

Diagnóstico morfológico, molecular y de patogenicidad de hongos de raíz y cuello en céspedes de México

Morphological, molecular and pathogenic diagnostic of fungi in lawn's root and neck in Mexico

García-Munguía CA¹, M Acosta-Ramos², O Vázquez-Martínez³, M Pérez-Sato⁵, A García-Munguía⁴, O García-Munguía⁶, AM García-Munguía³

Resumen. Las enfermedades que causan pudrición de raíz y cuello en los céspedes de campos de golf constituyen un factor limitante para su desarrollo en muchas partes del mundo, principalmente cuando no se realizan medidas de manejo adecuadas. Se trabajó en el "Club de Golf México", México, Distrito Federal. Los aislamientos se realizaron a partir de plantas que presentaban síntomas de amarillamiento y pudrición de raíz y cuello. Los hongos patógenos aislados en cultivos axénicos e identificados fueron *Giberella avenacea*, *Fusarium oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* y *Pythium ultimum*. La caracterización molecular mostró una comparación entre las secuencias obtenidas del ADN lo que se determinó morfológicamente como *F. avenaceum* y se corroboró molecularmente como *G. avenacea* con una similitud de 96%. La comparación entre las secuencias obtenidas del ADN del hongo que se determinaron morfológicamente como *F. oxysporum* se corroboró molecularmente como *F. oxysporum* con una similitud de 97%. Por último, la comparación entre las secuencias obtenidas del ADN del hongo que se determinaron morfológicamente como *F. oxysporum* se corroboró molecularmente como *F. oxysporum* f. sp. *cubense* con una similitud de 97%. Se comprobaron sus funciones como los agentes causales de los síntomas en campo ya que su inoculación en césped sembrado en macetas (mantenidas en invernadero) determinó que el mismo tuviera la misma sintomatología. Los reaislamientos fueron identificados como las especies inoculadas, y de esta forma se cumplieron los postulados de Koch.

Palabras clave: *Fusarium* spp.; *Poa annua*; *Agrostis* spp.; Cultivo axénico; Pudrición; Marchitamiento.

Abstract. The illnesses that cause root and neck rot in golf courses constitute a limiting factor for grass development worldwide. This is mainly true when management guidelines are not conducted. Our research was conducted in the Golf Club "Mexico", located in Mexico, D.F. Isolates were taken from plants that presented yellowing symptoms and root and neck rot. The identified pathogenic fungi, isolated from axenic media, were *Giberella avenacea*, *Fusarium oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* and *Pythium ultimum*. The molecular characterization showed a comparison of the DNA-obtained sequences which was morphologically determined as *F. avenaceum* and was molecularly corroborated as *G. avenacea* with a similarity of 96%. Comparison between the obtained DNA sequences which were morphologically determined as *F. oxysporum*, were molecularly corroborated as *F. oxysporum* with a similarity of 97%. Finally, the DNA fungi sequence comparisons that were morphologically determined as *F. oxysporum*, were molecularly corroborated as *F. oxysporum* f. sp. *cubense* with a similarity of 97%. It was proved that the study fungi were the causal agents of the symptoms at the field because their inoculation in grass growing in plots (at the greenhouse) determined the same symptoms. The re-isolates were identified as the inoculated species, and in this way the Koch's postulates were fulfilled.

Keywords: *Fusarium* spp.; *Poa annua*; *Agrostis* spp.; Axenic culture; Rot; Wilting.

¹ Departamento de Veterinaria y Zootecnia, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato, Campus Irapuato-Salamanca. Ex-Hacienda El Copal km. 9, carretera Irapuato-Silao; C.P. 36821, Irapuato, Guanajuato. México.

² Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38,5. Chapingo, Estado de México. C.P. 56230.

³ Centro de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Av. Universidad No. 940, Col. Ciudad Universitaria, Aguascalientes, México. C.P. 20131.

⁴ Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38.5. Chapingo, Estado de México. C.P. 56230.

⁵ Facultad de Ingeniería Agrohidráulica-Programa Ingeniería Agronómica y Zootecnia, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, San Juan Acateno, Teziutlán, Puebla, México. C.P. 73940.

⁶ DGIP, Universidad Autónoma Chapingo, Carretera México-Texcoco km 38,5. Estado de México. C.P. 56230.

