

Morphological and molecular identification of *Phytophthora capsici* L. in pipiana pumpkin and its greenhouse management

Identificación morfológica y molecular de *Phytophthora capsici* L. en calabaza pipiana y su manejo en invernadero

José Francisco Díaz-Nájera¹; Mateo Vargas-Hernández¹; Santos Gerardo Leyva-Mir¹; Sergio Ayvar-Serna²; Alejandro Casimiro Michel-Aceves²; Omar Guadalupe Alvarado-Gómez^{3*}

¹Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Programa de Protección Vegetal. Carretera México-Texcoco km. 38.5, Chapingo, Edo. de México, C.P. 56230, MÉXICO

²Centro de Estudios Profesionales. Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero. Avenida Vicente Guerrero núm. 81, Iguala, Guerrero, MÉXICO

³Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Agronomía. Av. Universidad s/n, cd. Universitaria San Nicolás de los Garza, Nuevo León, C.P. 66455, MÉXICO

Correo-e: alvarado@prodigy.net.mx (*Autor para correspondencia).

Abstract

The pipiana pumpkin is an important element in the diet of south-central Mexico residents. Its seeds are consumed directly toasted and seasoned with salt, and they are also the main ingredient used for making typical dishes such as green mole or pipian, as well as various traditional sweets. Some soil microorganisms cause severe damage in fruit, which reduces yield. The aim of the study was to identify morphologically and molecularly the oomycete causing rot in pipiana pumpkin fruits, and evaluate options for chemical and biological control in greenhouses. During August and September 2011, in the northern region of the state of Guerrero, pipiana pumpkin fruits with rot symptoms were collected. Morphological identification was performed with the keys proposed by Gallegly and Hong (2008), and molecular identification was by polymerase chain reaction (ITS-PCR). Both tests identified *Phytophthora capsici* as the causal agent of rot in pipiana pumpkin fruits. The sequences obtained showed 99 % similarity with the GenBank-held sequences for *P. capsici* in watermelon from the United States and pumpkin from Italy. The active ingredients propamocarb + fosetyl and metalaxyl + chlorothalonil delayed the presence of the pathogen in the fruits by six days, whereas the biocontrol agents delayed it by four days.

Keywords: *Cucurbita argyrosperma* Huber, ITS, DNA sequencing, chemical disease control.

Resumen

La calabaza pipiana es importante en la alimentación de la población en el centro-sur de México. Sus semillas se consumen directamente tostadas y aderezadas con sal; además, son el ingrediente principal para elaborar platillos típicos como el mole verde o pipian, así como diferentes dulces tradicionales. Algunos microorganismos del suelo causan severos problemas en frutos, lo que afecta el rendimiento. El objetivo del estudio fue identificar morfológica y molecularmente al oomicete causante de la pudrición de frutos de calabaza pipiana, y evaluar opciones de control químico y biológico en invernadero. Durante agosto y septiembre de 2011, en la zona norte del estado de Guerrero, se colectaron frutos de calabaza pipiana con síntomas de pudrición. La identificación morfológica se realizó con las claves propuestas por Gallegly y Hong (2008), y la molecular fue mediante la reacción en cadena de la polimerasa, ITS-PCR. En ambas pruebas se identificó a *Phytophthora capsici* como el causante de la pudrición de frutos de calabaza pipiana. Las secuencias obtenidas tuvieron 99 % de similitud con *P. capsici* en sandía de Estados Unidos y en calabaza de Italia, depositadas en el banco de genes (GenBank). Los ingredientes activos, propamocarb+fosetil y metalaxil+clorotalonil, mostraron control al retrasar seis días la presencia del patógeno en frutos, mientras que los agentes de biocontrol la retardaron cuatro días.

Palabras clave: *Cucurbita argyrosperma* Huber, ITS, secuenciación de ADN, manejo químico de enfermedades.



Introduction

The pipiana pumpkin (*Cucurbita argyrosperma* Huber) is an economically important crop in the state of Guerrero, one of the major state producers of its seed in Mexico. The seed sales price per ton has risen from \$ 15,500.00 MXN in 2005 to \$ 35,000.00 MXN in 2011, which has led to the area sown in the state increasing from 4,228 to 5,742 ha. However, production in Mexico and in various parts of the world is affected during the summer by the warm conditions and high relative humidity that favor the presence of diseases (Cohen, Burger, Horev, Koren, & Edelstein, 2007; Zitter, Hopkins, & Thomas, 2004).

In some areas of the state of Guerrero, pipiana pumpkin is grown in flat and poorly-drained soils, which together with the crop's indeterminate and creeping growth habit generate a microclimate with optimal conditions for development and infection by fungi and oomycetes such as *Phytophthora* spp., causing yield losses (Ayvar-Serna, Mena-Bahena, Durán-Ramírez, Cruzaley-Sarabia, & Gómez-Montiel, 2007) and thereby reducing the incomes of farmers who grow it. Farmers commonly use systemic fungicides for disease control over prolonged periods of time (Gisi & Sierotzki, 2008); their overuse, in turn, has caused environmental pollution and decreased their efficiency due to the constant evolution of pathogens (Bartlett, Clough, Godwin, Hall, Hamer, & Parr-Dobrzanski, 2002).

Recently, the use of non-chemical methods to control plant diseases has increased. In the last 30 years, beneficial microorganisms have been used for biological control of diseases (Lim & Kim, 2010; Yang et al., 2012), mainly fungi such as *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Coniothyrium* and *Candida*, and bacteria such as *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Agrobacterium* (Harman, Obregón, Samuels, & Lorito, 2010; Pliego, Ramos, Vicente, & Cazorla, 2011). The use of isolated strategies has had little impact, thereby necessitating an integrated management program (Antonopoulos, Melton, & Mila, 2010; Bi, Jiang, Hausbeck, & Hao, 2012). Based on the above, the aim of this research was to identify morphologically and molecularly the oomycete causing rot in pipiana pumpkin fruits, and assess options for chemical and biological control in greenhouses.

Materials and methods

Plant material

During August and September 2011, fruits of pipiana pumpkin (*C. argyrosperma*), criollo genotype Apipilulco, were collected from a lot in the Guerrero State Agricultural College's Experimental Field, located in the municipality of Cocula, Guerrero, situated at 18°

Introducción

La calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber) es un cultivo de importancia económica en el estado de Guerrero, siendo uno de principales estados productores de semilla a nivel nacional. El precio de venta de la semilla por tonelada ha aumentado de \$15,500.00 MXN en 2005 a \$35,000.00 MXN en 2011, lo que ha propiciado el incremento de la superficie sembrada en la entidad de 4,228 a 5,742 ha. Sin embargo, la producción en México y en varias partes del mundo se ve afectada durante el verano por las condiciones cálidas y de alta humedad relativa que favorecen la presencia de enfermedades (Cohen, Burger, Horev, Koren, & Edelstein, 2007; Zitter, Hopkins & Thomas, 2004).

