ARNr) amplificadas por PCR, del aislamiento identificado morfológicamente como *R. solani*, tuvo una talla de 700pb que concuerda con la talla esperada para la especie. Las secuencias obtenidas tuvieron un 99 % de similitud con la región ITS, cuya alineación coincidió con la secuencia de *R. solani* JX050241.1 (GenBank).

Manejo en invernadero

Días transcurridos a la presencia de *R. solani*.

Esta característica es importante, puesto que una vez identificada la presencia del patógeno en frutos tiernos estos se dañan por completo y se descomponen. Esta variable en estudio mostró diferencias significativas ($P < 0.0156$) entre *Trichoderma asperellum* y los ingredientes activos, iodo libre y quintozeno: PCNB, retardaron la aparición de *R. solani* al día 4.67, 4.42 y 4.42 respectivamente, el testigo se diferenció de todos los tratamientos, apareciendo el patógeno a los 3.17 días después de la inoculación (Figura 2). Al respecto Kullnig et al., (2001) señalan que los factores clave que contribuyen al efecto antagonico de *Trichoderma* es su rápido crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos y características fisiológicas. Hoyos et al. (2008) evaluaron varios aislamientos de *Trichoderma in vitro* e invernadero como agentes biocontroladores de *R. solani* y *Sclerotium rolfsii* y la especie *asperellum* ejerció el mejor control contra esos patógenos. El iodo libre ejerció un buen control de *R. solani*, lo cual se debe a que este ingrediente activo tiene cualidades germicidas (Thompson, 2012; Hong et al., 2008). La actividad fungicida de los cloronitrobenzenos ha sido estudiada por Mendoza

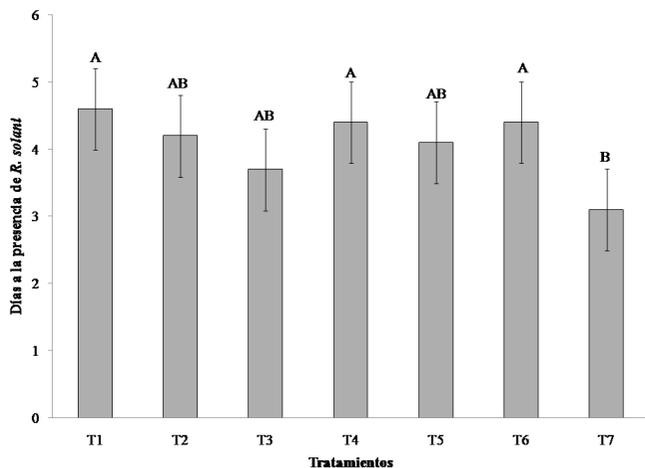


Figura 2. Días a la presencia de *R. solani* por tratamiento. T1: *Trichoderma* cepa CSAEGro; T2: PHC *Biopak-F*; T3: PHC*RootMate*; T4: Q 2000; T5: Benomil; T6: Pentaclor*600 F; T7: Testigo.

Figure 2. Days of the presence of *R. solani* per treatment. T1: *Trichoderma* CSAEGro strain; T2: PHC *Biopak-F*; T3: PHC*RootMate*; T4: Q 2000; T5: Benomil; T6: Pentaclor*600 F; T7: Witness.

(1990), quién señala que el pentacloro (PCNB, quintozeno) se ha utilizado como un fungicida comercial contra patógenos de plantas transmitidos por el suelo como *R. solani*. Generalmente se acepta que la fungitoxicidad de este compuesto es debida a la peroxidación de lípidos en las membranas, lo que comprueba en esta investigación un buen control.

Prueba de contrastes ortogonales

Esta prueba indicó que, la comparación entre productos biológicos contra los químicos resultó no significativa ($P=0.6000$), el grupo de tratamientos biológicos en promedio retardó en 4.22 días la aparición de *R. solani*, mientras que el grupo de tratamientos químicos la atrasó en promedio 4.33 días. A pesar de que no existió diferencia significativa, el grupo de productos químicos fue ligeramente mejor con una diferencia en la aparición del patógeno de 0.11 días (Figura 3).

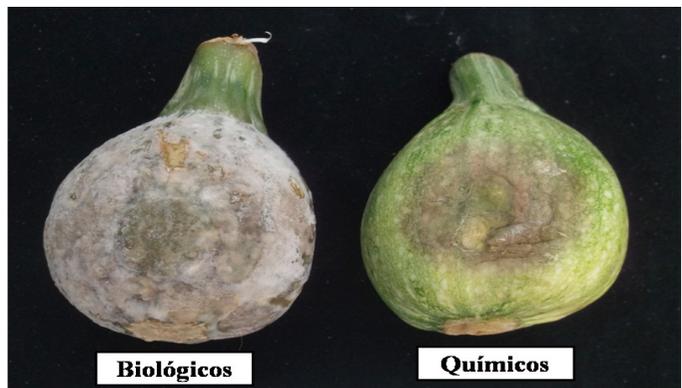


Figura 3. Comparación del grupo de fungicidas químicos vs. Biológicos en la aparición de *R. solani*.

Figure 3. Comparison of the groups of chemical vs. biological fungicides on the occurrence of *R. solani*.