Address correspondence to: Alberto Margarito García-Munguía, e-mail: almagamu@hotmail.com

Received 11.XII.2013. Accepted 11.XI.2015.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades que causan pudrición de raíz y cuello en los céspedes de campos de golf constituyen un factor limitante para su desarrollo en muchas partes del mundo, principalmente cuando no se realizan medidas de manejo adecuadas (Kackley et al., 1990). Entre los agentes causantes de enfermedades en céspedes se encuentran hongos fitopatógenos, los cuales presentan una variación morfológica, patogénica y de adaptación a diversas condiciones climáticas, que les da la posibilidad de atacar al cultivo en diferentes etapas de su desarrollo (Mendoza, 1996). En este sentido, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia homeocarpa*, *Fusarium* spp. y *Pythium* spp. causan pérdidas económicas y daños severos durante el desarrollo y mantenimiento del cultivo. Estos hongos se encuentran en forma natural en los suelos, pudiendo ocasionar individualmente o en grupo pudriciones de raíz y cuello en céspedes de campos de golf. Por esta causa resulta dificultoso conocer con exactitud cuál es el agente principal que está ocasionando la enfermedad. Los síntomas generales que producen este grupo de patógenos son clorosis y necrosis del follaje debido a una pudrición de la raíz y cuello de la planta (Gelernter y Stowell, 2001). Estos síntomas son ocasionados comúnmente por diferentes especies de los géneros *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Pythium*. Por esta causa, es importante determinar cuáles son los síntomas particulares que los patógenos causantes de pudriciones de raíz y cuello inducen en *Agrostis palustris*, especie utilizada para césped de campos de golf. De la misma manera, es imprescindible realizar el diagnóstico morfológico de los patógenos aislados, confirmarlo por caracterización molecular y comprobar la patogenicidad. La realización de un diagnóstico correcto de la enfermedad es necesario, porque de esto depende la elección de un método de manejo apropiado, que pueda evitar daños severos al césped (Toshikazu y Beard, 1997). Con estos antecedentes se plantearon los objetivos de caracterizar los síntomas del daño ocasionado en céspedes de campos de golf, realizar el diagnóstico morfológico de los patógenos aislados de plantas con síntomas de pudrición de raíz y cuello, confirmarlo por caracterización molecular y comprobar la patogenicidad de los hongos patógenos aislados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de muestreo. El estudio se realizó en el Club de Golf México, ubicado en la delegación Tlalpan en el Distrito Federal, México. Se realizó un recorrido general en el campo, que consta de 18 hoyos, para observar los síntomas de enfermedades presentes en diferentes partes de los hoyos. La toma de muestras se realizó el 24 de enero del año 2008 y en cada punto de muestreo se tomaron tres repeticiones. Las muestras fueron tomadas en los hoyos "Rough" 4; 13; "Spotting" 14, y 15 "Green" el 24 de enero de 2008. Las mues-

tras consistieron de plantas con síntomas de amarillamiento, marchitamiento y necrosis. Las especies con las cuales se trabajó fueron *Agrostis* spp., *Festuca* spp., *Bromus* spp., *Poa annua* y *Pennisetum clandestinum* (Fig. 1 a y b). Las muestras se obtuvieron con un sacabocados de 5 cm de diámetro y se colocaron dentro bolsas plásticas. Las bolsas se acondicionaron a temperatura ambiente en cámaras, en el laboratorio de hongos fitopatógenos de la Maestría en Protección Vegetal del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo, México hasta su procesamiento.

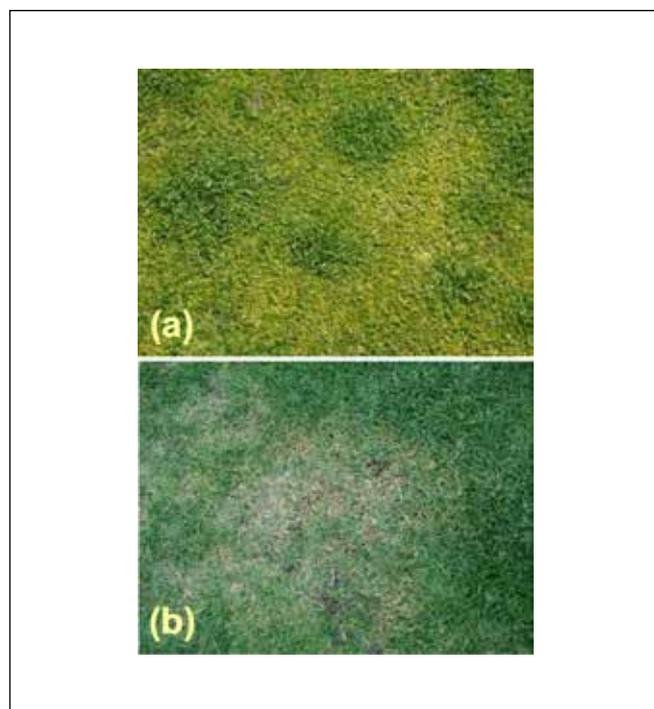


Fig. 1. Síntomas en plantas de césped: (a) en un "Green" y (b) en "Spotting" o "Rough" del Club de Golf México.