En algunas zonas del estado de Guerrero se cultiva calabaza pipiana en suelos planos y mal drenados, que aunado al hábito de crecimiento rastrero e indeterminado del cultivo generan un microclima con óptimas condiciones para el desarrollo e infección por hongos y oomicetes como *Phytophthora* spp., causando pérdidas en el rendimiento (Ayvar-Serna, Mena-Bahena, Durán-Ramírez, Cruzaley-Sarabia, & Gómez-Montiel, 2007), lo que disminuye los ingresos de los productores dedicados al cultivo de calabaza. Los agricultores comúnmente utilizan fungicidas sistémicos para el control de enfermedades durante prolongados periodos de tiempo (Gisi & Sierotzki, 2008); por lo que su uso excesivo ha provocado contaminación ambiental y ha disminuido su eficiencia debido a la constante evolución de los patógenos (Bartlett, Clough, Godwin, Hall, Hamer, & Parr-Dobrzanski, 2002).

Recientemente, la tendencia del control de enfermedades de las plantas sin utilizar productos químicos se ha acrecentado. En los últimos 30 años, se han usado microorganismos benéficos para el control biológico de enfermedades (Lim & Kim, 2010; Yang et al., 2012), principalmente hongos como *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Coniothyrium* y *Candida*, así como las bacterias *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Agrobacterium* (Harman, Obregón, Samuels, & Lorito, 2010; Pliego, Ramos, Vicente, & Cazorla, 2011). El uso de estrategias aisladas han tenido poco impacto, por ello es necesario implementar un manejo integrado (Antonopoulos, Melton, & Mila, 2010; Bi, Jiang, Hausbeck, & Hao, 2012). Por lo anterior, el objetivo de la investigación fue identificar morfológica y molecularmente al oomicete causante de la pudrición de frutos de calabaza pipiana, y evaluar opciones de control químico y biológico en invernadero.

Materiales y métodos

Material vegetal

Durante agosto y septiembre de 2011 se colectaron frutos de calabaza pipiana (*C. argyrosperma*), del genotipo

19° NL, 99° 39' WL, and at 640 meters. The sample size and W-transect type of systematic sampling used in the present study were based on the methodology proposed by Pedroza-Sandoval (2009). Symptoms considered were sunken watery spots with white mycelium growing on the bottom and top of the fruit (Zitter et al., 2004).

Morphological identification

From pumpkin fruits with symptoms and signs of rot, five pieces of 0.5 cm² tissue were taken from the advancing disease area. Samples were disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for two minutes, washed three times with sterile distilled water and dried. In total 100 tissue samples were sown in Petri dishes containing vegetable juice-Agar (V8-Agar) as culture medium (Singlenton, Mihail, & Rush, 1992). Each developed colony was isolated and purified by monozoosporic culture using the methodology described by Fernández-Herrera, Guerrero-Ruiz, Rueda-Puente, and Acosta-Ramos (2013). To obtain sexual structures, five discs of approximately 1.0 cm in diameter with the medium containing the pathogen were placed in Petri dishes with 20 mL of sterile water. The pathogen was incubated at 25 ± 1 °C, and four days later they produced sporangia. Preparations were made and analyzed in light microscopy at 40 X. The length and width of 30 sporangia were measured. Additionally, scanning electron microscopy was performed. Morphological identification was based on the keys described by Singlenton et al. (1992), Watanabe (2002) and Gallegly and Hong (2008).

Pathogenicity tests

Twenty healthy fruits were disinfected with 1.5 % sodium hypochlorite for two minutes, washed with distilled water and dried on paper towels, both sterile. The increase in the inoculum was in V8-Agar medium. After 15 days of growth, 40 mL of a suspension was prepared at a concentration of 4 × 10⁶ zoospores per mL; in total, 15 fruits were inoculated by spraying with 2.5 mL per fruit. Only sterile distilled water was applied to the control. Inoculated fruits were placed on 60 × 40 cm Styrofoam trays, previously disinfected with 70 % ethanol and incubated under controlled conditions in a glasshouse at 26 °C and 80 % relative humidity. Symptoms of advancing rot were recorded daily for eight days. Ten tissue samples (± 0.5 cm²) were obtained from the forward rot areas, disinfected in the same way as the fruits, and sown on V8-Agar culture medium. The morphological characteristics of the reisolated colony were determined to complete Koch's postulates. The reisolated oomycete was purified and incubated for 15 days in V8-Agar culture medium for DNA extraction.

criollo Apipilulco, de un lote del Campo Experimental del Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, localizado en el municipio de Cocula, Gro., ubicado a 18° 19' LN, 99° 39' LO y a 640 msnm. El tamaño de muestra y tipo de muestreo sistemático de transecto en W se realizó bajo la metodología propuesta por Pedroza-Sandoval (2009). Los síntomas considerados fueron manchas acuosas hundidas con un crecimiento de micelio blanco en la parte inferior y superior del fruto (Zitter et al., 2004).

Identificación morfológica

De los frutos de calabaza con síntomas y signos de pudrición, se tomaron cinco trozos de tejido de 0.5 cm² de la zona de avance de la enfermedad. Las muestras se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1.5 % por dos minutos, se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron. En total se sembraron 100 muestras de tejido en cajas Petri conteniendo como medio de cultivo jugo de verduras Agar (V8-Agar) (Singlenton, Mihail, & Rush, 1992). Cada colonia desarrollada se aisló y purificó por cultivo monozoospórico utilizando la metodología descrita por Fernández-Herrera, Guerrero-Ruiz, Rueda-Puente, y Acosta-Ramos (2013). Para obtener estructuras sexuales, se contaron cinco discos de aproximadamente 1.0 cm de diámetro, del medio que contenía el patógeno, y se colocaron en cajas Petri con 20 mL de agua esterilizada. El patógeno se incubó a 25 ± 1 °C, y a los cuatro días produjeron esporangios. Se hicieron preparaciones y se analizaron en microscopía de luz a 40 X. En 30 esporangios se midió el largo y ancho. Adicionalmente, se realizó microscopía electrónica de barrido. La identificación morfológica fue con base en las claves de Singlenton et al. (1992), Watanabe (2002) y Gallegly y Hong (2008).

Pruebas de patogenicidad

Se desinfectaron veinte frutos sanos con hipoclorito de sodio al 1.5 % por dos minutos, se lavaron con agua destilada y secaron sobre papel toalla, ambos estériles. El incremento del inóculo fue en medio V8-Agar. Después de 15 días de crecimiento, se preparó 40 mL de una suspensión a una concentración de 4 × 10⁶ zoosporas por mL; en total, 15 frutos fueron inoculados mediante aspersión con 2.5 mL por fruto. Al testigo únicamente se le aplicó agua destilada estéril. Los frutos inoculados fueron colocados en charolas de unicel de 60 × 40 cm, previamente desinfectadas con etanol al 70 % y se incubaron en condiciones controladas en un invernadero de cristal a 26 °C y 80 % de humedad relativa. Los síntomas de avance de pudrición se registraron diariamente por ocho días. De las zonas de avance de pudrición se obtuvieron 10 muestras de tejido (± 0.5 cm²), se desinfectaron, de la misma manera

Molecular identification

DNA extraction was performed from 50-100 mg of mycelium, using the DNeasy^{MR} kit and following the manufacturer's procedure (Anónimo, 2012). Universal PCR reactions were performed for fungi and oomycetes with the primers ITS-1fu 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3' and ITS-4 5'-tcctcgcgttattgatatgc-3' (White, Burns, Lee, & Taylor, 1990), which amplify an internal transcribed spacer (ITS) and generate a product of varying size, between approximately 500 and 900 base pairs (bp). This practice was carried out with a reaction mixture in a final volume of 25 µL, whose final components were 1X reaction buffer, 2 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 20 pmol of each primer and 1 unit of *Taq* DNA polymerase (Promega). The thermal program consisted of maintaining the temperature at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles at 94-55-72 °C for 30-30-60 s and a final extension of 5 min at 72 °C. The products of the PCR reactions were separated by electrophoresis in 1.5 % agarose gels, and the fragments obtained were observed in a UVP-brand UV transilluminator. The PCR-amplified fragments were sequenced and compared with the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank database.

