

**UNIVERSIDAD DE SONORA**

**DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA**

**“HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A PUDRICIONES  
DE RAÍZ Y CUELLO EN PLANTAS DE SANDÍA (*Citrullus lanatus*)  
EN LA COSTA DE HERMOSILLO, SONORA”**

**T E S I S**

**SAÚL ENRIQUE URIBE RIVERA**

**JULIO DE 2014**

# Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

**“HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A PUDRICIONES  
DE RAÍZ Y CUELLO EN PLANTAS DE SANDÍA (*Citrullus  
lanatus*) EN LA COSTA DE HERMOSILLO, SONORA”**

**T E S I S**

**SAÚL ENRIQUE URIBE RIVERA**

**JULIO DE 2014**

“HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A PUDRICIONES DE RAÍZ Y  
CUELLO EN PLANTAS DE SANDÍA (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai)  
EN LA COSTA DE HERMOSILLO, SONORA”

TESIS

Sometida a la consideración del

Departamento de Agricultura y Ganadería

de la

Universidad de Sonora

Por

SAÚL ENRIQUE URIBE RIVERA

Como requisito parcial para obtener  
el título de Ingeniero Agrónomo  
Fitotecnista

Julio de 2014

Esta tesis fue realizada bajo la Dirección del Consejo Particular aprobada y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

## INGENIERO AGRÓNOMO FITOTECNISTA

CONSEJO PARTICULAR:

DIRECTOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. ERNESTO FERNANDEZ HERRERA

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSE COSME GUERRERO RUIZ

ASESOR:

  
\_\_\_\_\_  
M.C. PATRICIO VALENZUELA CORNEJO

ASESOR:

\_\_\_\_\_  
M.S. EVERARDO ZAMORA

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por haberme permitido concluir mis estudios universitarios y permitirme vivir estos 23 años.

A la Universidad de Sonora, que a través del Departamento de Agricultura y Ganadería me permite obtener el grado de Ingeniero agrónomo.

Al **Dr. Ernesto Fernández Herrera**, por haber aceptado dirigir mi trabajo de tesis y su apoyo constante para lograr la culminación del mismo. Por su sincera amistad y compañerismo en todo momento, por tomar el tiempo de revisar y corregir mis errores, por las clases impartidas y el conocimiento y momentos compartidos, muchas gracias.

Al **Dr. José Cosme Guerrero Ruiz** por aceptar ser asesor del presente trabajo, por el conocimiento compartido y los buenos momentos de compañerismo y trabajo, así como las experiencias en campo que juntos desarrollamos.

Al **MC. Patricio Valenzuela Cornejo** por aceptar ser asesor del presente trabajo, y su apoyo y sugerencias para la realización del mismo.

A mis compañeros de generación, en especial a **Arturo Vargas Pérez** y **José salomón Santiago Arias**, por mostrarme en todo tiempo su sincera amistad y apoyo, sobre todo por las buenas experiencias compartidas en esta escuela y por los buenos momentos.

Además a mi compañero **Irving Noriega Tapia**, por siempre estar allí cuando lo requería y por su incondicional amistad.

A mi compañera **Ivonne Ramírez Ramírez**, por su sincera y apreciable amistad a lo largo de mi estancia en el departamento.

A todos los maestros del DAG por compartir su conocimiento y experiencia a lo largo de las clases, a cada uno de los compañeros que me brindaron su amistad mientras estuve aquí como estudiante, muchas gracias.

## DEDICATORIA

A mi familia:

A mi padre: **Saúl Uribe Araujo**

Y a mi madre: **Nancy Rivera Coronado**

Por su ayuda, ya que sin ustedes no hubiera podido lograrlo.

Mis abuelos:

**Rodolfo Rivera Osuna y Eva Olivia Coronado Sánchez**, por ser ejemplo de trabajo y dedicación constante, además de ser la inspiración desde la infancia para haber elegido la carrera de Ing. Agrónomo.

A mis hermanas **Lesly Mariela Uribe Rivera e Itzel María Uribe Rivera**, por su apoyo en las buenas y en las malas. Gracias.

Con especial cariño a mi ex escuela:

**Centro de Bachillerato Tecnológico Industrial y de Servicios No.11**, por enseñarme los frutos del esfuerzo constante y del trabajo, así como por forjarme con principios y valores en esa etapa tan bonita de la vida y por los buenos momentos y experiencias que allí viví; con especial aprecio a la maestra: **Norma Alicia Ruiz Bujanda** por su ayuda, consejos, y siempre estar a disposición ante cualquier situación, por sus conocimientos compartidos y por su amistad a lo largo de los años. Gracias.

## INDICE

	<b>Pag.</b>
<b>INDICE DE FIGURAS Y CUADROS</b>	<i>vii</i>
<b>RESUMEN</b>	<i>viii</i>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>LITERATURA REVISADA</b>	3
<i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend.:Fr.	5
Clasificación taxonómica de <i>F. oxysporum</i>	5
Características morfológicas	5
Ciclo biológico	6
Síntomas de la enfermedad	7
Manejo de la enfermedad	7
Condiciones para el desarrollo de la enfermedad	9
<i>Rhizoctonia solani</i> Kühn	9
Clasificación taxonómica de <i>R. solani</i>	9
Características morfológicas	10
Ciclo biológico	11
Síntomas de la enfermedad	11
Manejo de la enfermedad	11
Condiciones para el desarrollo de la enfermedad	12
<i>Fusarium solani</i> Mart	13
Clasificación taxonómica de <i>F. solani</i>	13
Características morfológicas	13
Síntomas de la enfermedad	13
Manejo de la enfermedad	14
Condiciones para el desarrollo de la enfermedad	14
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	16
<b>OBJETIVOS</b>	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	18
Colecta de material enfermo	18
Procesamiento de muestras	18
Reaislamiento de colonias	19
Identificación morfológica de colonias obtenidas	19
Identificación de <i>Fusarium spp.</i>	19
Identificación de <i>R. solani</i> .	19
Identificación molecular	19
Extracción de DNA de los aislados fúngicos	19
Electroforesis	20



Amplificación por PCR de regiones conservadas de eucariontes	20
Purificación de productos de PCR	20
Secuenciación y análisis	21
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	22
Hongos identificados y porcentaje de incidencia	22
Identificación morfológica	23
De <i>Fusarium</i> spp.	23
De <i>R. solani</i>	25
Identificación molecular	27
Síntomas asociados a <i>Fusarium</i> spp.	29
Síntomas asociados a <i>R. solani</i>	29
<b>CONCLUSIONES</b>	30
<b>LITERATURA CITADA</b>	31

## INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

	Pag.
<b>Figura 1.</b> Síntomas asociados a marchitez en plantas de sandía por <i>F. oxysporum</i> . a) Marchitez generalizada de plantas en campos de la Costa de Hermosillo, b) necrosis vascular característica de <i>F. oxysporum</i> en planta de sandia	7
<b>Figura 2.</b> Síntomas asociados a la marchitez de la sandía inducidos por <i>F. oxysporum</i> y/o <i>R. solani</i> . a) Muerte de plantas ocasionada por la infección de hongos fitopatógenos con origen en el suelo, b) y c) marchitez por <i>F. oxysporum</i> , d) canchros en el tallo por <i>R. solani</i> , e) necrosis vascular en el tallo por <i>F. oxysporum</i> .	22
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas de <i>Fusarium</i> spp.: A) crecimiento y desarrollo micelial en condiciones <i>in vitro</i> de <i>Fusarium solani</i> ; B) fiálides largas de <i>F. solani</i> ; C) crecimiento y desarrollo de <i>F. oxysporum</i> en medio PDA; D) macroconidias de <i>F. oxysporum</i>	24
<b>Figura 4.</b> Características morfológicas de <i>R. solani</i> : A) crecimiento micelial de <i>R. solani</i> ; B) micelio de <i>R. solani</i> mostrando 1) constricción, 2) septas y 3) ramificación aproximadamente en ángulo recto.	26
<b>Figura 5.</b> Identificación molecular. Carriles 1 al 6 corresponden a aislados fúngicos; carril C-, control negativo; M, marcador de peso molecular 1 Kb; carril C+, control positivo	27
<b>Cuadro 1.</b> Identificación molecular mediante ITS-PCR de hongos asociados a marchitez y pudriciones de raíces en plantas de sandía en la región agrícola de la Costa de Hermosillo, Sonora.	28

## RESUMEN

El cultivo de la sandía es uno de los principales en La Costa de Hermosillo, sin embargo, al igual que muchos otros se ve expuesto a una serie de enfermedades las cuales limitan y merman su desarrollo y rendimiento en campo. La presente investigación se realizó en base a una serie de objetivos los cuales son identificar morfológica y molecularmente a los hongos fitopatógenos involucrados en pudriciones de raíz y cuello en plantas de sandía, así como determinar su frecuencia y poder establecer cuál es el principal agente causal, además caracterizar los síntomas asociados a pudriciones de raíz y cuello de acuerdo al hongo que está involucrado en la sintomatología. En la identificación morfológica se emplearon características tales como forma y coloración de micelio, producción de cuerpos reproductivos, color de colonia en desarrollo, y características miceliales de cada hongo, además de las claves de identificación para cada uno de ellos. La identificación molecular se realizó mediante la técnica molecular ITS-PCR, usando los oligonucleótidos universales ITS-1 e ITS-4. De un total de 123 muestras analizadas se aisló de plantas enfermas de sandía, que presentaban pudriciones de raíz y cuello, a *Fusarium* spp. con un porcentaje de 91%, mismo que se divide como sigue en dos especies: *Fusarium oxysporum* con 59% de incidencia y *Fusarium solani* con 32 % de incidencia, se aisló también a *Rhizoctonia solani* con un 9% de incidencia, con lo cual se concluyó que son 3 los principales hongos fitopatógenos asociados a pudriciones de raíz y cuello en plantas de sandía en región agrícola de La Costa de Hermosillo, y de entre estos se determinó a *Fusarium oxysporum* como el principal agente involucrado en las pudriciones de raíz y cuello. Respecto a la identificación molecular se amplificaron bandas de aproximadamente de 700 pb, que después de purificarse y secuenciarse corroboraron los resultados previamente obtenidos con la identificación morfológica, con 99% a 100% de homología con secuencias previamente reportadas en el GenBank del NCBI, de secuencias de *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*.

