

## Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* (Kuhn) de Chile en México\*

### Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* isolates (Kuhn) from pepper in Mexico

Víctor Montero-Tavera<sup>1</sup>, Brenda Zulema Guerrero-Aguilar<sup>1</sup>, José Luis Anaya-López<sup>1</sup>, Talina Olivia Martínez-Martínez<sup>1</sup>, Guevara-Olvera Lorenzo<sup>2</sup> y Mario Martín González-Chavira<sup>1§</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Carretera Celaya-San Miguel de Allende, km 6.5 Celaya, Guanajuato, México. C. P. 38110. Tel: (461) 6115323 Ext. 104. <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya. Ave. Tecnológico y A. García-Cubas, S/N, Col. FOVISSSTE. Celaya, Guanajuato, México. <sup>§</sup>Autor de correspondencia: gonzalez.mario@inifap.gob.mx.

#### Resumen

Una de las principales limitantes para la producción de Chile son los hongos patógenos causantes de la enfermedad conocida como “marchitez del Chile” o “secadera”. Esta enfermedad puede ser devastadora cuando las condiciones climáticas son favorables para el patógeno. A pesar de que se han intentado diferentes medios de control (químicos y culturales) ninguno ha tenido éxito. Una alternativa para su control es producir germoplasma resistente, sin embargo para poder establecer un programa de mejoramiento efectivo es necesario conocer la distribución y diversidad genética de los patógenos involucrados, particularmente de *Rhizoctonia solani*, que por su ubicuidad representa un peligro potencial en todas las zonas productoras. Por ello el objetivo fue caracterizar a *R. solani* en las zonas Centro Norte de México y determinar su diversidad genética. Para cumplir con este objetivo se consideraron los estados de Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Colima, Querétaro y Guanajuato donde en 2009 se colectaron plantas adultas de Chile con síntomas de marchitez, se aisló al hongo y se encontró una incidencia del 33%, encontrándose tanto en tallo como en raíz. Las células miceliales fueron multinucleadas, características de las cepas patogénicas. Las pruebas de anastomosis demostraron la presencia en México de los grupos GA4, GA-2.1, GA-IIB, GA-2IV, GA7, GA11,

#### Abstract

One of the major constraints for the production of pepper are pathogenic fungi causing diseases known as "pepper blight" or "damping off". This disease can be devastating when weather conditions are favorable for the pathogen. Although different means of control (chemical and cultural) have been used but none has been successful. An alternative to control is to produce resistant germplasm, however in order to establish an effective breeding program is necessary to know the distribution and genetic diversity of the pathogens involved, particularly *Rhizoctonia solani*, which by its ubiquity represents a potential danger in all producing areas. Thus, the objective was to characterize *R. solani* in North Central area from Mexico and determine its genetic diversity. To achieve with this goal are considered the states of Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Colima, Querétaro and Guanajuato where in 2009 were collected adult plants of pepper with pepper blight symptoms, the fungus was isolated and found an incidence of 33%, finding it in both stem and root. Mycelial cells were multinucleated, a characteristic from pathogenic strains. The anastomosis testing showed that in Mexico are present the groups GA4, GA-2.1, GA-IIB, GA-2IV, GA7, GA11, GA12 and GA13. The genetic diversity of this fungus was very high, so that

\* Recibido: noviembre de 2012  
Aceptado: julio de 2013

GA12 y GA13. La diversidad genética de este hongo fue muy alta, de tal manera que las relaciones demostradas por la construcción de dendrogramas no muestran tendencias homogéneas pues los principales grupos formados contienen elementos de todos los estados.

**Palabras clave:** *Rhizoctonia solani*, AFLP, variabilidad genética, grupos de anastomosis.

## Introducción

El chile es uno de los cultivos de mayor importancia económica en México, en el año 2012 su producción generó más de \$13 000 millones de pesos. Los principales estados productores son Zacatecas, Chihuahua, Sinaloa, San Luis Potosí, Durango, Veracruz, Jalisco, Guanajuato, Chiapas y Sonora (SIAP, 2012).