Fig. 1. Symptoms in plants at the field: (a) a "Green" and (b) "Spotting" or "Rough" at the Golf Club Mexico.

Preparación del material vegetal y aislamiento de los hongos. De cada muestra del material vegetal se tomaron submuestras que presentaban daños visibles de necrosis en la raíz y el cuello (Fig. 2 a y b), se lavaron con agua corriente del grifo y se obtuvieron trozos de 0,5 cm, el mismo procedimiento se realizó con una parte de tejido visiblemente sano (control). Todos los trozos se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% (30 g/L de Cl activo) durante 1,5 minutos. Luego se realizó un triple enjuague en agua destilada estéril y se colocaron sobre papel filtro esterilizado hasta eliminar el exceso de humedad. Posteriormente los trozos se sembraron en cajas de Petri en tres medios de cultivo: agar papa-dextrosa (PDA), jugo V8, y agar extracto de malta (EMA) (Difco®). Se colocaron cinco trozos de material vegetal por

caja, las que se incubaron en oscuridad a temperatura de laboratorio (22 ± 3 °C) durante 7 días. Las colonias resultantes se separaron en grupos de acuerdo al color y forma de crecimiento (Király et al., 1974). Las colonias que produjeron conidios se purificaron por la técnica de cultivos monospóricos y las que no produjeron estructuras reproductivas por medio de la técnica de punta de hifa (Tlapal et al., 1995; Cruz, 1996).

Para realizar la identificación morfológica se prepararon montajes con glicerol 50%. Posteriormente se observaron en un microscopio compuesto (American Optical®). El color, la forma de la colonia, y la forma y color de las estructuras morfológicas se consideraron para la identificación del género y la especie. Con este propósito se utilizaron las claves y descripciones de Booth (1971), Domsch et al. (1980), Romero (1993), Dean (1996), Smiley et al. (1996), Barnett y Hunter (1998) y Mendoza (1999).



Fig. 2. (a) Muestra de césped con síntomas de amarillamiento, y (b) Planta con raíz y tallo necrosado.

Fig. 2. (a) Grass sample with yellowing symptoms, and (b) plant with necrotic root and stem.

Caracterización molecular por secuenciación. La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biotecnología N° 209 de Fitopatología del Colegio de Postgraduados. Se utilizó el método descrito por Ahrens y Seemuler (1992) y Lee et al. (1993). El ADN obtenido fue amplificado por PCR de la región interna ITS (*Internal Transcribed Spacer*), ITS1 e ITS2, de los genes ribosomales RNA 18S-5.8S-28S (Lee y Taylor, 1990; Sogin, 1990; Mugnier, 1998). Se utilizó un juego de oligonucleótidos iniciadores ITS4 (TCCTC-CGCTTATTGATATGC) e ITS5 (GGAAGTAAA-

ACTCGTAACAAGG). El procedimiento se llevó a cabo en un termociclador Bio Rad con el siguiente programa de amplificación: un ciclo 95 °C durante 2 min; 30 ciclos a 95 °C por 1 min; 50 °C durante 30 seg, 72 °C durante 2 min, y finalmente un ciclo de 72 °C durante 10 min (White et al., 1990). La calidad de la amplificación se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, y revelado con bromuro de etidio en un transiluminador Bio Rad. La purificación de la amplificación se realizó utilizando el kit comercial QIAquick® (QIAGEN) para la purificación de productos de PCR, siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Los productos fueron secuenciados en las direcciones 5' → 3' y 3' → 5' con los mismos oligonucleótidos iniciadores ITS anteriormente mencionados, en un secuenciador Genetic Analyzer 3100 de Applied Biosystems. Las secuencias obtenidas se analizaron en el programa Lasergene 2001, versión 5 de DNASTAR Inc. Se efectuó un análisis de comparación pareado con la base de datos del banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Pruebas de patogenicidad. La inoculación del césped se realizó mediante un aspersor y una pipeta, aplicando 5 mL de una solución que contenía 10^6 conidios/mL de *Fusarium oxysporum* o *Giberella* sp. (Rowe, 1980) y 20000 zooporas/mL de *Phytium ultimum* (Ramírez y Romero, 1980), cada hongo por separado. Se realizaron dos tratamientos, que consistieron en dos aislamientos de los patógenos y un control en un diseño totalmente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento. La inoculación se realizó por aspersión en plantas de césped (*Agrostis palustris*) de 5 meses de edad, cortadas a 6 cm de altura, que crecieron en macetas. El control consistió de una maceta con césped a la cual solo se le agregó agua destilada esterilizada. Todas las plantas se regaron a diario y se mantuvieron en invernadero a 12-15 °C y 80-85% de H.R. A las 72 horas de la inoculación, en las plantas que presentaron síntomas de pudrición de raíz y cuello, se (1) identificaron los hongos, (2) describieron los síntomas inducidos por cada uno, (3) compararon las características morfológicas y de cultivo con las que tenían los hongos inoculados, y (4) evaluaron la frecuencia de reaislamiento de cada hongo, así como el periodo de incubación y la severidad de la enfermedad.