## INTRODUCCIÓN

La planta de sandía (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum. & Nakai) es originaria de África, donde aún se le puede encontrar en estado silvestre. El cultivo tiene gran importancia debido a que en México se siembran alrededor de 34 636 ha, con una producción total nacional de 742,638 t, dentro de los estados de la república productores de sandía destaca Sonora, con una producción promedio de 101 955 t (SAGARPA, 2011) y una superficie total sembrada de 4 807 ha, de las cuales, en la región de La Costa de Hermosillo la superficie del cultivo se ha incrementado de manera considerable durante los últimos años pasando de 1 043 ha en 2005 a 3 542 en 2011 (SIAP, 2013).

La sandía como cualquier otro cultivo, se ve expuesta a una serie de enfermedades que constituyen una limitante para su producción en muchas partes del mundo, sobre todo cuando no se utilizan cultivares con resistencia. Entre estas enfermedades destacan por su importancia las ocasionadas por hongos fitopatógenos, los cuales presentan una gran variación morfológica, patogénica y de adaptación a diversas condiciones climáticas, por lo cual tienen la capacidad de atacar al cultivo en diferentes etapas de desarrollo. En este sentido, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici* son patógenos que comúnmente causan pérdidas severas en el rendimiento del cultivo (Baird and Carling, 1994; Zhou and Everts, 2003; Tziros *et al.*, 2007).

La planta de sandía es muy sensible al ataque de patógenos en sus primeros estados de desarrollo, presentando con frecuencia problemas de emergencia, podredumbre y muerte de plántulas, lo que en ocasiones se describe como “Damping off”, en este tipo de afecciones pueden verse implicados *Rhizoctonia solani*, especies del género *Pythium* y *Phytophthora* y *Fusarium* spp, principalmente (Armengol *et al.*, 2002).

Los síntomas se desarrollan comúnmente en las primeras semanas después de la germinación, se observan plántulas marchitas, con el talluelo colapsado a nivel del suelo,

área en donde se observan manchas acuosas, que posteriormente se tornan negras y eventualmente culminan con la muerte de la plántula (Cabrera, 2000).

*Fusarium* spp. se mantiene en el suelo por varios años y su diseminación puede ocurrir cuando se mueve suelo infectado de un sitio a otro mediante el agua de riego, viento o maquinaria agrícola o por residuos de cosecha (Cabrera, 2000). *Phytophthora* spp. es favorecido por períodos de lluvia largos o bien cuando existe la aplicación de riegos inadecuados por lo que es necesario evitar el encharcamiento y favorecer en su caso el drenaje (Armengol *et al.*, 2002). *R. solani* una vez que se establece en un campo, permanece por tiempo indefinido en él (Lucas *et al.*, 1985), este hongo es capaz de colonizar casi cualquier tipo de material vegetal muerto y/o vivo, y sobrevive por varios meses en forma de micelio en los restos de residuos vegetales infectados o hasta 5 años en forma de esclerocios.

Estos hongos se encuentran de forma natural en suelos agrícolas, ocasionando solos o en grupo, pudriciones de raíz y cuello en las plantas, lo que en ocasiones complica el diagnóstico en campo. Los síntomas que causan estos hongos son varios como marchitez y clorosis del follaje, debido a una pudrición de los tejidos del cuello de la planta, pudrición del sistema de raíces, las cuales se tornan de color café oscuro y finalmente muerte de la planta (Krupa y Dommergues, 1979).

Dado que las pudriciones de raíz y cuello son ocasionados por diversos hongos fitopatógenos con origen en el suelo, es importante determinar correctamente al patógeno y la incidencia de cada uno de estos hongos en huertos comerciales de sandía, con la finalidad de hacer un diagnóstico correcto del agente causal de la enfermedad, pues de esto depende en mucho la elección de un método de manejo apropiado que pueda evitar daños severos al cultivo. Por lo anterior el objetivo de la presente investigación pretende aislar e identificar morfológica y molecularmente los hongos fitopatógenos asociados con las pudriciones de raíz y cuello en plantas de sandía cultivadas en campos agrícolas de La Costa de Hermosillo, Sonora.

## LITERATURA REVISADA.

El cultivo de sandía ha cobrado gran importancia a nivel mundial debido al mercado que representa y a su rentabilidad; de manera que hoy podemos encontrar una larga lista de países productores, dentro de los cuales China (70 000 000 t) encabeza la lista, seguido de Turquía (4 044 181 t), Irán (3 800 000 t), Brasil (2 079 547 t), Egipto (1 874 710 t), Estados Unidos de América (1 760 630 t), Algeria (1 495 081 t), Rusia (1 453 315 t), Uzbekistan (1 350 000 t), Kazakhstan (1 154 900 t) y México en el lugar número 11 con 1 033 524 t (FAOSTAT, 2012).

Desde el punto de vista social, el cultivo de la sandía, es también importante, ya que es generador de fuente de trabajo, de tal forma que se requieren aproximadamente 50 jornales/hectárea durante el ciclo del cultivo (Acosta Rodríguez *et al.*, 2000). El cultivo se ve afectado a lo largo de su desarrollo por una serie de plagas y enfermedades fungosas que pueden afectar el rendimiento y/o calidad del producto, y por lo tanto, es necesario efectuar un manejo adecuado sobre las mismas.

Dentro de las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, destacan las que produce el género *Fusarium* el cual se encuentra naturalmente en el suelo y en ocasiones puede estar asociado a pudriciones de raíz y tallos de muchas plantas (Hernández *et al.*, 2007). *Fusarium* es considerado (Montiel-González *et al.*, 2005) como el género más complejo de los que atacan las raíces de las plantas cultivadas y uno de los más difíciles de clasificar (Figueroa-Rivera *et al.*, 2010).

La invasión de los tejidos vegetales vivos ocurre en forma muy similar a la colonización del tejido vegetal muerto; es decir se presenta todo un despliegue de enzimas degradadoras de tejidos y algunas veces también de fitotoxinas. Por ejemplo *R. solani* muestra una alta actividad celulolítica y es un colonizador frecuente de tejidos verdes de cultivos. Los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *R. solani*

tienen una distribución cosmopolita así como una amplia gama de plantas hospedantes. *F. oxysporum* tiene más de 120 géneros de plantas hospedantes, *F. solani* cuenta con más de 89 y *R. solani* más de 120 géneros (Rodríguez-Guzmán, 2006).

Con respecto a la relación que establecen los hongos fitopatógenos con las raíces de las plantas, una característica es que invaden y se alimentan sobre tejidos vegetales vivos, por lo cual es muy importante que puedan rebasar los mecanismos de defensa de las plantas. Estos hongos pueden ser parásitos especializados y parásitos no especializados, en el último caso su parasitismo está limitado a los tejidos más viejos de plantas, predispuestas a la infección por algunas condiciones adversas del ambiente, como pudiera ser una toxina o una deficiencia nutricional (caso de *Rhizoctonia*), por otra parte los hongos fitopatógenos de la raíz especializados pueden ser patógenos que invaden y provocan pudriciones en el sistema vascular, como el caso del género *Fusarium* (Garret, 1981).

El taxón forma especial (f.sp) corresponde a cepas cuyas características morfológicas y de cultivo son indistinguibles, pero muestran diferentes propiedades fisiológicas en su habilidad para parasitar un hospedante específico (Booth, 1975; Granada *et al.*, 2001).

De plantas de sandía establecidas en plantaciones comerciales, que presentaron marchitez, se han realizado trabajos en base a aislamientos para identificar las causas de dicha condición, presentándose así dos especies de *Fusarium*: *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* y *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* (Boughalleb y Mahjoub, 2005) ambas especies de *Fusarium* son transmitidas por semilla y pueden permanecer como conidias sobre la cubierta o bien como porciones de micelio sobre la superficie de las mismas. *F. solani* f. sp. *cucurbitae* raza 1, es reportado como patógeno de cucurbitáceas causando pudriciones de raíz, cuello y fruto, se presentan dos razas, basados en la especificidad del tejido al que atacan, así la raza 1 se ha presentado causando lesiones en tallo, cuello, raíces y frutos; mientras que la raza 2 solo se ha presentado en fruto (Alymanesh *et al.*,

2009) misma que ha sido reportada en áreas limitadas y pequeñas por lo que no tiene tanta importancia (Boughalleb *et al.*, 2005)

Las especies de fusarium son numerosas y son responsables de marchitamientos vasculares y de pudriciones de raíz y cuello de numerosas especies vegetales. Dentro de las características que permiten su identificación se encuentran las fiálides, clamidosporas, entre otras.

La presencia de fiálides (estructuras productoras de conidios) largas caracteriza a *Fusarium solani*, pues en aislamientos se ha observado que las microconidias se producen en fiálides largas ramificadas, dichas colonias fueron identificadas como *Fusarium solani*, mientras que las colonias que desarrollan fiálides cortas son identificadas como *Fusarium oxysporum*. Coincidiendo con lo mencionado por Smith (2007), la presencia de fiálides cortas separa *F. oxysporum* de *F. solani* y la producción de clamidosporas lo diferencian de *F. moniliforme*. En plántulas inoculadas con *Fusarium* spp. se ha observado que *F. solani* f. sp. *cucurbitae*, produce lesiones lineales corticales en el hipocotilo para después producir la muerte de la plántula, mientras que *F. oxysporum* f. sp. *niveum* produce necrosis vascular.

***Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr.**

Clasificación taxonómica de *Fusarium oxysporum* según Barnett y Hunter, 1998.

**Reino:** Eumicota o Fungi

**Phyllum:** Ascomicota

**Clase:** Ascomycetes

**Orden:** Moniliales

**Familia:** Moniliaceae

**Género:** *Fusarium*

**Especie:** *oxysporum* (Carece de fase sexual)

**Características morfológicas.** Los aislados de *Fusarium oxysporum* producen micelio entre rosado y blanco, a menudo con un matiz purpúreo. Los microconidios son abundantes, se generan en fiálides simples emergiendo lateralmente, presentan formas oval-elipsoide, erectas a curvadas. Los macroconidios son los conidios típicos de *Fusarium*, las cuales pueden ser escasos y se producen en conidióforos ramificados o



bien en la superficie de los esporodoquios; poseen una pared fina, de tres a cinco septas, y su morfología es fusiforme con ambos extremos puntiagudos. Las clamidosporas tienen pared engrosada que puede ser lisa o rugosa, son abundantes y se generan de forma terminal o intercalar. Normalmente son solitarias, pero en ocasiones se forman en pares o en cadenas (De la Garza, 1996).