Evaluation of chemical and biological control

The effect of different active ingredients on the pathogen isolated in the Department of Agricultural Parasitology's Plant Pathology glasshouse at the Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, state of Mexico was compared. The plant material was the pipiana pumpkin (criollo genotype Apipilulco), using only tender and healthy fruits weighing about 150 g.

A monozosporic isolate was obtained from fruits with different symptoms and levels of damage and then sown in V8-Agar culture medium for growth (Singlenton et al., 1992). To induce zoospore production, V8-Agar medium discs containing the pathogen were sown in Petri dishes containing 20 mL of sterile distilled water and incubated at 25 °C for three days (Fernández-Herrera et al., 2013). Subsequently, the zoospore suspension was adjusted to a concentration of 4×10^6 mL⁻¹. First, the treatments were applied (Table 1) using a 2-liter hand sprayer (RL FLO MASTER); the surface of the fruits was sprayed with a water expenditure of 300 liters·ha⁻¹. Five hours were allowed to elapse to allow reentry of the products; once the time had elapsed, 2.5 mL of the adjusted pathogen concentration were sprayed.

Variable evaluated

The variable evaluated was days to the presence of the pathogen, which was the number of days it took, after applying the treatments and inoculating the pathogen, for colonies to begin appearing on the 0.5 cm² samples.

que los frutos, y se sembraron en medio de cultivo V8-Agar. Las características morfológicas de la colonia reaislada fueron determinadas para completar los postulados de Koch. El oomiceto reaislado se purificó e incubó durante 15 días en medio de cultivo V8-Agar para la extracción de ADN.

Identificación molecular

La extracción de ADN se realizó a partir de 50 a 100 mg de micelio, utilizando el kit DNeasy^{MR} y siguiendo el procedimiento del fabricante (Anónimo, 2012). Se realizaron reacciones de PCR universal para hongos y oomicetes con los oligos ITS-1fu 5'-tccgtaggtgaacctgcgg-3' y ITS-4 5'-tcctcgcgttattgatatgc-3' (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990); los cuales amplifican un espaciador transcrito interno (ITS) y generan un producto de talla variable entre 500 y 900 pares de bases (pb) aproximadamente. Esta práctica se realizó con una mezcla de reacción en un volumen final de 25 µL, cuyos componentes finales fueron amortiguador de reacción 1X, MgCl₂ 2 mM, dNTP's 200 µM de cada uno, 20 pmoles de cada oligonucleótido y 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Promega). El programa térmico consistió en mantener la temperatura a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos a 94-55-72 °C durante 30-30-60 s y una extensión final de 5 min a 72 °C. Los productos de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa a 1.5 %, y los fragmentos obtenidos se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVP. Los fragmentos amplificados por PCR fueron secuenciados y comparados con la base de datos del banco de genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, por sus siglas en inglés).

Evaluación de control químico y biológico

Se comparó el efecto de diferentes ingredientes activos sobre el patógeno aislado en el invernadero de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, en Chapingo Estado de México. El material vegetal implementado fue el genotipo criollo Apipilulco de calabaza pipiana, utilizando solo frutos tiernos y sanos de aproximadamente 150 g.

De los frutos con diferentes síntomas y niveles de daño se obtuvo un aislamiento monozospórico, mismo que fue sembrado en medio de cultivo V8-Agar para su incremento (Singlenton et al., 1992). Para inducir la producción de zoosporas se sembraron discos, de medio V8-Agar conteniendo el patógeno, en cajas de Petri con 20 mL de agua destilada estéril y se incubaron a 25 °C por tres días (Fernández-Herrera et al., 2013). Posteriormente, se ajustó la suspensión de zoosporas a una concentración de 4×10^6 mL⁻¹. Primeramente fueron aplicados los tratamientos (Cuadro 1) con un aspersor manual (RL FLO MASTER) con capacidad de

Table 1. Products evaluated for the control of *P. capsici* in pipiana pumpkin (*C. argyrosperma*).**Cuadro 1. Productos evaluados para el control de *P. capsici* en calabaza pipiana (*C. argyrosperma*).**

Treatment / Tratamiento	Active ingredient / Ingrediente activo	Dose per liter / Dosis por litro
<i>Trichoderma</i> strain CSAEGro / <i>Trichoderma</i> cepa CSAEGro	<i>Trichoderma asperellum</i>	1×10 ⁸ CFU·mL ⁻¹ / 1×10 ⁸ UFC·mL ⁻¹
PHC® Biopak-F®	<i>Bacillus</i> spp., <i>Streptomyces</i> spp., <i>Trichoderma</i> spp.	3 g
PHC® Root Mate®	<i>Trichoderma virens</i> strain G-41 / <i>Trichoderma virens</i> cepa G-41	3 g
Q 2000	Free iodine / Yodo libre	5 mL
Previcur® Energy	propamocarb + fosetyl / propamocarb + fosetil	6 mL
Ridomil Gold® Bravo SC	metalaxyl + chlorothalonil / metalaxil + clorotalonil	6 mL
Control / Testigo	Without application / Sin aplicación	--

CFU = Colony Forming Units

UFC = Unidades formadoras de colonias

Experimental design and data analysis

A completely randomized design with four replications was used. The experimental unit consisted of four fruits; due to the characteristics of the experiment, the entire unit was considered as useful plot. An analysis of variance was performed with the data obtained from the study variable. Similarly, a multiple comparison test was performed using the Tukey method with a significance level of 1 %, and orthogonal contrasts were used to compare the chemical vs. biological treatment groups. Statistical analyzes were performed using the SAS statistical package (Statistical Analysis System [SAS], 2009).

Results and discussion

Morphological identification

The original isolate colonies showed white, cottony mycelial growth with unipapillate and bipapillate sporangia from 20-50 × 15 -42.5 µm, and papilla from 6.02-7.05 µm wide. The morphological characteristics observed are consistent with those described by Singleton et al. (1992), Wantanabe (2002) and Gallegly and Hong (2008) for *P. capsici* (Figura 1).

2 litros; asperjando sobre la superficie de los frutos con un gasto de agua de 300 litros·ha⁻¹. Se dejó transcurrir 5 horas para permitir la reentrada de los productos; transcurrido el tiempo se asperjó 2.5 mL de la concentración ajustada del patógeno.

Variable evaluada

La variable evaluada fue días a la presencia del patógeno; la cual se consideró determinando en cuántos días, después de aplicar los tratamientos e inoculación del patógeno, iniciaba la aparición de colonias sobre las muestras de 0.5 cm² sobre los frutos de calabaza.