Análisis de datos. Los datos de severidad se analizaron con ANOVA utilizando el software SAS® Versión 9.1. Cuando las pruebas F fueron significativas, se usó la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$) para la comparación de medias.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación de los patógenos, descripción de los síntomas y características morfológicas de los aislamientos. Los patógenos aislados fueron *Giberella* sp., *Fusarium oxysporum* y *Phytium ultimum*. Los síntomas producidos en las plantas por

Giberella sp. y *Fusarium oxysporum* fueron manchas foliares y pudrición de raíces y cuellos, al igual que manchas foliares no uniformes, manchas húmedas que, conforme pasó el tiempo, se tornaron de color café claro a café oscuro, hasta la muerte total del área. Otros síntomas que presentó *Phytium ultimum* fueron: marchitez en el ápice y manchas de color amarillento y de color canela pajizo (Fig. 1 y 2). Los tres hongos se aislaron en medio de cultivo artificial de V8 y en PDA. Aquí crecieron colonias que desarrollaron una colonia micelial con pigmentación blanco algodonoso y con el centro rojizo arrosado (hoyo 15, "Green"); una pigmentación rosa pálido con crecimiento rápido (hoyo 13), y una colonia color rosa fuerte ("Spotting", hoyo 4) (Fig. 3 a, b y c). Morfológicamente mostraron microconidios pequeños, hialinos y elípticos en falsas cabezas, y macroconidios hialinos, alargados, puntiagudos y ligeramente curvados. Además, presentó clamidosporas globosas, intercalares o terminales (Fig. 4).

Por sus características morfológicas el hongo fue identificado como *Fusarium* spp. (Booth, 1971; Domchs y Gams, 1980; Barnett y Hunter, 1998), y al realizar las mediciones de los micro y macro conidios, clamidosporas, y definir el tipo de fálides, se enmarcaron en una especie de acuerdo a la descripción de Decker y Decker (1988), Smith et al. (1989); Turgeon (1996);

Fermanian et al. (1997) y Barnett y Hunter (1998). Los resultados obtenidos sugieren que la cepa aislada del hoyo 15 o "Green" pertenece a la especie *Giberella avenacea*. Las cepas aisladas del hoyo 13 y "spotting" (hoyo 4) presentaron morfológicamente microconidios pequeños y macroconidios hialinos, alargados, puntiagudos y ligeramente curvados, clamidosporas globosas intercalares o terminales, sugiriendo la presencia de *Fusarium oxysporum*. El aislado que presentó pudrición café, manchas circulares irregulares, una masa blanca algodonosa de micelio, y tuvo una frecuencia de aislamiento del 80-100%, desarrolló una colonia micelial con pigmentación blanco algodonoso luego de 4 días (Fig. 3d). Este aislado presentó morfológicamente hifas hialinas de 5-7 micras de diámetro y sin septas, así como esporangios esféricos, un oogonio liso con oospora aplerotica y anteridio séstil (Fig. 5); estas características corresponden a *Pythium ultimum* según Romero (1995), Dean (1996) y Smiley (1996).

Pruebas de patogenicidad. Las pruebas de patogenicidad mostraron que los primeros síntomas inducidos por *F. avenaceum* (*G. avenacea*) ocurrieron a los 7 días desde la inoculación (ddi). La severidad de la enfermedad a los 7, 14 y 21 días, puede observarse en la Tabla 1. Los síntomas que mostraron las plantas de *A. palustris* inoculadas con *F. avenaceum* fueron