Las características típicas (Arbeláez-Torres., 2000; Granada *et al.*, 2001; Agrios, 2005) de las esporas de las especies de *Fusarium* son las siguientes:

- a) **Microconidias:** Esporas generalmente unicelulares, sin septas, hialinas, elipsoidales a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados.
- b) **Macroconidias:** Esporas de paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas en forma de hoz, con varias células y de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada; las macroconidias tiene un tamaño de 27 a 46  $\mu\text{m}$  de largo por 3.0 a 4.5  $\mu\text{m}$  de ancho.
- c) **Clamidosporas:** Esporas formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y de las conidias, de paredes gruesas. Se forman simples o en pares, terminales o intercalares: poseen un tamaño de 5 a 15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Gracias a ellas el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en el suelo como saprófito de vida libre en ausencia de plantas hospedantes. Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo.

**Ciclo biológico.** Es un hongo cosmopolita, con múltiples formas especializadas, cuyo ciclo de vida incluye un crecimiento saprófito y un crecimiento parasitario con distintas fases cada uno de ellos (Beckmam, 1987).

La fase parasitaria se inicia con la penetración de los tejidos del huésped y entrada a su sistema vascular; a continuación se produce colonización del sistema vascular con expresión de los síntomas en la planta. La fase saprofítica de crecimiento se inicia cuando los tejidos infectados del huésped empiezan a manifestar síntomas de

senescencia y a morir. Cuando se acaban los carbohidratos de la planta afectada se producen las clamidosporas del hongo, mismas que le permiten a las formas patogénicas persistir en los suelos mucho tiempo después de que una cosecha susceptible haya sido eliminada del mismo, conforme los tejidos del huésped se desintegran, las clamidosporas son liberadas al suelo, individualmente o junto con hifas en los restos vegetales. Una vez en el suelo son capaces de permanecer durante varios años gracias a la pared fuertemente engrosada y a las reservas almacenadas (Burges, 1981).

**Síntomas de la enfermedad.** La marchitez por *Fusarium* en sandía puede ocurrir en diferentes etapas del crecimiento del cultivo, siendo los síntomas típicos de la enfermedad un decaimiento, hojas de apariencia grisácea, seguido por un amarillamiento del follaje que empieza por las hojas más viejas cercanas a la corona y que avanza hacia arriba, las cuales pierden turgencia y se marchitan, tal y como se aprecia en la figura 1a. No obstante el más consistente y confiable síntoma para el diagnóstico de la marchitez por *Fusarium* es la decoloración o necrosis vascular (figura 1b) (kurt *et al.*, 2008).



**Figura 1.** Síntomas asociados a marchitez en plantas de sandía por *F. oxysporum*. a) marchitez generalizada de plantas en campos de la costa de Hermosillo; b) necrosis vascular característica de *F. oxysporum* en planta de sandía.

**Manejo de la enfermedad.** Para el control de la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* se han implementado una serie de acciones, dentro de ellas las más comúnmente utilizada es el uso de Bromuro de metilo como fumigante o bien el

VAPAM (metam sodio) (Randhawa, 2009). Sin embargo, la utilización de este tipo de medida ha impactado negativamente los ecosistemas, provocando incluso una mayor presencia de plagas y enfermedades.

En estudios recientes se ha tratado de utilizar productos a base de microorganismos benéficos con la finalidad de buscar alternativas eficientes en el control de enfermedades con origen en el suelo, sin embargo, no siempre la aplicación de medidas más ecológicas ha funcionado. Por ejemplo Fernández-Herrera *et al.* (2006) evaluó una serie de productos biológicos comerciales (Bio, End, T22 y Healthy start®343) contra *F. oxysporum* en plantas de jitomate, obteniendo como resultado que ninguno de los productos protegió a las plantas adecuadamente contra la inoculación del hongo, muriendo todas ellas a los 35 días después de la inoculación, siendo atribuible a la alta concentración de inóculo o bien a que los organismos empleados en los productos no poseen cualidades antagonicas contra *Fusarium oxysporum*.

Por su parte Guillén-Cruz *et al.* (2006), realizó trabajos sobre plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) evaluando la acción biocontroladora de *Bacillus* spp., en suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici* y el efecto de estas en el rendimiento y desarrollo del cultivo, encontrando que la aplicación de bacterias incrementó la altura de las plantas en 20% y el rendimiento al final del cultivo en 270%, logrando reducir la incidencia de las enfermedades hasta en 80% y severidad de pudrición de raíz en 39%, respecto al testigo.

Herrera-Cid, 2005, realizó control de *F. oxysporum* y *F. solani*, en plantas de tomate en invernadero, orientado al suelo, empleando esterilización con bromuro de metilo (100 g.i.a./ m<sup>2</sup>) y cloropicrina, aplicados solos y en combinación. Como mecanismo de control biológico se empleó *Trichoderma harzianum* y *Paenibacillus lentimorbus*, sin embargo acorde a los resultados obtenidos, los biocontroladores no ejercen control tanto como el bromuro de metilo, pero compensan su falta de acción controladora con el aumento de la masa radicular de las plantas tratadas con bioantagonistas a *Fusarium* spp.

Para el caso de *Fusarium* spp. Armengol *et al.* (2002) indica que la aplicación de fungicidas contra la marchitez no es eficaz, por lo que tradicionalmente las medidas de control están restringidas al uso de material de plantación o semillas sanas y la plantación de cultivares resistentes. Otra medida de control eficaz y ampliamente difundida es el uso de planta injertada sobre patrones resistentes al patógeno. Además recomienda ampliamente la rotación de cultivos.

**Condiciones para el desarrollo de la enfermedad.** El daño de la enfermedad es más intenso de 21 a 33 °C, sin embargo a bajo de los 21 °C o por arriba de los 33 °C, el hongo se desarrolla más lentamente. Su crecimiento y reproducción son mayores con temperaturas del suelo alrededor de 27-29 °C y las plantas generalmente mueren de 2 a 4 semanas después de que aparecen los primeros síntomas de la enfermedad (Mendoza, 1999).

Suelos con contenido alto de nitrógeno y bajos en potasio favorecen el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, bajo contenido de nitrógeno combinado con alto contenido de potasio reducen la enfermedad. El hongo se introduce a áreas nuevas por semilla, plántulas que provienen de suelos infestados, agua de riego, lluvia, viento, implementos agrícolas u otros medios en los que se movilizan plantas o suelo infestado (Agrios, 2005).

*Rhizoctonia solani* Kühn.

Clasificación taxonómica de *Rhizoctonia solani* (Kirk *et al.*, 2001)

**Reino:** Eumycota o fungi

**Phylum:** Basidiomycota

**Clase:** Basidiomycetes

**Subclase:** agaricomycetidae

**Orden:** Ceratobasidiales

**Familia:** Ceratobasidiaceae

**Género:** *Tanathephorus*  
(*Rhizoctonia*)

*Rhizoctonia solani* es un hongo fitopatógeno con origen en el suelo altamente heterogéneo, que causa una serie de problemas en las plantas, tales como damping-off (secadera de plántula), canchales en el tallo, pudriciones de raíz y pudriciones de frutos; en más de 150 especies. Algunos miembros de este género viven como saprófitos (Gurkanli *et al.*, 2009)

Existe un criterio en base a características morfológicas para identificar a *R. solani* (Sneh *et al.*, 1991) el cual incluye la producción de esclerocios y la pigmentación de color café oscuro, ramificación en apariencia de ángulo de 90 grados, constricción de hifa cercana al punto de unión y la presencia de dos septas cercanas al sitio de ramificación.

**Características morfológicas.** El género *Rhizoctonia* es un grupo de hongos bastante amplio y complejo, pues su taxonomía es confusa debido a que su morfología es sencilla y los rasgos fisiológicos y patológicos que se emplean en su clasificación varían mucho, sin embargo, con base en la variación fenotípica entre aislamientos de *R. solani* y la reacción de anastomosis, se ha dividido al hongo en 14 grupos anastomóticos y varios subgrupos (González-Hernández, 2002)

El estado perfecto de *R. solani* se encuentra dentro de los géneros de los *Basidiomycetes* siguientes; *Tanathephorus*, *Ceratobasidium* y *Waitea*, siendo el primer género, al que pertenecen la mayoría de los grupos de anastomosis (Carling y Summer, 1992).

Este hongo presenta un desarrollo característico el cual muestra un micelio de crecimiento rápido, relativamente grueso, de color gris-claro a café-oscuro, ramificaciones de hifas aproximadamente en ángulo recto, en cultivos jóvenes hifas claras las cuales se tornan de color café oscuro al envejecer, con una constricción en la unión de las ramificaciones cerca de su sitio de origen y la formación de una gran cantidad de esclerocios, además el diámetro de las hifas varía entre 8-12 micrometros, células monilioides de tamaño y forma variable (Butler y Bracker, 1970; Parmeter y Whitney, 1970).

**Ciclo biológico.** El ciclo de vida de *Rhizoctonia solani* incluye periodos parasíticos y saprofiticos (Zachow *et al.*, 2011). *R. solani* permanece de una cosecha a otra en forma de esclerocios (estructuras de resistencia) y de micelio en residuos vegetales que se encuentran en el suelo. Los esclerocios germinan bajo condiciones de humedad y temperaturas favorables infectando los brotes y tallos de nuevas plantas (Calderón, 1978).

Inicialmente el hongo es atraído por residuos vegetales o estimulantes que produce la misma planta durante la germinación, al germinar los esclerocios producen hifas que luego de entrar en contacto con la planta, invaden los tejidos principalmente de raíz y tallos, los esclerocios que permanecen en suelo actúan como inóculo para los siguientes ciclos productivos (García *et al.*, 2002).

**Síntomas de la enfermedad.** Las lesiones en los tallo de plantas se presentan como zonas necróticas de color café –oscuro que interfieren en el transporte de nutrientes, disminuyendo emergencia (de plántulas) o bien el rendimiento del cultivo (Giovannini *et al.*, 2005).