En México, la producción de chile se afecta por diversos factores, entre los que destacan las enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias, virus y nemátodos (Guigón-López y González-González, 2001). Sin embargo, las enfermedades fungosas han sido la principal causa de pérdidas económicas (Sneh *et al.*, 1996; Krechel *et al.*, 2002). Los patógenos de mayor incidencia en chile son *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Pythium* spp. (Silva-Rojas *et al.*, 2009), los cuales están asociados al síndrome de la tristeza o marchitez del chile, enfermedad que puede causar la muerte prematura de las plantas y ocasionar pérdidas en la producción entre 10% y 60%, aunque en el Bajío y Puebla se han reportado pérdidas totales (Pérez-Moreno *et al.*, 2003).

La capacidad de infección de *Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorfo *Thanatephorus cucumeris*) está determinada por las condiciones de temperatura y humedad (González-Hernández, 2002), y es uno de los hongos fitopatógeno de mayor incidencia en el cultivo del chile (Velásquez y Victoriano, 2007), aunque también puede infectar a un extenso grupo de plantas de diferentes especies de importancia económica (Gour, 2012) en las que produce lesiones oscuras en raíces y semillas, pudrición de tallos y de las partes de la planta que están en contacto con el suelo (González-García, 2008).

La clasificación de *R. solani* ha sido compleja, por lo que se han propuesto diversos criterios. Algunos de los más utilizados son la determinación de los grupos de anastomosis (GA) al que pertenecen los aislados, y el grado de interacción

the relationships demonstrated by the construction of dendrogram show no homogeneous trends so as the main groups formed contain elements of all states.

**Keywords:** *Rhizoctonia solani*, AFLP, genetic variability, anastomosis groups.

## Introduction

Pepper is one of the most economically important crops in Mexico; in 2012 its production generated more than \$ 13 000 million pesos. The main producing states are Zacatecas, Chihuahua, Sinaloa, San Luis Potosí, Durango, Veracruz, Jalisco, Guanajuato, Chiapas and Sonora (SIAP, 2012).

In Mexico, pepper production is affected by various factors, among which are diseases caused by fungi, bacteria, viruses and nematodes (Guigon-López and González-González, 2001). However, fungal diseases have been the major cause of economic loss (Sneh *et al.* 1996; Krechel *et al.*, 2002). The higher incidence pathogens in pepper are *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* and *Pythium* spp. (Silva-Rojas *et al.*, 2009), which are associated with the syndrome of sadness or pepper blight, a disease that can cause premature death of plants and cause yield losses between 10% and 60%, although in the Bajío and Puebla total losses have been reported (Pérez-Moreno *et al.*, 2003).

The infectivity of *Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorph *Thanatephorus cucumeris*) is determined by temperature and humidity conditions (González-Hernández, 2002), and this, is one with the highest incidence in crops of pepper (Velásquez and Victoriano 2007), although it can also infect a large group of plants from different species of economic importance (Gour, 2012) in which produces dark lesions on roots and seeds, rot of stem and plant parts that are in contact with soil (González- García, 2008).

Classification of *R. solani* has been complex, so various approaches have been proposed. Some of the most used are determination of anastomosis groups (GA) to which the isolates belong, and the degree of interaction between hyphae. Regarding the anastomosis group *R. solani* is classified based on the compatibility of merger between hyphae. Thus, isolates of hyphae from equal GA merge,

entre las hifas. En relación a los grupos de anastomosis *R. solani* se ha clasificado con base en la compatibilidad de la fusión entre hifas. De esta manera, las hifas de aislamientos de GA iguales se fusionan, lo que sugiere la existencia de compatibilidad vegetativa, mientras que las de GA diferentes no presentan interacción (Boidin, 1998; González-García *et al.*, 2006).