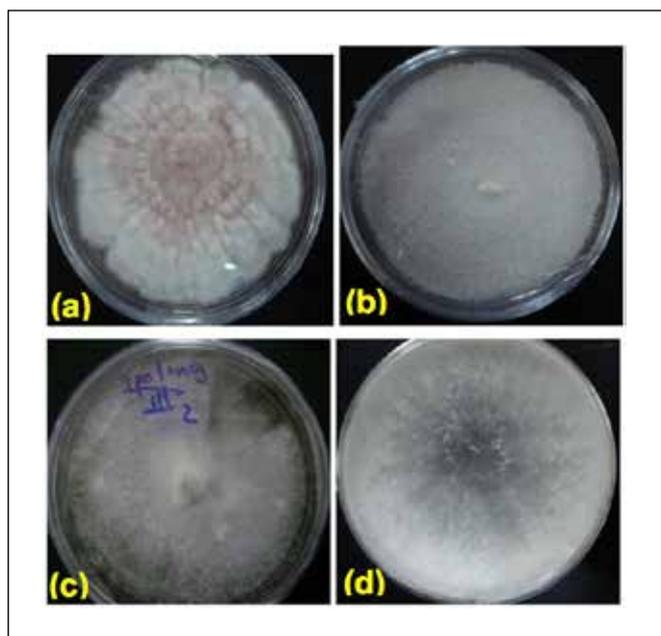


Fig. 3. Forma y color de las colonias de (a) *Giberella* sp., (b) *Fusarium oxysporum*, (c) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, (d) *Phytium ultimum*; a) micelio algodonoso de color blanco con el centro arrosado de color rojizo; b) micelio color rosa pálido, c) micelio de coloración rosa fuerte y d) micelio algodonoso blanco.

Fig. 3. Colony shape and color in (a) *Giberella* sp., (b) *Fusarium oxysporum*, (c) *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, (d) *Phytium ultimum*; a) white cottony mycelia with reddish center; b) light pink mycelia, c) dark pink mycelia, and d) white cottony mycelia.

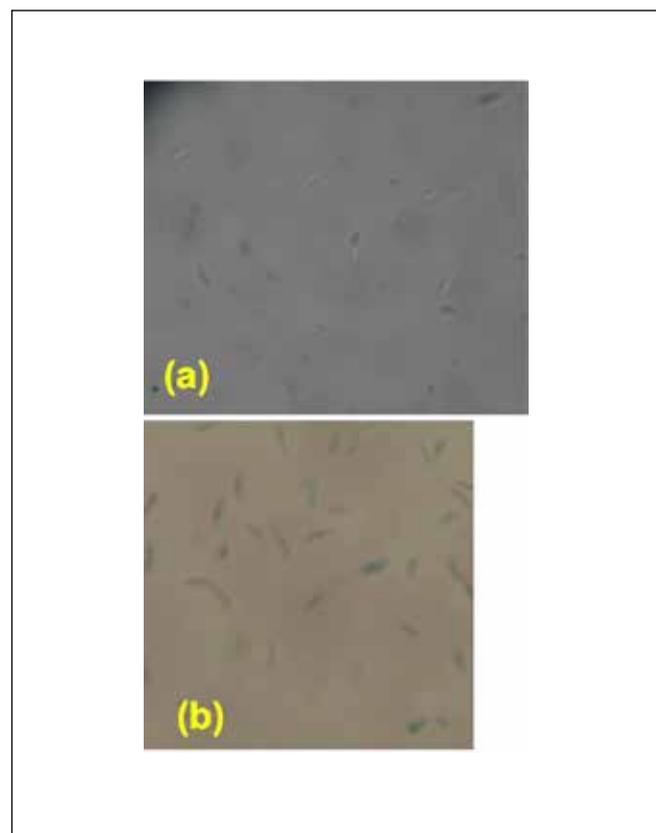


Fig. 4. Conidios de *Fusarium* spp. (a) microconidios, (b) macroconidios.

Fig. 4. Conidia of *Fusarium* spp. (a) Microconidia, (b) macroconidia.

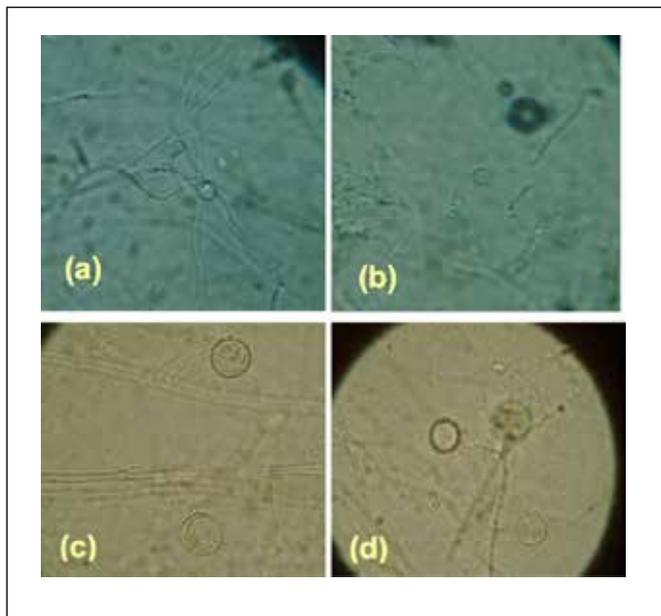


Fig. 5. Colonias de *Pythium ultimum* (a) oogonio joven con anteridio monoclino sésil, (b) oogonio intercalar, (c) oogonio con paredes lisas y oospora applerótica, (d) hifas hialinas gruesas. Las imágenes de las estructuras reproductivas se tomaron con objetivo 40X.