Diseño experimental y análisis de datos

Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. La unidad experimental estuvo constituida por cuatro frutos; por las características del experimento se consideró a toda la unidad como parcela útil. A los datos obtenidos de la variable de estudio se les realizó un análisis de varianza. De igual forma, se efectuó una prueba de comparación múltiple de medias utilizando el método Tukey con nivel de significancia al 1 %, y contrastes ortogonales para comparar el grupo de tratamientos químicos

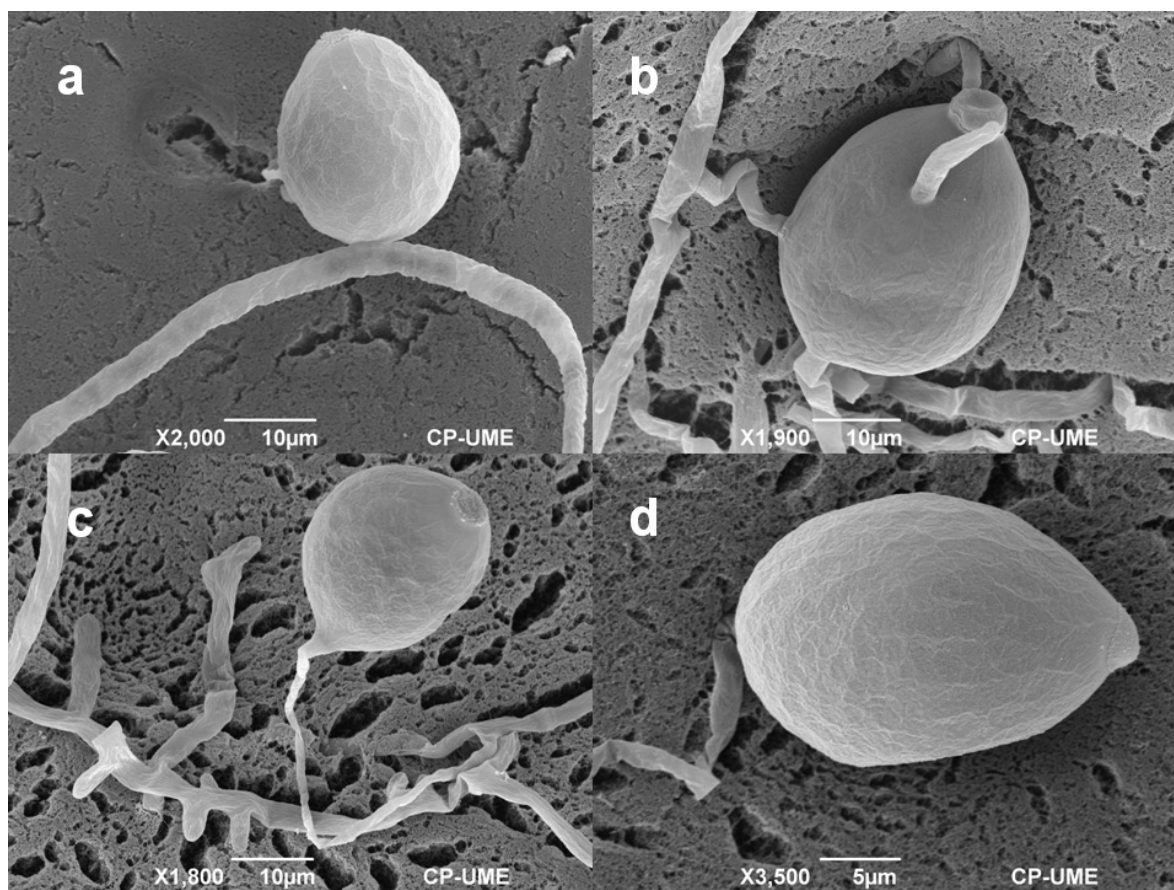


Figure 1. Typical morphological characteristics of *P. capsici*. a) Sporangium and smooth mycelium, b) papillate sporangium and smooth mycelium, c) torulose mycelium and papillate sporangium d) papillate sporangium.

Figura 1. Características morfológicas típicas de *P. capsici*. a) Esporangio y micelio liso, b) esporangio papilado y micelio liso, c) micelio toruloso y esporangio papilado y d) esporangio papilado.

Pathogenicity test

All inoculated fruits showed symptoms of sunken watery rot, abundant white mycelium typical of the oomycete and sunken, brownish-gray to brown watery lesions (Figure 2A), whereas the control fruits showed no signs of rot (Figure 2B).

Molecular identification

The ITS-PCR products were bands of 779 bp (base pairs). The two directions sequenced per isolate had 99 % similarity. The sequence of the isolate identified by morphology was aligned with two sequences of the same species in the NCBI GenBank, and the alignment was with the highest identity value. The obtained sequence was deposited in GenBank and the access number KJ652220 was obtained.

Evaluation of chemical and biological control

The presence of the pathogen in fruits is an important characteristic; since once it is identified in tender

contra el grupo de tratamientos biológicos. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System [SAS], 2009).

Resultados y discusión

Identificación morfológica

Las colonias del aislamiento original mostraron crecimiento micelial blanco algodonoso con esporangios de $20-50 \times 15-42.5 \mu\text{m}$ unipapilados y bipapilados, y papila de 6.02 a 7.05 μm de ancho. Las características morfológicas observadas concuerdan con las descritas por Singleton et al. (1992), Wantanabe (2002) y Gallegly y Hong (2008) para *P. capsici* (Figura 1).

Prueba de patogenicidad

Todos los frutos inoculados mostraron síntomas de pudrición acuosa hundida, abundante micelio color blanco típico del oomicete y lesiones acuosas hundidas de color pardo a marrón (Figura 2A). Mientras que los frutos control no presentaron síntomas de pudrición (Figura 2B).