De acuerdo a este criterio, *R. solani* se ha clasificado en 14 GA, del GA1 al GA13, que se anastomosan sólo con individuos del mismo grupo, y el GA-BI, que incluye aislados capaces de fusionarse entre ellos y con otros grupos (González-García *et al.*, 2006). A su vez los grupos GA1, GA2, GA4, GA6 y GA9 se dividen en subgrupos con base en caracteres morfológicos, patológicos, bioquímicos y moleculares (Liu y Sinclair, 1993; González-García *et al.*, 2006). Otra clasificación, basada en los cambios citológicos en la zona de anastomosis, propone las categorías adicionales C0, C1, C2 y C3 para describir el grado de interacción entre las hifas en las reacciones de anastomosis (MacNish *et al.*, 1993; Cubeta y Vilgalys, 1997). Algunos otros criterios para una clasificación más precisa de *R. solani* se basan en las secuencias de ADN.

La mayoría de las técnicas moleculares disponibles para establecer la diversidad genética se basan en la detección y tipificación de polimorfismo genómico en varios niveles. La diversidad genética, y la clasificación taxonómica de *R. solani* se ha establecido por múltiples técnicas moleculares como microsatélites amplificados al azar (RAMS-fingerprinting), polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) de la región del espaciador transcrito interno (ITS), secuencias de ADN ribosómico nuclear (rDNA) y beta-tubulina (Ceresini *et al.*, 2007), región del espaciador transcrito interno 5.8S (ITS-5.8S rDNA) (Çebi and Özkoc, 2013), repetidos de intersecuencias simples (ISSR) (Mirmajlessi *et al.*, 2012) y polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), basado en un sistema de marcadores dominantes que permiten el análisis simultáneo de un gran número de marcadores en el genoma, es altamente reproducible, tiene un costo moderado y se ha usado ampliamente para analizar diversidad y huellas genéticas en varias especies de hongos (Bensch and Akesson, 2005). Los AFLP se han usado para identificar diversidad genética entre poblaciones de *R. solani* asociadas a papa (Fiers *et al.*, 2011), *Vitis vinifera* (Meza-Moller *et al.*, 2011); frijol (López-Olmos *et al.*, 2005); y tomate (Taheri, 2011). Por ello el objetivo de este estudio fue identificar los grupos de anastomosis de *R. solani* involucrados en la marchitez del Chile en las principales regiones productoras de México y establecer la diversidad y relaciones genéticas entre aislados genéticamente puros de *Capsicum annuum* L.

suggesting the existence of vegetative compatibility, while different GA did not exhibit this interaction (Boidin, 1998, González-García *et al.*, 2006).

According to this criterion, *R. solani* has been classified into 14 GA, from GA1 to GA13, which anastomose only with individuals of the same group, and the GA-BI, which includes isolates able to merge with each other and with other groups (González-García *et al.*, 2006). Groups GA1, GA2, GA4, GA6 and GA9 are divided into subgroups based on morphological, pathological, biochemical and molecular characteristics (Liu and Sinclair, 1993, González-García *et al.*, 2006). Another classification, based on cytological changes in the anastomosis area, proposes the additional categories C0, C1, C2 and C3 to describe the degree of interaction between hyphae in anastomosis reactions (MacNish *et al.* 1993; Cubeta and Vilgalys, 1997). Some other criteria for a more precise classification of *R. solani* are based on the DNA sequences.