Fig. 5. Colonies of *Pythium ultimum* (a) young oogonium with sessile monoclinal anteridium, (b) oogonium interlayer, (c) oogonium with smooth walls and aplerotica oospore, (d) thick hyaline hyphae. The images of reproductive structures were taken with a 40X objective.

manchas foliares no uniformes de aproximadamente 5 cm, húmedas y con aéreas de color verde, y pudrición de raíces (Fig. 6). Nuestros resultados indicaron que *F. avenaceum* es uno de los agentes causantes de la pudrición de raíz y cuello en césped, tal como fue señalado por Double (1977) y Wong (2003). De igual forma, *F. oxysporum* presentó un periodo de incubación de 7 ddi en *A. palustris*. La severidad alcanzada para cada uno de estos patógenos a los 7, 14 y 21 días desde la inoculación, puede ser observada en la Tabla 3. Los síntomas inducidos por este patógeno en *A. palustris* fueron manchas foliares y pequeñas áreas de color verde claro, raíces con zonas necrosadas y pudrición en el cuello. Todos estos sínto-

mas coinciden con los descritos por Decker y Decker (1988), Smith et al. (1989), Turgeon (1996) y Fermanian et al. (1997). *Fusarium oxysporum* y *F. avenaceum* se reaislaron en un 100% de las muestras en las plantas de *A. palustris* inoculadas con estos patógenos. Las características morfológicas y culturales de los hongos reaislados fueron semejantes a las descritas con anterioridad para el cultivo monoconidial que fue inoculado, identificándose como *F. oxysporum*. Esto evidenció que este hongo es uno de los agentes causales de la pudrición de raíz y cuello en césped (Double, 1977; Wong, 2003). De la misma manera, *Pythium ultimum* presentó un periodo de incubación de 4 días en césped *A. palustris*. La severidad de la enfermedad puede observarse en la Tabla 1. Los síntomas inducidos por este patógeno en *A. palustris* fueron pudrición foliar, con manchas circulares, una masa blanca algodonosa en el área radical y finalmente oscurecimiento en el cuello. Todos estos síntomas coinciden con los descritos por Smith et al. (1989), Dean (1996), Fermanian et al. (1997) y Tredway y Burpee (2001). También en las plantas de *A. palustris* inoculadas con *P. ultimum* se reaisló el mismo hongo en un 100%. Las características morfológicas y culturales de los reaislamientos obtenidos fueron semejantes a las descritas con anterioridad para el cultivo zoospórico que fue inoculado, identificándose como *P. ultimum*. Esto evidenció que este hongo es uno de los agentes causales de la pudrición de raíz y cuello en céspedes (Romero, 1995). No se observaron síntomas en los controles, en ningún caso.

Caracterización molecular por secuenciación. La comparación entre las secuencias obtenidas del ADN del hongo aislado del hoyo 15 y los síntomas mencionados anteriormente, que se determinaron morfológicamente como *F. avenaceum*, fueron corroborados molecularmente como *G. avenacea* con una similitud de 96%. La comparación de estas secuencias con las disponibles en el GenBank permitió confirmar que el hongo aislado es el mencionado molecularmente (No. de acceso EU255804) (NCBI, 2008).

Del mismo modo, la comparación entre las secuencias obtenidas del ADN del hongo aislado del hoyo 13 con los síntomas mencionados anteriormente, que se determinaron

Tabla 1. Porcentaje de severidad de hongos inoculados en césped (*Agrostis palustris*) en tres evaluaciones, realizadas a los 7, 14 y 21 días desde la inoculación.

Table 1. Percentage of fungi severity on inoculated Grass (*Agrostis palustris*) in three evaluations conducted 7, 14 and 21 days after inoculation.

Patógenos inoculados	Evaluación 1 (7 ddi)	Evaluación 2 (14 ddi)	Evaluación 3 (21 ddi)
1. <i>Fusarium avenaceum</i>	10 b	15 a	35 a
2. <i>F. oxysporum</i> f sp. <i>cubense</i>	15 a	20 b	35 a
3. <i>Pythium ultimum</i>	15 a	35 c	65 b

ddi: días desde la inoculación.

Mismas letras: estadísticamente iguales.