Los canchros basales del tallo se pueden desarrollar en plantas en crecimiento o maduras, cuando las condiciones son favorables para el hongo y desfavorables para la planta. La enfermedad comienza con una lesión hinchada de tono castaño o pardo rojizo, que aparece en la línea del suelo o justo debajo de ella pudiendo extenderse hasta la mayor parte de la zona basal de la planta o incluso hasta el sistema de raíces (McCarter, 2001).

**Manejo de la enfermedad.** Santander *et al.* (2003) realizaron un estudio sobre el control de *R. solani* en plantas de tomate, bajo condiciones de invernadero, empleando bioantagonistas en suelo solarizado y suelo tratado con bromuro de metilo. Empleó *Paenibacillus lentimorbus*, *Trichoderma harzianum* y *T. polysporum*, solos o en combinación con solarización (temperatura máxima alcanzada de 37.6 °C) y bromuro de metilo (75.5 g/m<sup>2</sup>) en suelo naturalmente infestado. Se encontró que aplicados en plántulas los mejores tratamientos fueron aquellos donde se usó *P. lentimorbus* cepa

629, *T. harzianum* cepa 650, biocontroladores que independientemente de la solarización o empleo de bromuro de metilo estimularon el crecimiento de raíces y de la planta en general se concluyó que la aplicación de biocontroladores es factible dentro de un programa de control integrado de *R. solani* ya sea aplicados por si solos o bien en combinación con solarización y/o reemplazo de bromuro de metilo. Además se menciona que la solarización por si sola fue insuficiente para un control efectivo.

Herrera-Cid, (2005) menciona algunos tratamientos para el control de *R. solani*, de entre estos, el tratamiento tradicional está orientado a tratar el suelo de la siguiente manera: esterilización de pre-siembra o pre-transplante con bromuro de metilo (60-100 g.i.a./m<sup>2</sup>); Dazomet (30-60 g.i.a. /m<sup>2</sup>) o metam sodio (30-40 g.i.a. / m<sup>2</sup>) o bien localizado al suelo empleando mancozeb o thiram.

Por su parte González *et al.* (2009) mencionan que una vez que se reduzca el nivel de inóculo con la aplicación de metam sodio, es necesario mantenerlo bajo a lo largo del ciclo del cultivo, a través de un manejo adecuado del agua de riego.

Otra alternativa para el control de hongos con origen en suelo es la solarización, que consiste en cubrir el suelo húmedo con una película de plástico de polietileno transparente durante dos meses, cuando se tiene la mayor radiación solar o una temperatura ambiental de 40 °C, con esta técnica se eleva la temperatura del suelo hasta 50 °C en los primeros 30 cm de profundidad del suelo (Katan, 1981; Lacasa *et al.*, 1999) lo que resulta letal para algunos hongos, bacterias y nemátodos (Palomo *et al.*, 2003; Lira y Martínez, 2007).

### **Condiciones para el desarrollo de la enfermedad**

El hongo se disemina por lluvia y riego, así como por órganos de propagación infectados. La temperatura óptima para el desarrollo de la infección en la mayoría de los grupos de anastomosis oscila entre 15 y 18 °C, aunque algunos grupos muestran una actividad mayor a temperaturas mucho más altas, a más de 35 °C. La enfermedad es más

severa en suelos que son moderadamente húmedos, mientras que en suelos secos o inundados se tiende a inhibir el desarrollo fúngico (Agrios, 2005).

***Fusarium solani* Mart.**

Clasificación taxonómica de *F. solani* (Kirk *et al.*, 2001)

**Reino:** Fungi

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Ascomycetes

**Subclase:** Hypocreomycetidae

**Orden:** Hypocreales

**Familia:** Hypocreaceae

**Género:** *Gibberella*

**Especie:** *Nectria haematococa* (anamorfo *F. solani*)

**Características morfológicas.** Se caracteriza por presentar colonias de color crema a durazno, con leves tintes púrpura, de crecimiento rápido, de 9 cm a los ocho días de incubación. Las macroconidias se forman sobre conidióforos bien desarrollados, ramificados o no ramificados, monofiálides, cilíndricas a falcadas es decir que forma una curvatura semejante a la de la hoz, con células basales y apicales diferentes a las de la conidia. Las clamidosporas van desde redondas hasta ovaladas, de paredes lisas a levemente rugosas, generalmente en pares terminales o intercaladas (Sanabria *et al.*, 2002; Agrios, 2005).

Los microconidios pueden ser escasos o abundantes, son simples, de forma oval, 8-16 x 2-4.5  $\mu\text{m}$ , producidos en monofiálides alargadas cuyo tamaño es de 40-80 x 2.5-3  $\mu\text{m}$ .

Macroconidios robustos con pared gruesa y generalmente cilíndricos con la superficie ventral y dorsal paralelas y una anchura de 4.5-5  $\mu\text{m}$  y 35-55  $\mu\text{m}$  de largo. La región apical achatada y redondeada. Clamidosporas simples y en pares.

**Síntomas de la enfermedad.** Las plantas comienzan mostrando una estría necrótica longitudinal de color pardo en la zona del cuello, en la que, en condiciones de humedad, se puede llegar a observar el crecimiento de micelio blanquecino. La lesión crece hasta afectar todo el cuello, tomando una consistencia blanca y húmeda, provocando



marchitez de los brotes y muerte prematura de la planta. Paralelamente, sobre los frutos pueden aparecer pequeñas manchas de color pardo y consistencia blanda, que van creciendo, dando un aspecto apergaminado y provocando una podredumbre de la pulpa que puede llegar hasta la cavidad central, invadiendo las semillas (Armengol *et al.*, 2000).

**Manejo de la enfermedad.** El manejo de *Fusarium solani* puede estar muy relacionado con el control y manejo de *Fusarium* spp. sin embargo existen trabajos realizados que brindan una guía sobre cómo manejar dichas enfermedades con origen en el suelo, Cubillos-Hinojosa *et al.* (2011), realizó un trabajo en el cual se evaluó una cepa nativa denominada TCN-014 y una cepa comercial llamada TCC-005, de *Trichoderma harzianum* contra *F. solani*, derivado del problema denominado "secadera" que afecta al cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*), para esto se ensayaron dos tiempos de inoculación del antagonista: inoculando las plantas con el patógeno y cinco días después el antagonista e inoculando primero el antagonista y cinco días después el patógeno. Se reporta una acción efectiva de ambas cepas como biocontroladores de *F. solani*, sugiriendo que la cepa nativa tiene un mejor efecto de control, además que empleando cepas nativas se podrían desarrollar bio-productos para el control del patógeno.

Abeyasinghe (2007) empleó *Bacillus subtilis* CA32 y *T. harzianum* RU01 para el control de *F. solani* f.sp. *phaseoli*, el trabajo se realizó confrontando las cepas contra el hongo y se encontró que ambas (tanto bacteria como hongo) protegían eficazmente a las plántulas que fueron inoculadas con los organismos benéficos. Destaca que *T. harzianum* RU01 favoreció un incremento del sistema radicular, en comparación con las plantas inoculadas con la bacteria, esto probablemente a que la micorrizosfera provocó cambios favorecedores resultado de la colonización de *T. harzianum* RU01.

**Condiciones para el desarrollo de la enfermedad.** El suelo es el hábitat natural de *Fusarium solani* donde puede permanecer varios años como clamidosporas; el hongo se disemina fácilmente por agua de riego, lluvia, partes de la planta como las semillas,

animales o viento transportando micelio, microconidios, macroconidios y clamidosporas. Se han encontrado fracciones de micelio internamente en el tejido del esclerénquima en el pericarpio de semillas de cártamo, algodón y lino. Las clamidosporas son la forma de dormancia de este grupo de patógenos y forman el inóculo primario para iniciar infecciones en su hospedero (Puhalla, 1981; Nelson, 1981).

## JUSTIFICACIÓN

El cultivo de sandía en la región de La Costa de Hermosillo, es muy importante puesto que contempla una superficie considerable dentro de las cucurbitáceas que se cultivan, de allí que se derive la importancia de conocer las diversas enfermedades a las que está expuesto el cultivo ya que afectan el rendimiento del mismo, especialmente las enfermedades que causan pudriciones de raíz y cuello asociadas a hongos fitopatógenos del suelo, por lo que es de vital importancia determinar a los agentes involucrados para definir una serie de estrategias a seguir.

Los problemas por marchitamientos causados por *Fusarium* spp., *R. solani* e incluso *P. capsici* y/o *Pythium* sp., se encuentran dentro de los principales problemas fitopatológicos en el cultivo de sandía, de esta manera, se plantea la necesidad de realizar investigaciones con la finalidad de identificar a los agentes patogénicos que están involucrados en los problemas de pudriciones de raíz y cuello en esta cucurbitácea. Se ha demostrado en algunas investigaciones realizadas en el territorio nacional que el principal agente causal de estos problemas fitopatológicos es *F. oxysporum*, en la región de La Costa de Hermosillo se carece de información certera y objetiva que garantice que se trata realmente del hongo anteriormente mencionado. El aislamiento e identificación de hongos a partir de plantas de sandía enfermas es el primer paso para la identificación morfológica de los mismos. Así también se plantea la identificación molecular de los organismos aislados con la finalidad de tener una mayor exactitud de la identidad de los fitopatógenos identificados, y así poder brindar soluciones que ayuden a mejorar el rendimiento del cultivo de sandía y por lo tanto la mejora de las condiciones fitosanitarias en campo, elementos que se verán reflejados en una mayor desarrollo del cultivo, rendimientos y por ende mayores ingresos para el productor.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Aislar e identificar morfológica y molecularmente a los hongos fitopatógenos asociados a pudriciones de raíz y cuello en plantas de sandía (*Citrullus lanatus*) en la región de La Costa de Hermosillo, Sonora.

### Objetivos específicos

- Identificar morfológicamente los hongos fitopatógenos involucrados en las pudriciones de cuello y raíz de plantas de sandía.
- Identificar molecularmente mediante ITS-PCR los hongos fitopatógenos involucrados en las pudriciones de cuello y raíz de plantas de sandía.
- Determinar la frecuencia y el principal agente causal de las pudriciones de cuello y raíz en plantas de sandía.
- Caracterizar los síntomas asociados a las pudriciones de raíz y cuello de acuerdo al agente u hongo fitopatógeno involucrado en la sintomatología.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Colecta de material enfermo**

Se colectaron 60 plantas de sandía en 8 plantaciones comerciales de la región de La Costa de Hermosillo en el ciclo agrícola primavera-verano, mismas que presentaban marchitez y lesiones necróticas en el cuello y raíces así como decaimiento general, se obtuvo un total de 123 muestras.