Most molecular techniques available to establish genetic diversity are based on the detection and characterization of genomic polymorphism on several levels. Genetic diversity and taxonomic classification of *R. solani* has been established by multiple molecular techniques such as random amplified microsatellite (RAMS-fingerprinting), restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the internal transcribed spacer region (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA (rDNA) and beta-tubulin (Ceresini *et al.*, 2007), region of the internal transcribed spacer 5.8S (ITS-5.8S rDNA) (Çebi and Özkoc, 2013), inter simple sequence repeats (ISSR) (Mirmajlessi *et al.*, 2012) and the amplified fragment length polymorphism (AFLP), based on a system of dominant markers that allows simultaneous analysis of a large number of markers in the genome, is highly reproducible, has a modest cost and has been widely used to analyze diversity and DNA fingerprints in several fungal species (Bensch and Akesson, 2005). AFLP have been used to identify genetic diversity among populations of *R. solani* associated with potato (Fiers *et al.*, 2011), *Vitis vinifera* (Meza-Moller *et al.*, 2011), bean (López-Olmos *et al.*, 2005) and tomato (Taheri, 2011). Therefore the objective of this study was to identify anastomosis groups of *R. solani* involved in pepper blight in the main producing regions of Mexico and establish the diversity and genetic relationships between isolates genetically pure of *Capsicum annuum* L.

## Materiales y métodos

### Aislamiento de *Rhizoctonia solani*

En 2008 se realizó una colecta de plantas de chile (*Capsicum annuum* L.) en 40 municipios de los estados de Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Chihuahua y Colima. Se seleccionaron parcelas que estuvieran separadas al menos 5 km entre sí, y se colectaron al azar de 3 a 5 plantas completas con síntomas característicos de marchitez.

Las raíces y tallos de las plantas con síntomas de marchitez se lavaron con agua corriente y se cortaron en fragmentos de 1 cm<sup>2</sup>. El tejido se desinfectó durante 1 min en hipoclorito de sodio al 3% y se sembró en medio agar papa dextrosa (PDA) acidificado (1 300 µL de ácido láctico por litro de medio). La incubación se realizó entre 19 y 25 °C durante 2 días. Los aislamientos se identificaron de acuerdo a sus características morfológicas (Sneh *et al.*, 1991), y se transfirieron nuevamente en PDA acidificado con la finalidad de obtener cultivos puros para la extracción de puntas de hifa. Los aislados se identificaron por parcela de colecta y por la estructura de la planta donde fue aislado (tallo y raíz).

### Cultivos puros

Los cultivos puros de *R. solani* se obtuvieron de la siembra de puntas de hifa. En cajas Petri esterilizadas se colocó un portaobjetos sobre el que se agregaron 6.5 ml de medio agar-agua al 2%. Una vez que solidificó el medio, se colocaron fragmentos de 5 mm de micelio del aislado de *R. solani* creciendo sobre PDA, y se incubó a temperatura ambiente (19-25 °C) durante 24 h. El nuevo micelio se separó de la caja y bajo el microscopio se seleccionó una hifa aislada, a la cual se le cortó la punta con un alfiler entomológico. Las puntas seleccionadas se transfirieron a placas con PDA acidificado y se incubaron a 25 °C durante 24 h. De la misma forma, se obtuvieron puntas de hifa jóvenes y se cuantificaron los núcleos de las células vegetativas hifales a través del método de tinción con safranina O (Bandoni, 1979).

### Reacciones de compatibilidad

Los grupos de anastomosis de los aislados de *R. solani* se determinaron mediante confrontaciones con cepas representativas de grupos de anastomosis internacionales (AGSI). En cajas Petri se colocaron portaobjetos y se

## Materials and methods

### Isolation of *Rhizoctonia solani*

In 2008, a collection of pepper plants (*Capsicum annuum* L.) was performed in 40 municipalities from the states of Guanajuato, Querétaro, San Luis Potosí, Zacatecas, Durango, Chihuahua and Colima. Plots were selected, which were separated at least 5 km from each other, and were collected randomly 3 to 5 plants with characteristic symptoms of wilt.

The roots and stems of plants with wilt symptoms were washed with tap water and cut into pieces of 1 cm<sup>2</sup>. The tissue was disinfected for 1 min in sodium hypochlorite 3% and planted on potato dextrose agar medium (PDA) acidified (1 300 µL lactic acid per liter of medium). Incubation was carried out between 19 and 25 °C for 2 days. Isolates were identified according to their morphological characteristics (Sneh *et al.*, 1991), and transferred again into acidified PDA in order to obtain pure cultures for extraction of hyphal tips. The isolates were identified per collected plot and the structure of the plant where it was isolated (stems and roots).