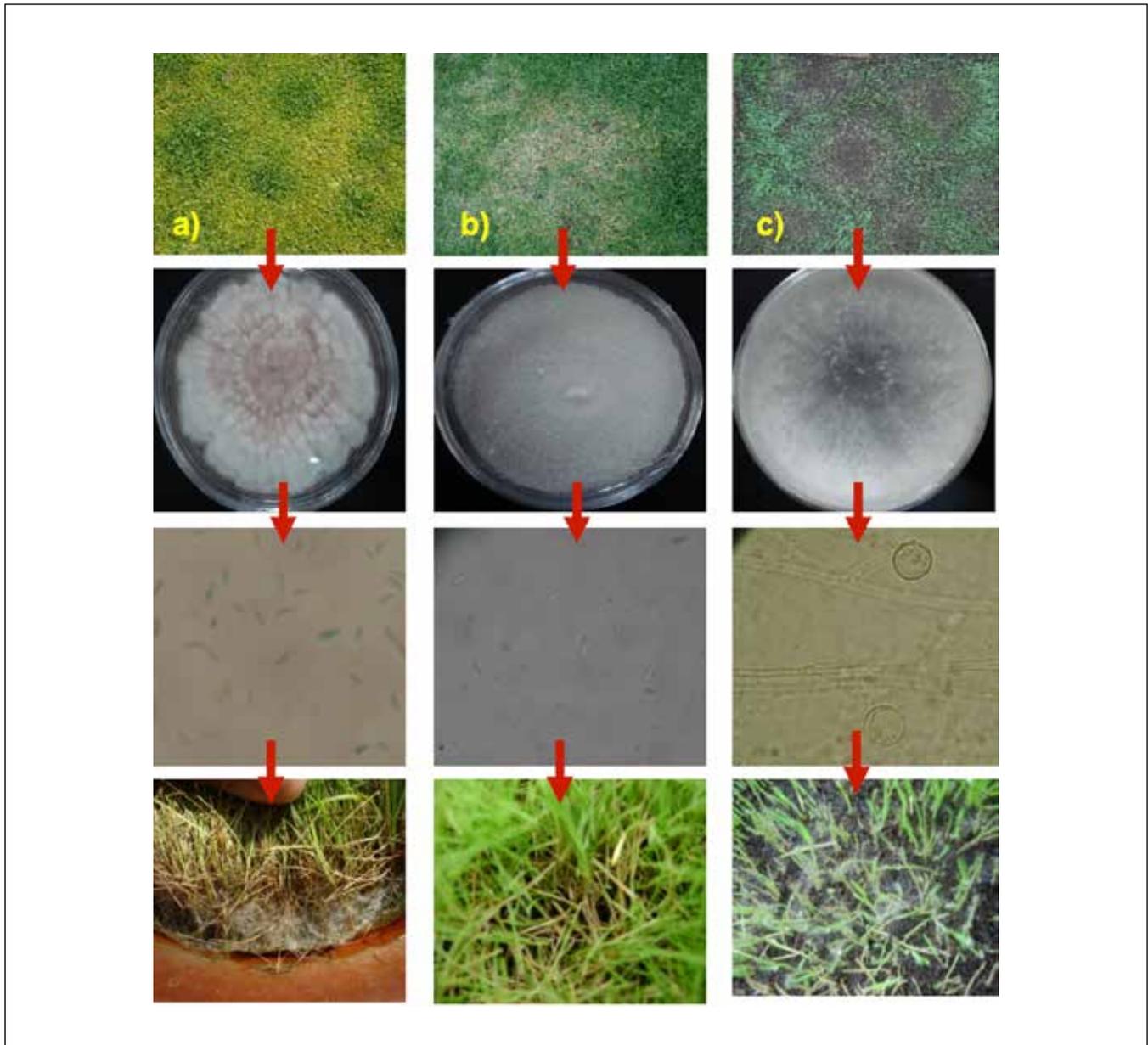


Fig. 6. Postulados de Koch: Síntomas en plantas de *A. palustris*, características morfológicas de las colonias, micelio y conidios de hongos patógenos que afectan céspedes en el Club de golf de México. (a) *Giberella avenacea*, (b) *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* y (c) *Pythium ultimum*.

Fig. 6. Koch's postulates. Symptoms in *A. palustris* plants, morphological colony characteristics, mycelium and conidia of pathogenic fungi that affect turfs at the Club de Golf Mexico. (a) *Giberella avenacea*, (b) *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense* and (c) *Pythium ultimum*.

morfológicamente como *F. oxysporum*, fue corroborada molecularmente como *F. oxysporum* con una similitud de 97% (No. de acceso EU839403) (NCBI, 2008).