Las plantas colectadas fueron llevadas al laboratorio de fitopatología del Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, conservando el cuello y las raíces afectadas para su posterior análisis en laboratorio.

### **Procesamiento de muestras**

Las muestras se procesaron de la siguiente manera: se procedió a lavar con agua corriente los cuellos y raíces de plantas afectadas con la finalidad de remover polvo adherido a las mismas (proveniente de la condición de campo), luego se secaron sobre papel por un tiempo aproximado de 10 minutos. Una vez secas se cortaron trozos de aproximadamente 1 cm, cuidando que en el corte se presentara área sana y área afectada, de manera que se garantice un correcto aislamiento del patógeno.

Las muestras de tejido vegetal se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% por aproximadamente 1 minuto, una vez transcurrido el tiempo, las muestras se transfirieron a un primer recipiente de agua esterilizada para su enjuague y retirar restos de cloro, esto se hizo por un período de 45 segundos agitando constantemente, transcurrido el tiempo, se colocaron las muestras en un segundo recipiente de agua esterilizada, por un período de 30 segundos, inmediatamente después se transfirieron las muestras a una gasa estéril para su secado. Una vez secas las muestras fueron incubadas-sembradas en cajas Petri con medio PDA (Papa-Dextrosa-Agar -38 gramos/litro- Difco®-) a 28 °C durante 4 a 7

días. Se adicionó ampicilina al medio (ya frío) para evitar el crecimiento y desarrollo de bacterias.

#### **Reaislamiento de colonias.**

De las colonias crecidas en medio PDA se procedió al reaislamiento de los crecimientos miceliales desarrollados durante el periodo de incubación, para lo cual cortes pequeños de micelio limpio de las cajas originales se transfirieron a cajas Petri nuevas con PDA.

#### **Identificación morfológica de colonias obtenidas**

Una vez que las colonias reaisladas desarrollaron micelio se procedió a identificarlos y agruparlos en base a la forma y crecimiento del micelio, coloración, producción de cuerpos fructíferos (microconidias, macroconidias, esclerocios, clamidosporas, etc.), para definir los géneros que se obtuvieron de las muestras procesadas provenientes de las plantas de sandía enfermas.

#### **Identificación de *Fusarium* spp.**

Para identificar a *F. oxysporum* y *F. solani* se empleó las claves de Booth (1970).

#### **Identificación de *Rhizoctonia solani***

Para identificar a *R. solani* se emplearon las claves de Butler y Bracker (1970), Sneh y Ogoshi (1991)

#### **Identificación molecular**

**Extracción de DNA de los aislados fúngicos.** Para la extracción de DNA de los aislados fúngicos se utilizó el método de CTAB en caliente (Zhang *et al.*, 1998). Se tomaron de 1 a 2 g de micelio de hongo crecido en medio PDA. El micelio se colocó en un tubo Eppendorf de 1.6 mL y se le agregaron 200  $\mu$ L de buffer CTAB al 3% (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, EDTA 20 mM, NaCl 1.4 M, 3% de CTAB y 0.2% de  $\beta$ -mercaptohetanol precalentado a 60 °C y añadido justo antes de su uso). El material se maceró con la ayuda de un homogenizador con pistilo. Posteriormente se le adicionaron

600  $\mu\text{L}$  del buffer CTAB y se incubó a 60 °C por 30 min y con agitación por inversión cada 5 min. Se le agregaron 600  $\mu\text{L}$  de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se agitó por inversión varias veces. Se centrifugó 10 min a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. Luego se precipitó con un volumen de isopropanol frío al 100%. Se centrifugó 8 min a 12 000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugo por 3 min a 12 000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar la pastilla para finalmente resuspender en un volumen de 30 a 50  $\mu\text{L}$  de agua destilada libre de DNAsas y ARNsas. El DNA se almacenó a -20 °C hasta su posterior utilización.

**Electroforesis.** Para observar la calidad de la extracción de DNA se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  de DNA y 8  $\mu\text{L}$  de colorante naranja G (0.025% de naranja G, 25 mM de EDTA pH 8 y 30% de glicerol). Se realizó una corrida de electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a una concentración de 0.2  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . El proceso se corrió a 80 V durante 20-25 min en una cámara de electroforesis con el buffer TAE 1X. Finalmente, el DNA se visualizó en un documentador de imágenes (GelDoc, Biorad).

**Amplificación por PCR de regiones conservadas de eucariontes.** En la fase inicial del estudio se utilizaron los primers generalistas para eucariontes ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990), que amplifican la región ITS1-5.8SITS2 del ADN ribosomal en un fragmento de aproximadamente 700 pb. La mezcla de PCR se realizó en tubos Eppendorf de 200  $\mu\text{L}$  en un volumen total de 25  $\mu\text{L}$  conteniendo: 1 X de buffer, 2 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM de nucleótidos trifosfatados (dNTP's), 0.2 mM de cada primer, 1 Unidad de Taq DNA polimerasa (Invitrogen Cat. 18038-018) y 1  $\mu\text{L}$  de DNA templado. Se utilizó un termociclador automático (C1000™, BIO-RAD), bajo las siguientes condiciones: un ciclo a 95 °C por 4 min, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 60 °C y 2 min a 72 °C y un ciclo final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR amplificados fueron purificados, cuantificados y secuenciados.

**Purificación de producto de PCR.** El producto de PCR fue purificado con el kit Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se

agregó un volumen igual de la solución de unión de membrana (“membrane binding”) al volumen de la reacción de PCR. Cada reacción se realizó cinco veces y se purificó junto el producto de las cinco repeticiones, para poder obtener una concentración apropiada de DNA.

**Secuenciación y análisis** La secuenciación se realizó utilizando el kit Dye Terminator Cycle Sequencing, Ready Reaction, en un secuenciador ABI PRISM 377 PERKINELMER (Cetus, Norwalk, CT) en el Laboratorio de Ingeniería Genética del CINVESTAV-IPN, Unidad Irapuato.

Las secuencias obtenidas fueron sometidas a comparación con secuencias reportadas en el Banco de Genes (Gen Bank), del Centro Internacional para la Información en Biotecnología (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) con el programa BLAST-N.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Hongos identificados y porcentaje de incidencia

De las plantas analizadas que presentaron marchitez total o parcial así como clorosis foliar, necrosis a nivel del cuello de la planta y/o marchitez vascular (Figura 2) se obtuvieron 123 muestras o aislamientos, las cuales fueron clasificadas de acuerdo al desarrollo que se obtuvo en cada una de ellas, para lo cual se tomó en cuenta las características morfológicas de los hongos identificados.



**Figura 2.** Síntomas asociados a la marchitez de la sandía inducidos por *F. oxysporum* y/o *R. solani*. a) Muerte de plantas ocasionada por la infección de hongos fitopatógenos con origen en el suelo, b) y c) marchitez por *F. oxysporum*, d) canchros en el tallo por *R. solani*, e) necrosis vascular en el tallo por *F. oxysporum*.

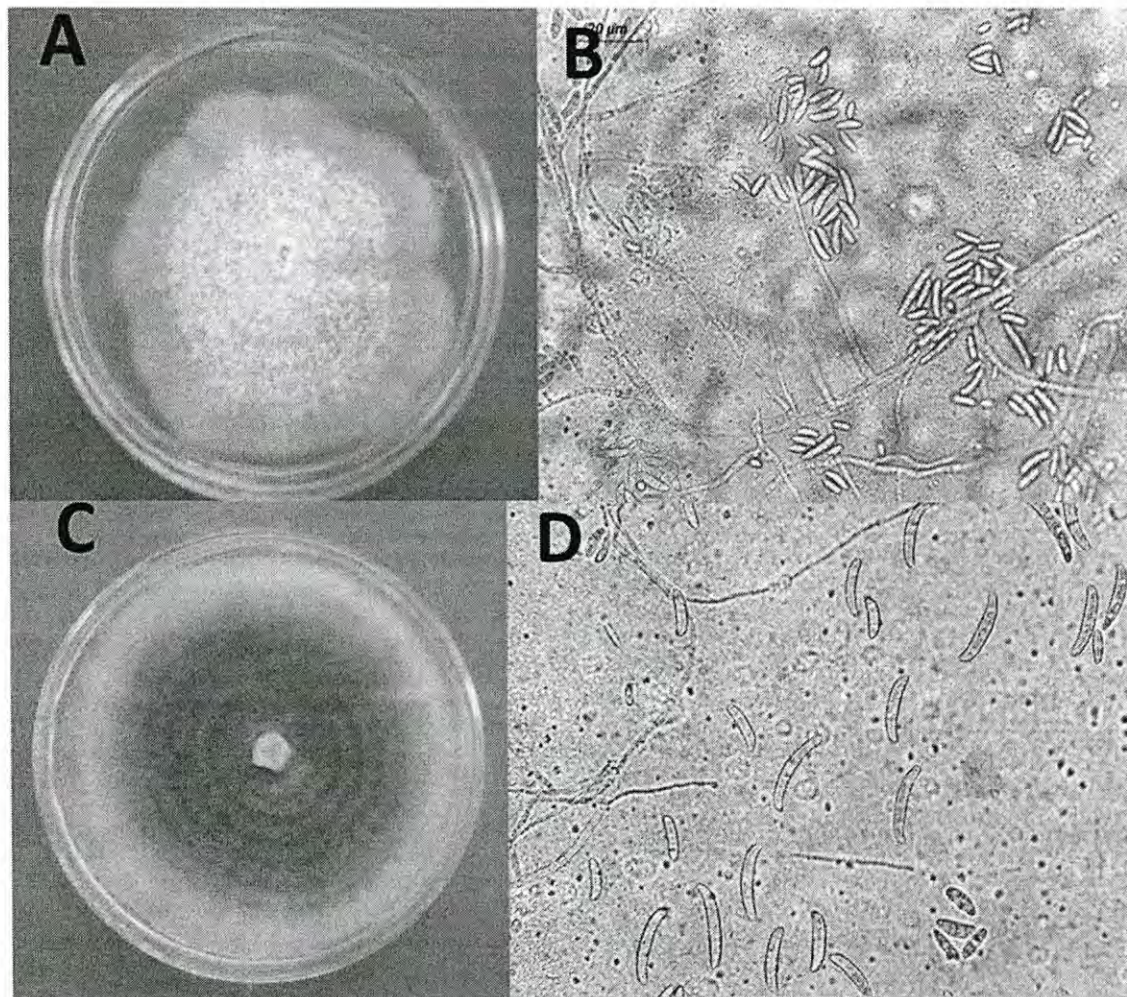
La frecuencia de aislamiento para cada uno de los patógenos identificados fue la siguiente: de un total de 123 aislamientos se logró identificar en 112 muestras a hongos del género *Fusarium*, los cuales representan el 91% de las muestras, mientras en 11 muestras se identificó como el principal organismo aislado a *R. solani*, es decir, en el 9% de las muestras analizadas.