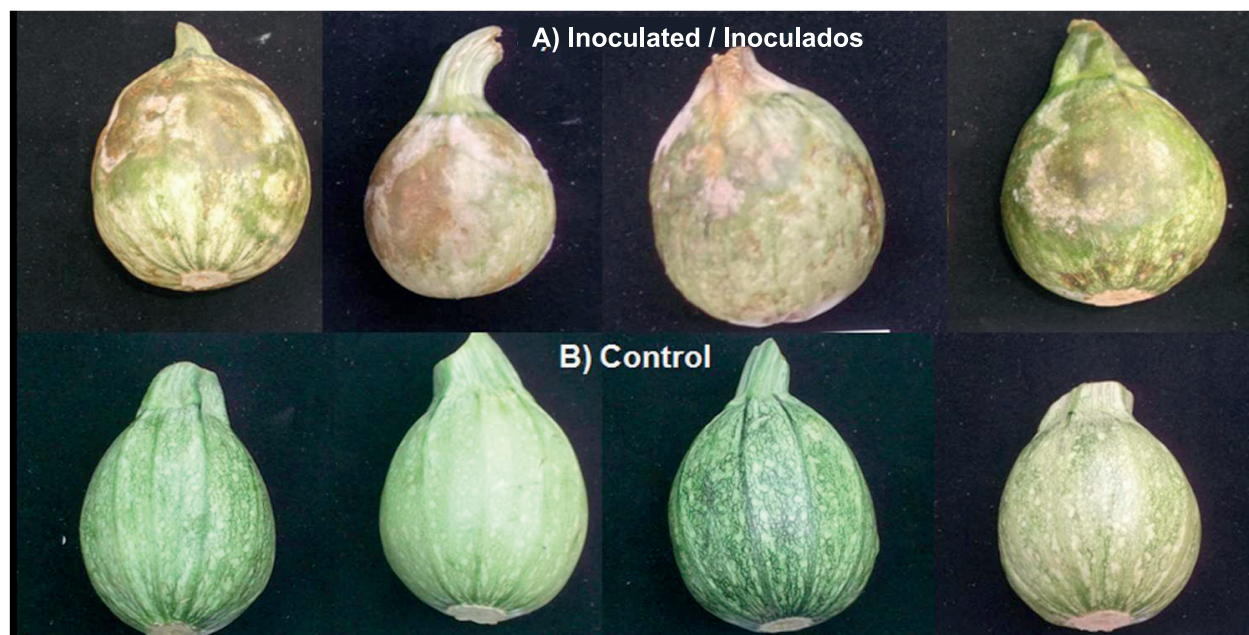


Figure 2. Symptoms induced by inoculation of *P. capsici* in pumpkin fruits. A) Sunken watery rot with white mycelial growth and sunken, brownish-gray to brown watery lesions and B) disease-free control fruits.
Figura 2. Sintomatología inducida por la inoculación de *P. capsici* en frutos de calabaza. A) Podredumbre acuosa hundida con crecimiento de micelio blanco y lesiones acuosas hundidas de color pardo a marrón y B) frutos control libres de la enfermedad.

fruits, they are completely damaged and lost, affecting the crop's most valuable product: the seeds (Trigos, Ramírez, & Salinas, 2008; Díaz-Nájera, 2013). This variable showed highly significant differences ($P < 0.0001$), since in the mean comparisons the active ingredients, propamocarb + fosetyl and metalaxyl + chlorothalonil, delayed the appearance of *P. capsici* to the sixth day, while the control differed from all the treatments as the pathogen appeared at 2.8 days after inoculation (Figure 3).

The inhibitory effect of the oomycete was due to the fact that the active ingredients used are specific to oomycetes. Propamocarb belongs to the carbamate group, and in oomycetes it affects lipids and membrane synthesis (FRAC, 2011). The phosphonate group includes fosetyl-Al, which is very selective to oomycetes in *in vivo* conditions. Fosetyl-Al causes effects in various metabolic sites in the mycelial phase of the pathogen's life cycle and inhibits sporulation at low concentrations (Erwin & Ribeiro, 2005). In this regard, Hu, Hong, Stromberg, and Moorman (2007) note that propamocarb and fosetyl-Al have good protective and curative action against oomycetes, which supports what was found in the present study. For their part, Reiter, Wenz, Buschhaus and Buchenauer (1995) state that the active ingredient propamocarb inhibits the formation of oospores in *P. infestans*. However, it is reported that fosetyl-Al has a high degree of systemic activity and efficacy that is generally superior against

Identificación molecular

Los productos de ITS-PCR fueron bandas de 779 pb (pares de bases). Las dos direcciones secuenciadas por aislamiento tuvieron 99 % de similaridad. La secuencia del aislamiento identificado por morfología se alineó con dos secuencias de esa misma especie en el banco de genes del NCBI, y la alineación fue con el más alto valor de identidad. La secuencia obtenida fue depositada en el banco de genes (GenBank) y se obtuvo el número de acceso KJ652220.

Evaluación de control químico y biológico

La presencia del patógeno en fruto es una característica importante; puesto que una vez identificada en frutos tiernos estos se dañan por completo y se pierden, afectando el producto de mayor valor del cultivo: las semillas (Trigos, Ramírez, & Salinas, 2008; Díaz-Nájera, 2013). Esta variable mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$); ya que en las comparaciones de medias los ingredientes activos, propamocarb + fosetil y metalaxil + clorotalonil, retardaron la aparición de *P. capsici* al día seis, mientras que el testigo se diferenció de todos los tratamientos apareciendo el patógeno a los 2.8 días después de la inoculación (Figura 3).

El efecto inhibitorio del oomicete se debió a que los ingredientes activos usados son específicos para

oomycetes, exerting good control (Gent, Ocamb, & Farnsworth, 2010).

The phenylamide group includes metalaxyl, which in oomycetes affects the synthesis of nucleic acids; therefore, its control begins when the mycelium starts growing (FRAC, 2011); However, despite being a very effective fungicide, it has a high risk of developing resistance due to its specific and unique mode of action (Elliott, Shamoun, & Grace, 2015); it is recommended to use it in a mixture with contact fungicides such as chlorothalonil whose multi-site effect makes it effective against pathogens such as oomycetes, and it also has a lower risk of resistance (FRAC, 2011; Elliott et al., 2015).

There are reports that metalaxyl has reduced the progress of diseases caused by oomycetes (Álvarez-Romero, García-Velasco, Mora-Herrera, González-Díaz, & Salgado-Siclán, 2013), since it is effective at all stages of the pathogen's life cycle (Qi, Wang, Zhao, Li, Ding, & Gao, 2012). Studies have shown that metalaxyl is efficient in reducing infection by *P. capsici* (Fernández-Herrera, Acosta-Ramos, & Pinto, 2007). The multi-site fungicide chlorothalonil proved to be one of the most effective treatments within the range evaluated in a mixture with metalaxyl, which was

oomycetes. El propamocarb pertenece al grupo de los carbamatos, en oomycetes afecta los lípidos y síntesis de la membrana (FRAC, 2011). Dentro del grupo de los fosfanatos se encuentra el fosetil-Al; el cual es muy selectivo a oomycetes en condiciones *in vivo* Fosetil-Al causa efectos en varios sitios metabólicos en la fase micelial del ciclo de vida del patógeno e inhibe la esporulación a bajas concentraciones (Erwin & Ribeiro, 2005). Al respecto Hu, Hong, Stromberg, y Moorman (2007) señalan que el propamocarb y fosetil-Al tienen buena acción protectora y curativa contra oomycetos; siendo esto un respaldo para lo encontrado en la presente investigación. Por su parte, Reiter, Wenz, Buschhaus, y Buchenauer (1995) citan que el ingrediente activo propamocarb inhibe la formación de oosporas en *P. infestans*. Sin embargo, se reporta que el fosetil-Al tiene alto grado de actividad sistémica y eficacia generalmente superior contra oomycetos, ejerciendo un buen control (Gent, Ocamb, & Farnsworth, 2010).