Por último, la comparación entre las secuencias obtenidas del ADN del hongo aislado del spotting con los síntomas mencionados anteriormente, y que se determinaron morfológicamente como *F. oxysporum*, fueron corroborados molecularmente como *F. oxysporum* f. sp. *cubense* con una similitud de 97%. (No. de acceso EU780660) (NCBI, 2008).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Autónoma Chapingo, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Club de Golf México y CONACYT por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto.

REFERENCIAS

- Ahrens, U. y E. Seemüller (1992). Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Barnett, H.L. y B.B. Hunter (1998). Illustrated genera of imperfect fungi. The American Phytopathological Society. USA. 218 p.
- Booth, C. (1971). The Genus *Fusarium*. The Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 237 p.
- Cruz, A.A. (1996). Identificación de hongos causantes de pudrición de raíz y cuello del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el sureste del estado de México. Tesis de Maestría en Ciencias en Producción Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. pp. 58-77.
- Domsch, K.H., W. Gams y T.H. Anderson (1980). Compendium of soil fungi. Vol 1. APS Press, St. Paul Minnesota. 646 p.
- Dean, H.G. (1996). Turfgrass diseases and their control. Agricultural extension Service. The University of Tennessee. U.S.A. 16 p.
- Decker, H.F. y J.M. Decker (1988). Lawn Care, A Handbook for professionals. Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA.
- Kackley, K.E., A.P. Grybauskas, R.L. Hill y P.H. Dernoeden (1990). Influence of temperature-soil water status interactions on the development of summer patch in *Poa* spp. *Phytopathology* 80: 650-655.
- Gelernter, W. y L. Stowell (2001). Advances in *Poa* Seedhead management. *Golf Course Management* 69: 49-53.
- Király Z., Z. Klement, F. Solymosy y J. Voras (1974). Methods in Plant Pathology. Elsevier Scientific Publishing Company. New York, USA. pp. 30-40.
- Lee, B.S. y J.W. Taylor (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. En: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. y White T.J. (eds), pp. 282-287. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
- Lee, I.M., R. Hammond, R.E. Davis y D.E. Gundersen (1993). Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* 83: 834-842.
- Mendoza, Z.C. (1996). Diagnóstico de enfermedades fungosas. Quinta Edición. Ed. UACH. Depto. de Parasitología Agrícola. Chapingo, Edo. México.
- Mugnier, J. (1998). Molecular evolution and phylogenetic implications of ITS sequences in plants and in fungi. En: Bridge P., Cousteaudier Y. y Clarkson J. (eds), pp. 253-277. Molecular Variability of Fungal Pathogens. CAB International.
- Ramírez, V.J. y C.S. Romero (1980). Supervivencia de *Phytophthora capsici* Leo., agente causal de la marchitez del chile. *Agrociencia* 39: 9-18.
- Romero, C.S. (1995). Hongos Fitopatógenos. Primera reimpresión. Universidad Autónoma de Chapingo. 347 p.
- Rowe, R.C. (1980). Comparative pathogenicity and host ranges of *Fusarium oxysporum* isolates causing crown and root rot of greenhouse and field-crown tomatoes in North America and Japan. *Phytopathology* 70: 1143-1147.
- Smiley, R.W., P.H. Dernoeden y B.B. Clarke (1996). Compendium of Turfgrass Diseases. 2nd edition. APS Press. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A.
- Smith, M.L., J.N. Bruhn y J.B. Anderson (1989). The fungus *Armillaria bulbosa* is among the largest and oldest living organisms. *Nature* 336: 428-431.
- Sogin, L.M. (1990). Amplification of ribosomal RNA genes for molecular evolution studies. En: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. y White T.J. (eds), pp. 307-310. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
- Tlalpa, B.B., K.S. Osada, C.F. González y Z.C. Mendoza (1995). Comportamiento fisiológico de 30 aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Revista Mexicana de Fitopatología* 13: 41-51.
- Toshikazu, T. y J.B. Beard (1997). Disease Characteristics and Control. Color Atlas of Turfgrass Diseases. New Jersey, Canada.
- Tredway, L.P. y L.L. Burpee (2001). *Rhizoctonia* diseases of turfgrass. The plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-1109-01. Disponible en línea desde: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/Rhizoctonia.aspx>
- Turgeon, A.J. (1996). Turfgrass management. Ed. Prentice Hall, Inc. New Jersey, USA.
- White, T.J., T. Bruns, S. Lee y J. Taylor (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. y White T.J. (eds). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA. 315-322.
- Wong, F. (2003). Control of *Rhizoctonia* Diseases on Turfgrass. Associate Specialist in Cooperative extension, Department of Plant Pathology & Microbiology. USA.