De los hongos aislados pertenecientes al género *Fusarium*, 73 fueron identificados como *F. oxysporum*, mientras que el resto (39 aislados) fueron identificados como *F. solani*, es decir se aisló en un 59% a *F. oxysporum* y en un 32% a *F. solani*, respecto al total de muestras analizadas.

En base a estos resultados se puede concluir que el principal agente fitopatógeno que causó marchitez y/o pudriciones radicales en el cultivo de sandía en La Costa de Hermosillo es *F. oxysporum* con una frecuencia de más de la mitad (59%) de las muestras analizadas en este estudio, sin embargo, además de este hongo también está presente *F. solani*, con un alto grado de incidencia (32%) y en menor frecuencia se encuentra *R. solani*. En este sentido es importante mencionar que no se detectó presencia de marchitez o necrosis radical por efecto de oomicetos como pueden ser *Phytophthora* spp. y/o *Pythium* spp.

### **Identificación morfológica**

**De *Fusarium* spp.** Para la identificación morfológica de las colonias obtenidas a partir de las muestras analizadas, se emplearon características distintivas para cada género, así para *Fusarium* se empleó la coloración rosado-violeta, la producción de microconidias y macroconidios, y el tamaño de las fiálides (estructuras productoras de conidios), diferenciando así dos especies tentativamente, *Fusarium oxysporum* debido a la presencia de fiálides cortas, mientras que *Fusarium solani* presentó fiálides largas (Figura 3).



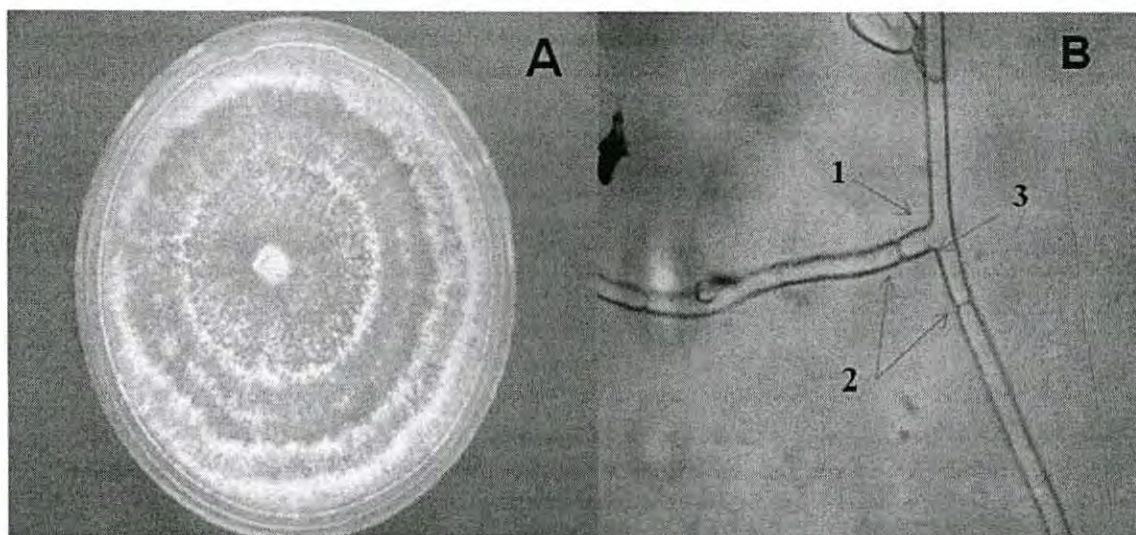
**Figura 3.** Características morfológicas de *Fusarium* spp.: A) crecimiento y desarrollo micelial en condiciones *in vitro* de *Fusarium solani*; B) fiálides largas de *F. solani*; C) crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum* en medio PDA; D) macroconidias de *F. oxysporum*.

Para el caso de identificación de *Fusarium* spp. el criterio morfológico empleado coincide con lo reportado por Quilambaqui (2005), quien realizó aislamientos de plantas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) con síntomas de la enfermedad llamada “declinamiento” causada por *Fusarium* spp., mismas que presentaban síntomas como amarillamiento, clorosis, marchitez y retardo en el crecimiento; este investigador reportó que la especies involucradas en estos síntomas del espárrago eran *F. oxysporum*, *F. moniliforme* y *F. solani*, los cuales presentaron las siguientes características morfológicas: colonias de *F. oxysporum* desarrollaron micelio de color violeta a púrpura, con macroconidios, clamidosporas esféricas y microconidios producidos en fiálides

cortas y ramificadas. Mientras que las colonias de *F. moniliforme* desarrollaron un micelio aéreo blanco, que a menudo se tornó púrpura; presentaron microconidios en cadenas en fiálides simples y ausencia de clamidosporas, y las colonias de *F. solani* desarrollaron micelio blanco que en ocasiones tomó tonalidades amarillas, presentó macroconidios en fiálides alargadas y clamidosporas simples y en pares.

Acorde con Kurt *et al.* (2008) la marchitez por *Fusarium* en sandía puede ocurrir en diferentes etapas del crecimiento del cultivo, siendo los síntomas típicos de la enfermedad un decaimiento, hojas de apariencia grisácea, seguido por un amarillamiento del follaje que empieza por las hojas más viejas, cercanas a la corona, y que avanza hacia arriba, las cuales pierden turgencia y se marchitan. No obstante el más consistente y confiable síntoma para el diagnóstico de la marchitez por *Fusarium oxysporum* es la decoloración o necrosis vascular. Así mismo, Rodríguez *et al.* (2011) mencionan que en plantas de tomate maduras infectadas por *Fusarium oxysporum* se puede observar una marchitez generalizada del follaje, con hojas amarillas principalmente en la base de la planta, pudrición de raíces, flacidez de hojas con recuperación de la turgencia en la noche y necrosis de los haces vasculares en corte transversal del tallo.

**De *Rhizoctonia solani*.** Para el caso de la identificación de *R. solani* se utilizó la coloración de colonia que fue de grisáceo-café conforme se va desarrollando, ausencia de cuerpos fructíferos, además de la ramificación de sus hifas aproximadamente en ángulo de 90 grados, constricción en la parte basal de la ramificación en ángulo recto, y septas cerca del sitio de ramificación. Así también se observó la formación de esclerocios pequeños en colonias fúngicas de 20 días después de sembrados (Figura 4).



**Figura 4.** Características morfológicas de *R. solani*: A) crecimiento micelial de *R. solani*; B) micelio de *R. solani* mostrando 1) constricción, 2) septas y 3) ramificación aproximadamente en ángulo recto.

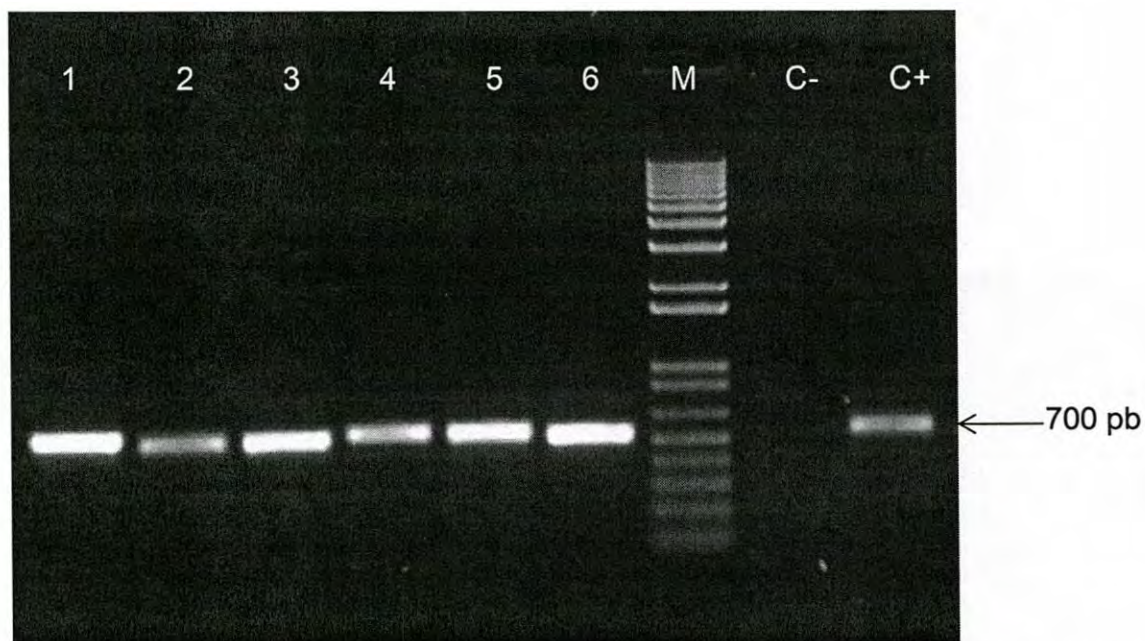
La identificación morfológica de *R. solani* es coincidente con el trabajo realizado por Gutiérrez *et al.* (2006) en el cual a partir de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con síntomas de pudrición radicular se realizaron aislamientos con el objetivo de caracterizar a *R. solani*. Se obtuvieron 3 aislamientos que presentaban diferencias morfológicas entre ellos, sin embargo para la identificación del género se empleó características típicas que incluyen: ramificación cercana al septo distal de células vegetativamente jóvenes, constricción de la hifa y formación del septo a corta distancia cercano al punto de origen de la ramificación hifal y color del micelio con variaciones desde pardo-claro hasta pardo-oscuro. Esta descripción coincide con la reportada por Ogoshi (1987) y Sneh *et al.* (1998).