Dentro del grupo de las fenilamidas se encuentra el metalaxyl, que en oomycetos afecta la síntesis de ácidos nucleicos, por lo tanto, su control ocurre cuando inicia el crecimiento del micelio (FRAC, 2011); sin embargo, aun siendo un fungicida muy eficaz tiene un riesgo

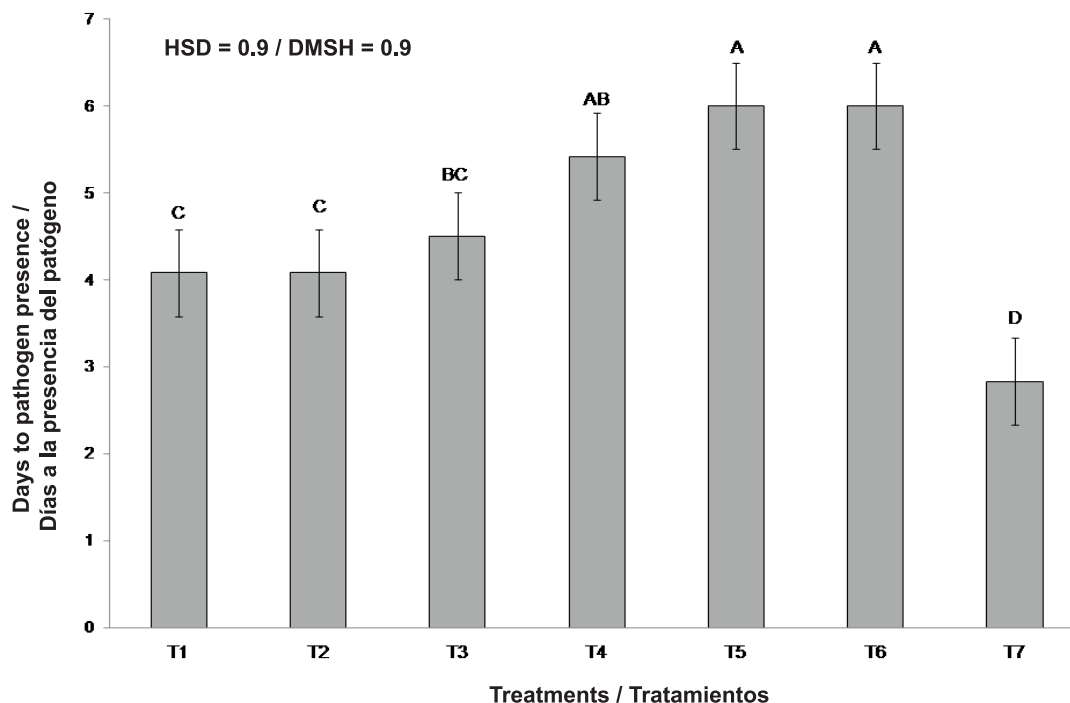


Figure 3. Days to the presence of *P. capsici* per treatment. HSD: Honest significant difference. T1: *Trichoderma* strain CSAEGro; T2: PHC® Biopak-F®; T3: PHC® RootMate®; T4: Q 2000; T5: Previcur® Energy; T6: Ridomil Gold® Bravo SC; T7: Control.

Figura 3. Días a la presencia de *P. capsici* por tratamiento. DMSH: diferencia mínima significativa honesta. T1: *Trichoderma* cepa CSAEGro; T2: PHC® Biopak-F®; T3: PHC® RootMate®; T4: Q 2000; T5: Previcur® Energy; T6: Ridomil Gold® Bravo SC; T7: Testigo.

due to it being a compound with multi-site action on oomycetes, as reported by Gisi and Sierotzki (2008). Amrutha, Eswara-Reddy, Bhasakara-Reddy, and Prasanthi (2014) point out that the key factors contributing to the antagonistic effect of *Trichoderma* are its rapid growth, production of antimicrobial metabolites and physiological characteristics (El-Katatny & Emam, 2012).

The result obtained with *T. virens* strain G-41 agrees with that reported by different authors (Harman et al., 2010; El-Katatny & Emam, 2012) who mention the biocontrol capabilities of the genus *Trichoderma*. In general, *Trichoderma* spp. has been extensively studied as a biocontrol agent of many plant pathogens. Osorio-Hernández, Hernández-Castillo, Gallegos-Morales, Rodríguez-Herrera, and Castillo-Reyes (2011) reported a suppressor and inhibitory effect of *Trichoderma* spp. against *P. capsici*.

The product PHC® Biopak-F® has the advantage of containing various biocontrol agents, including *Streptomyces*, which, during sporulation, produce extracellular hydrolytic enzymes and antibiotics such as secondary metabolites (Elleuch et al., 2010), and in interaction with fungal pathogens they are generally related to the production of enzymes such as cellulases, hemicellulases, chitinases, amylase and betaglucanases that degrade the cell wall (Chater, Biro, Lee, Palmer, & Schrempf, 2010).

There is reported evidence that microorganisms such as *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* and *Trichoderma* spp., included in the product PHC® Biopak-F® individually and in combination, are very promising biocontrol agents in the management of soil-borne pathogens (Köberl et al., 2013). Different authors report good control in soil-borne pathogens similar to those of this research, such as *P. capsici* (Lim & Kim, 2010).

The fundamental purpose of all agricultural activity is the optimal use of available resources, thereby maximizing profitability; for this reason, it is important to carry out economic analyses to determine the feasibility of treatments applied to this crop. The benefit-cost ratio of applying chemical and biological fungicides has been studied by Díaz-Nájera (2013), who reports earnings per peso invested ranging from \$ 0.02 MXN to \$ 0.39 MXN, obtaining the greatest profit with the native strain CSAEGro *T. asperellum*. The consequences of possible residuality in the seeds have not been studied; however, it may be ignored because the applications are made preventively at the beginning of fructification (40-45 days after sowing) and the fruits are harvested once they reach physiological maturity (uniform yellow color) at 120 days after sowing, when 75-80 days have already elapsed since application (Díaz-Nájera, 2013).

elevado de desarrollo de resistencia debido a su específico y único modo de acción (Elliott, Shamoun, & Grace, 2015), y se recomienda utilizarlo en mezcla con fungicidas de contacto como el clorotalonil cuyo efecto multi-sitio lo hace efectivo contra patógenos como oomicetes, además tienen un menor riesgo de resistencia (FRAC, 2011; Elliott et al., 2015).

Existen reportes de que el metalaxil ha reducido el progreso de enfermedades ocasionadas por oomicetos (Álvarez-Romero, García-Velasco, Mora-Herrera, González-Díaz, & Salgado-Siclán, 2013), dado que es eficaz en todas las etapas del ciclo de vida del patógeno (Qi, Wang, Zhao, Li, Ding, & Gao, 2012). Estudios han demostrado que el metalaxil es eficiente en la reducción de la infección por *P. capsici* (Fernández-Herrera, Acosta-Ramos, & Pinto, 2007). El fungicida multi-sitio clorotalonil resultó ser uno de los tratamientos más efectivos dentro de la gama evaluada en mezcla con metalaxil; lo cual se debió a que es un compuesto con acción multi-sitio sobre oomicetos, como lo reportan Gisi y Sierotzki (2008).

Amrutha, Eswara-Reddy, Bhasakara-Reddy, y Prasanthi (2014) señalan que los factores clave que contribuyen al efecto antagónico de *Trichoderma* son su rápido crecimiento, producción de metabolitos antimicrobianos y características fisiológicas (El-Katatny & Emam, 2012).