CONCLUSIONES

El agente causal de la pudrición de frutos de calabaza pipiana fue *R. solani*, mismo que fue identificado morfológica y molecularmente. *Trichoderma asperellum* y los ingredientes activos, iodo libre y quintozeno: PCNB, fueron los que ejercieron el mejor control al retrasar la presencia del patógeno en frutos.

LITERATURA CITADA

- Antonopoulos, D.F., Melton, T. y Mila, A.L. 2010. Effects of chemical control, cultivar resistance, and structure of cultivar root system on black shank incidence of tobacco. *Plant Disease* 94:613-620.
- Ayvar, S.S., Mena, B.A., Durán, R.J.A., Cruzaley, S.R., y Gómez, M.N.O. 2007. La calabaza pipiana y su manejo integrado. Folleto técnico. Fundación Produce de Guerrero, A. C. Campo Experimental Iguala. CSAEGro. Iguala, Gro. México. 26p.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M. y Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Management Science* 58: 649-662.

- Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M.K. y Hao, J.J. 2012. Inhibitory effects of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. *Plant Disease* 96:797-803.
- Cohen, R., Burger, Y., Horev, C., Koren, A. y Edelstein, M. 2007. Introducing grafted cucurbits to modern agriculture: The Israel experience. *Plant Disease* 91(8):916-923.
- Gisi, U. y Sierotzki, H. 2008. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology* 122:157-167.
- Guigón, L.C., Guerrero, P.V., Vargas, A.F., Carvajal, M.E., Ávila, Q.G.D., Bravo, L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S. y Lorito, M. 2010. Identificación molecular de cepas nativas de *Trichoderma* spp. su tasa de crecimiento in vitro y antagonismo contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28:87-96.
- Harman, G.E., Obregón, M.A., Samuels, G.J. y Lorito, M. 2010. Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. *Plant Disease* 94(8):928-939.
- Hong, C.L., Weng, H.X., Qin, Y.C., Yan, A.L. y Xie, L.L. 2008. Transfer of iodine from soil to vegetables by applying exogenous iodine. *Agronomy for Sustainable Development* 28: 575-583.
- Hoyos, C.L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, L., y Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana* 26(3): 451-458.
- Kullnig, C.M., Krupica, T., Woo, S.L., Mach, R.L., Rey, M., Benitez, T., Lorito, M. y Kubicek, C.P. 2001. Confusion abounds over identities of *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycological Research* 105: 769-772.
- Lim, J.H. y Kim, S.D. 2010. Biocontrol of *Phytophthora* Blight of Red Pepper Caused by *Phytophthora capsici* Using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 Formulations. *Journal of The Korean Society for Applied Biological Chemistry* 53(6):766-773.
- Lira, R., Villaseñor, J.L. y Ortiz, E. 2002. A proposal for the conservation of the family *Cucurbitaceae* in Mexico. *Biodiversity and Conservation* 11:1699-1720.
- Martínez, R.R.D., Reyna, S.L., Torres, H.G., Mastache, L.A.A., y Michel A.A.C. 2011. Evaluación de la fertilidad y prolificidad en ciclos reproductivos de ocho meses durante tres estaciones en ovejas pelibuey en el trópico seco mexicano. *Revista Científica Facultad de Ciencias Veterinarias* 21(5):383-387.
- Mendoza, Z.C. 1990. Fungicidas sistémicos y su modo de acción. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Parasitología Agrícola. 91 p.
- Pedroza, S.A. 2009. Monitoreo y escalas visuales en la evaluación de las enfermedades. En: Tópicos selectos de estadística aplicados a la fitosanidad. Bautista, M.N., Soto, R.L., Pérez, P.R. (eds.). Colegio de Postgraduados. IPN CIIDIR-Oaxaca. Montecillo, Texcoco Edo. de México. 256 p.
- Pliego, C., Ramos, C., Vicente, A. y Cazorla, F.M. 2011. Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soilborne fungal plant pathogens. *Plant and Soil* 340:505-520.
- Quiagen. 2012. Manual del kit QIAamp® DSP DNA Blood Mini. Versión 2. Alemania.
- SAS Institute Inc. 2009. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute incorporation, Cary, N.C. USA. 1028p.
- SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2012. Publicado en línea en: <http://www.siap.gob.mx>.
- Singleton, L.L., Mihail, J.D. y Rush, Ch. M. 1992. Methods for research on soil borne Phytopathogenic Fungi. APS Press. St. Paul, Minesota, USA. 264p.
- Sneh, B., Burpee, L., y Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minesota, USA. 133 p.
- Thompson. PLM. 2012. Diccionario de especialidades agroquímicas Edición N° 22. México, D.F. 1840p.
- Watanabe, T. 2002. Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultures Fungi and Key to Species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: M.A., Innes, D.H., Gelfand, J.J., Sninsky, and T.J., White (eds.). PCR Protocols. Pp.315-322. Academic Press. San Diego, CA.
- Yang, M.M., Xu, L.P., Xue, Q.Y., Yang, J.H., Xu, Q., Liu, H.X. y Guo, J.H. 2012. Screening potential bacterial biocontrol agents towards *Phytophthora capsici* in pepper. *European Journal of Plant Pathology* 134:811-820.
- Zitter, T.A., Hopkins, D.L. y Thomas, C.E. 2004. Plagas y enfermedades de las *cucurbitáceas*. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi Prensa. 88 p.