Los síntomas de marchitez y necrosis a nivel de cuello y raíces, observados en plantas de sandía coinciden con los síntomas reportados para este patógeno en varios de sus hospedantes (Parmeter y Whitney, 1970). Acorde con Sneh *et al.* (1998) *R. solani* puede dividirse en trece grupos de anastomosis siendo el AG7 el grupo anastomósico que afecta a plantas de sandía induciéndole ahogamiento, necrosis radical y marchitez. Así mismo Mirmajlessi (2012) reportó que de 23 aislamientos obtenidos de sandía, pepino, melón y calabacita todos pertenecieron al grupo anastomósico AG4 y que la severidad

inducida por cada uno de estos en sus propios hospedantes fue muy variable (de 8.3% a 91.6%) indicando una alta variabilidad en las poblaciones de este grupo anastomótico.

### Identificación molecular

Para la caracterización molecular el DNA se extrajo a partir de 2 aislamientos representativos de cada una de las especies identificadas morfológicamente, es decir, de *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*. Los resultados de la técnica de PCR-ITS mostró la amplificación de fragmentos o bandas de aproximadamente de 700 pb (Figura 5), mostrando que ambas direcciones secuenciadas de cada uno de los aislamientos analizados tienen de 99 a 100% de homología con secuencias previamente reportadas en el GenBank del NCBI. En el Cuadro 1 se presenta un resumen de los resultados obtenidos a partir de las secuencias de los hongos identificados morfológicamente, así como la cepa de referencias con la cual estas secuencias tienen un alto grado de similitud.



**Figura 5.** Identificación molecular. Carriles 1 al 6, aislados fúngicos; carril C-, control negativo; M, marcador de peso molecular 1 Kb; carril C+, control positivo.

**Cuadro 1.** Identificación molecular mediante ITS-PCR de hongos asociados a marchitez y pudriciones de raíces en plantas de sandía en la región agrícola de la Costa de Hermosillo, Sonora.

Aislamiento identificado	Origen <sup>a</sup> geográfico	Tamaño de fragmento obtenido	Caracterización GenBank del NCBI		
			alineamiento	Homología	Número de acceso
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hillo, Son.	515 pb	<i>F. oxysporum</i>	100%	KF181241
<i>Fusarium oxysporum</i>	Guay Son.	516 pb	<i>F. oxysporum</i>	100%	KF181241
<i>Fusarium solani</i>	Hillo, Son.	537 pb	<i>F. solani</i>	100%	KC478531
<i>Fusarium solani</i>	Hillo, Son.	539 pb	<i>F. solani</i>	100%	KC478533
<i>Rhizoctonia solani</i>	Hillo, Son.	647 pb	<i>R. solani</i>	99%	JF701743
<i>Rhizoctonia solani</i>	Hillo, Son.	647 pb	<i>R. solani</i>	99%	JF701743

a = Hillo, Son: Costa de Hermosillo, Sonora; Guay, Son: Guaymas, Son.

Pb = pares de bases.

Debido a la alta homología obtenida (99-100%) de los aislamientos secuenciados, se puede indicar que las especies identificadas previamente en base a las características morfológicas si corresponden a *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani*, y que éstos por ende son los principales agentes causales de enfermedades radicales en la región de La Costa de Hermosillo, Sonora.

En concordancia con nuestros resultados, Zhang *et al.* (2005) realizaron un estudio similar para identificación molecular de *F. oxysporum* f.sp. *niveum* y *Mycosphaerella melonis* en tejidos de planta infectados y suelo, desarrollando dos técnicas de PCR para la detección rápida y segura de los patógenos. Empleó dos pares de primers específicos para las especies. Para la detección en tejidos enfermos de la planta mediante la técnica de PCR se combinó los dos pares de primers específicos, mismos que detectaron a *F. oxysporum* f.sp. *niveum* y a *M. melonis* en tejido enfermo. Los resultados se observaron en la electroforesis en gel de agarosa, además se menciona que el método de PCR fue exitoso en amplificar productos específicos empleando muestras de ADN extraídas de los tejidos de plantas enfermas, acorde a estos resultados la especificidad de la técnica PCR es adecuada para la detección de patógenos ya que los primers permiten diferenciar a un patógeno de otro.

### **Síntomas asociados a *Fusarium* spp.**

En cuanto a sintomatología en el caso de *Fusarium* spp. los síntomas típicos de la enfermedad son un decaimiento general de la planta, hojas de apariencia grisácea, seguido por un amarillamiento del follaje que empieza por las hojas más viejas cercanas a la corona y que avanza hacia arriba, las cuales pierden turgencia y se marchitan. El más consistente y confiable síntoma para el diagnóstico de la marchitez por *F. oxysporum* es la decoloración o necrosis vascular, ya que *F. solani* no produce este síntoma.

### **Síntomas asociados a *R. solani***

Para el caso de *R. solani*, las plantas de sandía afectadas generalmente mostraron una reducción del crecimiento, amarillamiento del follaje y presencia de canchales pequeños de colores café-oscuro, secos, agrietados y de aspecto leñoso en la raíz y cuello de las plantas.

Los resultados obtenidos del presente trabajo podrían ser empleados para establecer medidas de control apropiadas o bien estrategias específicas para el manejo de la enfermedad en la zona agrícola de La Costa de Hermosillo, Sonora, México. Así mismo es necesario desarrollar más trabajo de investigación en esta zona agrícola, debido a que existen muchas referencias bibliográficas al respecto pero de otros países, mientras que son muy pocas las que son generadas en México, de manera que permitan definir acciones mediante un enfoque de conservación de la biología del suelo, y sobre todo una visión de manejo integrado de las enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos del suelo. Trabajos futuros podrían dirigirse hacia una línea de investigación en la cual se pretenda identificar a los patógenos involucrados a un nivel más específico, por ejemplo a nivel de forma especial o raza, pues actualmente se carece de información regional.



## CONCLUSIONES

- Se identificó morfológicamente a *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani* como agentes causales de pudriciones de raíz y cuello así como marchitamiento en plantas de sandía en la zona agrícola de La Costa de Hermosillo, Sonora.
- La técnica de PCR-ITS confirmó los resultados de la identificación morfológica, indicando que efectivamente los patógenos *F. oxysporum*, *F. solani* y *R. solani* son los principales agentes que causan pudriciones de raíz y cuello en plantas de sandía.
- Se identificó como el principal agente patógeno de la raíz en la zona a *Fusarium* spp., género que presentó un 91% de incidencia de acuerdo a las muestras analizadas. Dentro del mismo se determinó la frecuencia para *F. oxysporum* de 59% y para *F. solani* de 32%. Mientras que *R. solani* se identificó en 9% de las muestras evaluadas.

## LITERATURA CITADA

- Abeysinghe, S., 2007. Biological control of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli* the causal agent of root rot of bean using *Bacillus subtilis* CA32 and *Trichoderma harzianum* RU01. Ruhuna Journal of science (2):82-88.
- Acosta Rodríguez G.F., Galván Lamas R., Lujan Favela M., Quiñones Pando F. J., Chávez Sánchez N. 2000. INIFAP chihuahua. Paquete tecnológico de sandía.
- Agrios, G. 2005. Fitopatología. 2 ed. Editorial Limusa, México D.F.
- Alymanesh M.R., Falahatirastegar M, Jafarpour B., Mahdikhanimoghadam E. 2009. Genetic diversity in the fungus *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* Race 1 . the causal agent of root and crown rot of cucurbits in Iran , using molecular markers. Pakistan Journal of biological sciences 12(11): 836-843.
- Arbeláez- Torres, E. 2000. Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agronomía colombiana. 17:11-22.
- Armengol, J., García-Jiménez, J., Vincent, A. 2002. Principales enfermedades fúngicas de la sandía, prevención y control. Vida Rural, No.160. pp. 41-43.
- Armengol, J., José, C.M., Moya, M.J., Sales, R., Vincent, A., García-Jiménez, J. 2000. *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain. EPPO bulletin 30: 179-183.
- Baird, R. E., and Carling, D. E. 1994. First report of *Rhizoctonia solani* AG-7 in Indiana. Plant Disease 79: 321.
- Barnett, H. L., y Hunter, B. B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. APS PRESS, St. Paul, Minnesota. United States of America. pp. 218
- Beckman, C.H. 1987. The Nature of Wilt Diseases of Plants. APS Press St. Paul, Minnesota.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Editorial Kew Surrey; Commonwealth Micological Institute., England. pp. 130-134.
- Booth, C. 1975. The present status of *Fusarium* taxonomy. Annual review of phytopathology. 13: 83- 93.

- Boughalleb N., El Mahjoub M., 2005. In vitro determination of *Fusarium* spp. Infection on Watermelon seeds and their localization. *Plant pathology journal* 5(2): 178-182.
- Burges, L.W. 1981. General ecology of the fusaria. En: *Fusarium: diseases, biology and taxonomy*. P.E. Nelson, T.A. Toussoun y R.J. Cook, eds. pags. 225-235. Pennsylvania State University Press.
- Butler, E. E., y Bracker, C. E. 1970. Morphology and cytology of *Rhizoctonia solani*. In: *Rhizoctonia solani; biology and pathology*. Parmeter, J. R. (Ed) University of California Press. United States of America. pp. 32-39.
- Cabrera, I. 2000. Conjunto tecnológico para la producción de sandía. EEA-UPR. pp 26-33.
- Calderón, A, 1978. Enfermedades de la papa y su control. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina, 143.
- Carling, D.E., y Summer, D. R. 1992. *Rhizoctonia*. In: *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. (Eds). Singleton, L. L., Mihail, J. D., y Rush, C. M. APS PRESS. St. Paul, Minnesota. U.S.A. pp. 157-165.
- Cubillos-Hinojosa, J.G., Páez Redondo. A., Mejía Doria, L., 2011. Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai, contra *F. solani* (Mart.) sacc. Asociado al complejo "secadera" en maracuyá, bajo condiciones de invernadero. *Revista de la Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 64(1): 5821-5830.
- De la Garza, G. J. L. 1996. *Fitopatología general*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León, México. pp. 308-311.
- FAOSTAT.2012. Producción de productos alimentarios-agrícolas. <https://faostat.fao.org>.
- Fernández-Herrera, E. 2006. Patogenicidad y manejo de la pudrición de raíz y cuello en *Lycopersicon esculentum* Mill. en invernadero. Tesis de maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo.
- Fernández-Herrera, E., Acosta-Ramos, M., Ponce-González, F., Manuel-Pinto, V. 2006. Manejo Biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* Schelented.:Fr. y *Rhizoctonia Solani* kuhn en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Revista mexicana de fitopatología* 25: 35-42.
- Figuroa-Rivera M.G., Guerrero-Aguilar B. Z., González-Chavira M. M., Pons-Hernández J.L., Jiménez-Bremont J. F., Ramírez-Pimentel J.G., Andrio-Enríquez E. y Mendoza-Elos M., 2010. Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Fitopatología* 28: 124-134