El resultado obtenido con *T. virens* cepa G-41 concuerda con lo reportado por diferentes autores (Harman et al., 2010; El-Katatny & Emam, 2012) quienes mencionan las capacidades biocontroladoras del género *Trichoderma*. En general, *Trichoderma* spp. ha sido ampliamente estudiado como agente biocontrolador de muchos patógenos de las plantas. Osorio-Hernández, Hernández-Castillo, Gallegos-Morales, Rodríguez-Herrera, y Castillo-Reyes (2011) reportaron un efecto supresor e inhibitorio de *Trichoderma* spp. contra *P. capsici*.

El producto PHC® Biopak-F® tiene la ventaja de contener varios agentes biocontroladores, entre ellos *Streptomyces*; el cual, durante la esporulación, produce enzimas hidrolíticas extracelulares y antibióticos como metabolitos secundarios (Elleuch et al., 2010), y en interacción con patógenos fúngicos se relacionan generalmente con la producción de enzimas como celulastas, hemicelulasas, quitinasas, amilasa y betaglucanasas que degradan la pared celular (Chater, Biro, Lee, Palmer, & Schrempf, 2010).

Existe evidencia reportada de que los microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Streptomyces* y *Trichoderma* spp., incluidos en el producto PHC® Biopak-F® en forma individual y en combinación, son agentes de biocontrol muy prometedores en el manejo de patógenos habitantes del suelo (Köberl et al., 2013). Diferentes

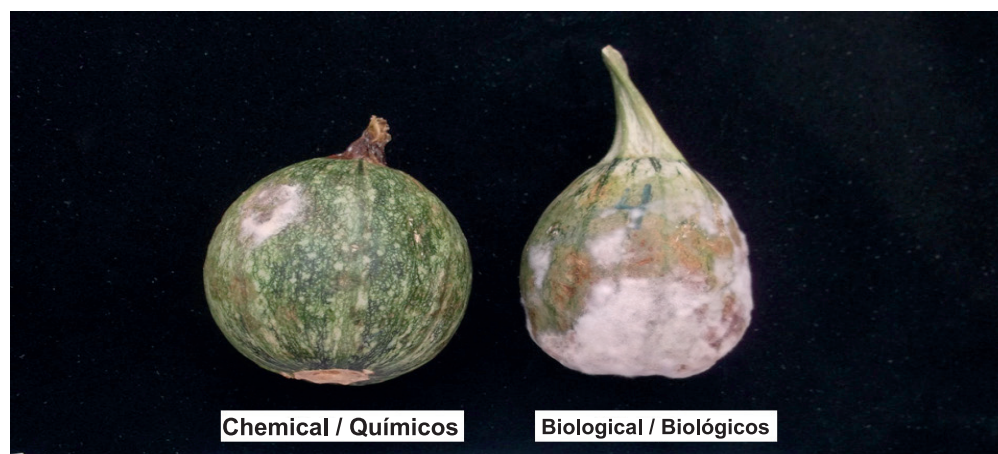


Figure 4. Comparison of the chemical and biological fungicide groups in the appearance of *P. capsici*.
Figura 4. Comparación del grupo de fungicidas químicos vs. biológicos en la aparición de *P. capsici*.

Orthogonal contrast test

This test indicated that there are highly significant differences ($P < 0.0001$) between the biological and chemical products. The biological treatment group delayed the appearance of *P. capsici* by an average of 4.22 days, while the chemical treatment group delayed it by an average by 5.80 days; the chemical group, therefore, was better because it delayed the pathogen's appearance by an additional 1.58 days (Figure 4).

Conclusions

Morphological and molecular identification, plus pathogenicity tests, confirmed that the causal agent of rot in pipiana pumpkin fruits was *P. capsici*.

The fungicides propamocarb + fosetyl-Al and metalaxyl + chlorothalonil delayed the presence of the oomycete by six days, whereas the biological control agents delayed it by about four days.

End of English version

References / Referencias

- Álvarez-Romero, P. I., García-Velasco, R., Mora-Herrera, M. E., González-Díaz, J. G., & Salgado-Siclán, M. L. (2013). Estado actual de *Peronospora sparsa*, causante del Mildiu Velloso en rosa (*Rosa* sp.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2), 113-125. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61231509004>
- Amrutha, V. G., Eswara-Reddy, N. P., Bhasakara-Reddy, B. V., & Prasanthi, L. (2014). Potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against *Rhizoctonia bataticola*

autores reportan buen control en patógenos habitantes del suelo similares a los de esta investigación, como *P. capsici* (Lim & Kim, 2010).

La finalidad fundamental de toda actividad agrícola es el aprovechamiento óptimo de los recursos disponibles, maximizando la rentabilidad y la obtención de beneficios; por esto, es importante efectuar análisis económicos para conocer la viabilidad de los tratamientos aplicados en este cultivo. La relación beneficio-costeo de la aplicación de fungicidas químicos y biológicos ha sido estudiada por Díaz-Nájera (2013) y reporta ganancias por peso invertido que van desde \$0.02 MXN a \$0.39 MXN, obteniendo la mayor utilidad con la cepa nativa CSAEGro *T. asperellum*.

Las consecuencias de una posible residualidad en las semillas no han sido estudiadas; aunque pueden ser ignoradas debido a que las aplicaciones se realizaron de forma preventiva a inicio de la fructificación (40-45 días después de la siembra [dds]), y la cosecha de frutos se llevó a cabo una vez que estos alcanzaron la madurez fisiológica (color amarillo uniforme). A los 120 dds; momento en el que ya habían transcurrido 80 días desde la aplicación (Díaz-Nájera, 2013).

Prueba de contrastes ortogonales

Esta prueba indicó que la comparación entre productos biológicos contra los químicos resultó con diferencias altamente significativas ($P < 0.0001$). El grupo de tratamientos biológicos en promedio retardó en 4.22 días la aparición de *P. capsici*, mientras que el grupo de tratamientos químicos la atrasó en promedio 5.80 días; resultando mejor estos últimos con diferencia en la aparición del patógeno de 1.58 días (Figura 4).

causing dry root rot of chickpea. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 4(1), 78-81. Recuperado de http://www.ijpaes.com/admin/php/uploads/428_pdf.pdf