- García, R., García, A. and Garnica, C., 2002. Distribución, Incidencia y Alternativas de Control de *Rhizoctonia solani* en el Cultivo de Papa en el Estado Mérida, Venezuela. *Revista Latinoamericana de la Papa* 13: 24-40.
- Garret, S.D. 1981. *Soil Fungi and Soil Fertility. An Introduction to Soil Mycology*. 2n edition. Pergamon Press. Oxford. Pp.150.
- Giovannini C., Andrade N., Valenzuela E., Castro I., Contreras A., 2005. Caracterización morfológica y patogénica de *Rhizoctonia Solani* Kuhn a partir de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L) provenientes de diferentes predios de la X región de Chile. *IDESIA (Chile)* 23(1): 13-18,
- González-Hernández, D. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20:200-205.
- González, C., M. M., E. Villordo P., J. L. Pons H., F. Delgadillo S., R. Paredes M., H. Godoy H., J. L. Anaya L., F. P. Gámez V., T. Medina C., R. Rodríguez G., E. Ruiz C., A. Ruiz L., R. Cárdenas B., J. R. Cárdenas A., I. Torres P., E. Rendón P., J. Martínez S., F. Mojarro D., O. M. Villaseñor E., B. Z. Guerrero A. 2009. Guía para el manejo de la marchitez del Chile en Guanajuato. Consejo Estatal de Productores de Chile Guanajuato–INIFAP. 34 p
- Granada, E.G., Orozco de Amézquita M., Bautista G.R, Valencia H. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 6 No. 1. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.
- Guillén, C. R., Hernández, C. F. D., Gallegos, M. G., Rodríguez, H. R., Aguilar, G. C. N., Padrón, C. E., y Reyes, V. M. H. 2006. *Bacillus* spp. como biocontrol en un suelo infestado con *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de Chile. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24:105-114.
- Gurkanli C.T., Ozkoc I., and Gunduz I., 2009. Molecular and Conventional Identification and Pathogenicity of *Rhizoctonia solani* Isolates from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) in Samsun, Turkey. *Journal of Phytopathology* 157:686–696.
- Gutiérrez B., González M. S., Salih A.L. 2006. Caracterización de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn que inducen pudriciones radicales en cultivares de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista mexicana de micología* 18 (1): 30-36.
- Hernández, D.S., Reyes, L.A., García, O.G.J., Mayek, P.N., Reyes, M.C.A. 2007. Incidencia de hongos potencialmente toxígenos de maíz (*Zea mays* L.) Almacenado y Cultivado en el Norte de Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:127-133.

- Herrera-Cid, R.A. 2005. Control biológico de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Fusarium solani* en tomates bajo invernaderos. Facultad de ciencias agronómicas. Facultad de Chile. 10 p.
- Katan, J. 1981. Solar heating (solarization) of soil for control of soilborne pest. Annual Review of Phytopathology 19:211-236.
- Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J. C., y Stalpers, J. A. 2001. Dictionary of the fungi. 9th Edition. CABI-Publishing. New York, Estados Unidos.
- Krupa, S. V., y Dommergues, R. 1979. Ecology of root pathogens. Elsevier Scientific Publishing Company. The Netherlands. pp. 21-24, 48-49.
- Kurt, S., S. Dervis, E. M. Soylu, F. M. Tok, H. Yetisir, y S. Soylu. 2008. Pathogenic races and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in commercial watermelon fields in southern Turkey. Phytoparasitica 36: 107-116.
- Lacasa, A., Guirao, P., Gurrero, M. M., Ros, C., López, P. J. A., Bello, A. Bielza, P. 1999. Alternatives to methyl bromide for sweet pepper cultivation in plastic greenhouse in south east. 3rd International Workshop Alternatives to Methyl bromide for the Southern European Countries. 7-10 December, Crete (Greece), pp.133-135
- Lira-Saldivar, R.H y Martínez-Hernández, B.L. 2007. Biofertilizantes, bacterias promotoras del crecimiento y biofumigación. In: Agricultura sustentable y biofertilizantes. (eds) Lira-Saldivar, R. H. y Medina-Torres, J.G. Centro de Investigación de Química aplicada, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. pp 175-202.
- Lucas, G.B., Campbell, C.L., y Lucas, L.T. 1985. Introduction to plant diseases, identification and management. North Carolina State University. The AVI publishing company inc. United States of America. pp. 154-157.
- McCarter, S. M. 2001. Enfermedades causadas por *Rhizoctonia* spp.. Podredumbre del fruto y podredumbre de las raíces. In: Compendio de plagas y enfermedades del tomate. Jones J.B., J.P. Jones, R.E. Stall y T.A. Zitter (Eds). APS Press. St. Paul Minnesota, United States of America. Edición en Español. Ediciones Mundi-Prensa. pp. 21-22.
- Mendoza, Z.C. 1999. Enfermedades fungosas de hortalizas y fresa. In: Hortalizas; plagas y enfermedades. Anaya, R.S. y Romero, N.J. (Eds). Editorial Trillas, México. pp. 32-34.
- Mirmajlessi, S., M., N. Safaie, H.A. Mostafavi, S.M. Mansouripour, y Mahmoudy S. B. 2012. Genetic diversity among crown and root isolates of *Rhizoctonia solani* isolated from cucurbits using PCR-based techniques. African Journal of Agricultural Research 7: 583-590.

- Montiel-González, L., González-Flores, F., Sánchez-García, B.M., Guzmán-Rivera, S., Gámez-Vázquez, F.P., Acosta-Gallegos, J.A., Rodríguez-Guerra, R., Simpson W.J., Cabral-Enciso, M. y Mendoza-Elos, M. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudriciones, en cinco estados del centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23: 1-10.
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Cook, R. J. 1981. *Fusarium : disease, biology, and taxonomy*. The Pennsylvania State University Press. USA. 457 p.
- Ogoshi, A. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. 1987. *Annual Review of Phytopathology*. 25: 125-143
- Palomo, R. M., Lujan, F. M., Ávila, Q. G. y Berzoza, M. M. 2003. Enfermedades radiculares del cultivo del chile (*Capsicum annuum*) y medidas de control. Secretaría de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación-Instituto nacional de investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias-centro de investigación regional norte-centro campo experimental valle de Juárez, chihuahua. Publicación especial núm. 11. 21p.
- Parmeter, J. R., y Whitney, H. S. 1970. Taxonomy and nomenclature of the imperfect state. In: *Rhizoctonia solani; biology and pathology*. Parmeter, J. R. (Ed). University of California Press. United States of America. pp. 7-13.
- Puhalla, J.E., Bell, A. A., 1981. Genetics and biochemistry of wilt pathogens. In: Mace .M.E., Bell, A. A., and Beckman, C.H., 1981. *Fungal wilt disease of plants*. Academic Press. USA. 146-192 p.
- Quilambaqui M. A. 2005. Aislamiento e identificación de especies de *Fusarium* spp asociadas al declinamiento del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco municipios de Guanajuato, México. *Revista tecnológica ESPOL* 18(1): 135-140.
- Randhawa, P. 2009. Estrategias para el control de enfermedades en Tomate. San Quintin, B.C., México: California Seed & Plant Lab, Inc.
- Rodríguez, A. G., García, L. J. y Fernández, P.S.P. 2011. Enfermedades del jitomate (*Solanum tuberosum*) cultivado en invernadero en la zona centro de Michoacán. *Revista Mexicana de Fitopatología* 29:50-60.
- Rodríguez-Guzmán, Ma. Del Pilar. 2006. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo en México. Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. Montecillos Chapingo, Edo. de México, México. 24 p.

- Sanabria, N., Guadarrama, A., Romero H., 2002. Caracterización de especies de *Fusarium* mediante patrones electroforéticos de proteínas. Revista de la Facultad de Agronomía de La Universidad del Zulia 28:161-173
- Santander. C., Montealegre, J.R., Herrera, R. 2003. Control biológico de *R. solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y bromuro de metilo. Ciencia e investigación agraria 2:107-112.
- SAGARPA, 2011. Cierre de la producción agrícola por cultivo. <https://www.sagarpa.gob.mx..>
- SIAP, 2013. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Producción agrícola por cultivo. <https://www.siap.gob.mx>.
- Smith, S.N. 2007. An overview of ecological and habitat aspect in the genus *Fusarium* with special emphasis on the soil-borne pathogenic forms. Plant Pathology Bulletin 16:97-120.
- Sneh, B.B. y A. Ogoshi. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. APS PRESS. St. Paul, Minnesota. U.S.A. pp. 133.
- Sneh, B., L. Burpee, and A. Ogoshi. 1998. Identification of *Rhizoctonia species*. The APS, St. Paul, Minesota.
- Tziros, G. T., Lagopodi A.L., Tzavella-Klonari K. 2007. Reduction of Fusarium wilt in watermelon by *Pseudomonas chlororapis* PCL1391 and *P. fluorescens* WCS365. Phytopathology Mediterranean, 46: 320-323.
- White, T. J., T. Bruns, S. Lee, and J. W. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Pp. 315-322 .
- Zachow, C., Grosch, R., and Berg, G., 2011. Impact of biotic and a-biotic parameters on structure and function of microbial communities living on sclerotia of the soil-borne pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Applied Soil Ecology, 48 (2): 193–200.
- Zhang, Y., Uyemoto, K. J., Kirkpatrick, C. B. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. J. Virol. Methods, 71: 45-50.
- Zhang Z., Zhang J., Wang Y., Zheng X. 2005. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil. FEMS Microbiology Letters, 249:39-47.

Zhou, X. G., and Everts, K. L. 2003. Races and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in commercial watermelon fields in Maryland and Delaware. Plant Dis. 87:692-698.