- Anónimo (2012). DNeasy Plant Mini Kit®. Qiagen. Alemania. 55p.
- Antonopoulos, D. F., Melton, T., & Mila, A. L. (2010). Effects of chemical control, cultivar resistance, and structure of cultivar root system on black shank incidence of tobacco. *Plant Disease Journal*, 94(5), 613-620. doi: 10.1094/PDIS-94-5-0613
- Ayvar-Serna, S., Mena-Bahena, A., Durán-Ramírez, J. A., Cruzaley-Sarabia, R., & Gómez-Montiel, N. O. (2007). La calabaza pipiana y su manejo integrado. Folleto técnico. Fundación Produce de Guerrero, A. C. Campo Experimental Iguala. CSAEGro. Iguala, Gro. México. 26p.
- Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., & Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*, 58(7), 649-662. doi: 10.1002/ps.520
- Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M. K., & Hao, J. J. (2012). Inhibitory effects of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. *Plant Disease Journal*, 96(6), 797-803. doi: 10.1094/PDIS-11-11-0933
- Chater, K. F., Biro, S., Lee, K. J., Palmer, T., & Schrempf, H. (2010). The complex extracellular biology of *Streptomyces*. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews*, 34(2), 171-98. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00206.x
- Cohen, R., Burger, Y., Horev, C., Koren, A., & Edelstein, M. (2007). Introducing grafted cucubits to modern agriculture: The Israel experience. *Plant Disease Journal*, 91(8), 916-923. doi: 10.1094/PDIS-91-8-0916
- Díaz-Nájera, J. F. (2013). Etiología y manejo de hongos causantes de la pudrición de frutos en calabaza pipiana (*Cucurbita argyrosperma* Huber). Tesis de Maestría en Ciencias en Protección Vegetal. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 187 p.
- El-Katatny, M. H., & Emam, A. S. (2012). Control of postharvest tomato rot by spore suspension and antifungal metabolites of *Trichoderma harzianum*. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 1(6), 1505-1528.
- Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli, L., Karray-Rebai, I., Fourati-Ben Fguira L., Shaaban, K. A., & Laatsch, H. (2010). Bioactive secondary metabolites from a new terrestrial *Streptomyces* sp. TN262. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(2), 579-93. doi: 10.1007/s12010-009-8808-4
- Erwin, D. C., & Ribeiro O. K. (2005). *Phytophthora Diseases Worldwide*. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Fernández-Herrera, E., Acosta-Ramos, M., & Pinto, V. M. (2007). Efecto de aplicaciones de fungicidas sobre la incidencia de la marchitez (*Phytophthora capsici* Leo.) del jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 25(2), 186-189. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61225214>
- Fernández-Herrera, E., Guerrero-Ruiz, J. C., Rueda-Puente, E. O., & Acosta-Ramos, M. (2013). Patógenos y

Conclusiones

La identificación morfológica y molecular, así como la prueba de patogenicidad confirmaron que el agente causal de la pudrición de frutos de calabaza pipiana fue *P. capsici*.

Los fungicidas propamocarb + fosetil-Al y metalaxil + clorotalonil retrasaron la presencia del oomicete seis días; los agentes de control biológico la retardaron alrededor de cuatro días.

Fin de la version en español

síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Biotecnia*, 15(3), 46-50. Recuperado de <http://www.biotecnia.uson.mx/revistas/articulos/24-Articulo%207.pdf>

- FRAC (2011). FRAC Code List: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). Article published online: February. Recuperado de <http://www.frac.info/frac/publication/anhang/FRAC%20Code%20List%202011-final.pdf>.
- Gallegly, M., & Hong, C. (2008). *Phytophthora: Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints*. APS Press, St. Paul, MN.
- Gent, D. H., Ocam, C. M., & Farnsworth, J. L. (2010). Forecasting and management of hop downy mildew. *Plant Disease Journal*, 94, 425-431. doi: 10.1094/PDIS-94-4-0425
- Gisi, U., & Sierotzki, H. (2008). Fungicide modes of action and resistance in downy mildews. *European Journal of Plant Pathology*, 122(1), 157-167. doi: 10.1007/s10658-008-9290-5
- Harman, G. E., Obregón, M. A., Samuels, G. J., & Lorito, M. (2010). Changing models for commercialization and implementation of biocontrol in the developing and the developed world. *Plant Disease Journal*, 94(8), 928-939. doi: 10.1094/PDIS-94-8-0928
- Hu, J., Hong, C., Stromberg, E. L., & Moorman, G. W. (2007). Effects of propamocarb hydrochloride on mycelial growth, sporulation, and infection by *Phytophthora nicotianae* isolates from Virginia nurseries. *Plant Disease Journal*, 91(4), 414-420.
- Köberl, M., Ramadan, E. M., Adam, M., Cardinale, M., Hallmann, J., Heuer, H., Smalla, K., & Berg, G. (2013). *Bacillus* and *Streptomyces* were selected as broad-spectrum antagonists against soil borne pathogens from arid areas in Egypt. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS). Microbiology Letters*, 342(2), 168-78. doi: 10.1111/1574-6968.12089
- Lim, J. H., & Kim, S. D. (2010). Biocontrol of *Phytophthora* blight of red pepper caused by *Phytophthora capsici* using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 formulations. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(6), 766-773. doi: 10.3839/jksabc.2010.116

- Osorio-Hernández, E., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., Rodríguez-Herrera, R., & Castillo-Reyes, F. (2011). In-vitro behavior of *Trichoderma* spp. against *Phytophthora capsici* Leonian. *African Journal of Agricultural Research*, 6(19), 4594-4600. doi: 10.5897/AJAR11.1094
- Pedroza-Sandoval, A. (2009). Monitoreo y escalas visuales en la evaluación de las enfermedades. In: *Tópicos Selectos de Estadística Aplicados a la Fitosanidad*. Bautista M.N., Soto R.L., Pérez P.R. (eds.). Colegio de Postgraduados. IPN CIIDIR-Oaxaca. Montecillo, Texcoco Edo. De México. 256 p.
- Pliego, C., Ramos, C., Vicente, A., & Cazorla, F. M. (2011). Screening for candidate bacterial biocontrol agents against soil borne fungal plant pathogens. *Plant and Soil*, 340(1), 505-520. doi: 10.1007/s11104-010-0615-8
- Qi, R., Wang, T., Zhao, W., Li, P., Ding, J., & Gao, Z. (2012). Activity of ten fungicides against *Phytophthora capsici* isolates resistant to metalaxyl. *Journal of Phytopathology*, 160(11-12), 717-722. doi: 10.1111/jph.12009
- Reiter, B., Wenz, M., Buschhaus, H., & Buchenauer, H. (1995). Zur Wirkung von propamocarb-hydrochlorid auf *Phytophthora infestans* in vitro und an kartoffeln und tomaten. *Gesunde Pflanzen*, 47(2), 43-50.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). (2009). SAS Inc. SAS user's guide: Statistics. Release 6.03. Ed. SAS Institute in corporation, Cary, N.C. USA: Author.
- Singlenton, L. L., Mihail, J. D., & Rush, C. M. (1992). Methods for Research on Soil Borne Phytopathogenic Fungi. APS Press. St. Paul, Minnesota, USA. 264p.
- Trigos, A., Ramírez, K., & Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología*, 28, 125-129. Recuperado de http://revistamexicanademicrologia.org/wp-content/uploads/2009/10/RMM_2009_28_125-129.pdf
- Wantanabe, T. (2002). Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi. Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species. Second edition. CRC Press. New York Washington, D.C. 500 p.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenies. In: M.A. Innes, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, And T.J. White (eds.). PCR Protocols. Pp.315-322. Academic Press. San Diego, CA.
- Yang, M. M., Xu, L. P., Xue, Q. Y., Yang, J. H., Xu, Q., Liu, H. X., & Guo, J. H. (2012). Screening potential bacterial biocontrol agents towards *Phytophthora capsici* in pepper. *European Journal of Plant Pathology*, 134(4), 811-820. doi: 10.1007/s10658-012-0057-7
- Zitter, T. A., Hopkins, D. L., & Thomas, C. E. (2004). Plagas y Enfermedades de las Cucurbitáceas. The American Phytopathological Society. Ediciones Mundi Prens. 88 p.