### Pure cultures

Pure cultures of *R. solani* were obtained from planting hyphal tips. In sterile Petri plates was placed a glass slide on which were added 6.5 ml of water-agar medium at 2%. Once solidified the medium were placed fragments of 5 mm from the isolated mycelium of *R. solani* growing on PDA, and incubated at room temperature (19-25 °C) for 24 h. The new mycelium was separated from the Petri plate and under the microscope isolated hyphae was selected, to which was cut off the tip with an insect pin. Selected tips were transferred to plates with acidified PDA and incubated at 25 °C for 24 h. In the same way, were obtained young hyphal tips and were quantified nucleus cell of vegetative hyphal by the staining method with Safranin O (Bandoni, 1979).

### Compatibility reactions

Anastomosis groups of *R. solani* isolates were determined by comparisons with representative strains from international anastomosis groups (AGSI). On petri dishes were placed slides and added 6.5 ml of water agar 2%. On this medium were placed fragments of 5 mm from mycelium isolates obtained from the field and representative strains and anastomosis groups at a distance of 2 cm, were also made



adicionaron 6.5 ml de agar agua 2%. Sobre este medio se colocaron fragmentos de 5 mm del micelio de los aislados obtenidos en campo y de las cepas representativas de grupos de anastomosis a una distancia de 2 cm, también se hicieron confrontaciones entre las hifas de aislados obtenidos en campo. Cada prueba se hizo por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente (19-25 °C). Para observar las reacciones de compatibilidad, se sacaron los portaobjetos de las placas y se hicieron tinciones con Azul de Tripano con Lactofenol al 0.1% y se examinaron bajo microscopio las reacciones de compatibilidad. Para la clasificación de la reacción de anastomosis se usaron las categorías propuestas por MacNish *et al.* (1993).

### Extracción de ADN

El ADN genómico total fue extraído de los cultivos genéticamente puros siguiendo la metodología para hongos filamentosos propuesta por Raeder y Broda (1985) con modificaciones menores. Se colectó y liofilizó el micelio de *R. solani* obtenido de la inoculación de 50 mL de caldo papa dextrosa (PDB, Difco) con cinco o seis cubos de 0.25 cm<sup>2</sup> de micelio creciendo sobre medio Agar Papa Dextrosa (PDA, Difco) durante 48-72 hrs a 28-25 °C. El micelio se molió y maceró con buffer de extracción (200 mM tris/HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS).

### Análisis AFLP

Se llevaron a cabo análisis de Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción siguiendo el protocolo de Vos *et al.* (1995) con ligeras modificaciones. El ADN genómico se digirió con 5U de *EcoRI* y *MseI* (Roche®) a 37°C durante 3h. Las muestras digeridas se incubaron a 70 °C durante 15 min para desactivar las enzimas de restricción. Los adaptadores *EcoRI* (5 pmol) y *MseI* (50 pmol) se ligaron a los fragmentos de ADN cortados en amortiguador de ligación (1X T4 ADN ligasa) y 1U de T4 ADN ligasa y se incubaron a 37 °C toda la noche. La amplificación selectiva se hizo usando seis combinaciones de iniciadores (E-ACA + M-GTA; E-ACG + M-GTA; E-ACA + M-GGT; E-AGA + M-GGT; E-AAC + M-CAG; EACG + M-CAG). La preamplificación del ADN ligado y diluido 10<sup>-1</sup> se llevó a cabo con iniciadores complementarios a los adaptadores *EcoRI* y *MseI* usando un nucleótido selectivo de adenina y citosina, respectivamente, en un termociclador (PX2 Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA.) usando los siguientes parámetros: 20 ciclos a 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s and 72 °C durante 60 s.

comparisons between hyphae isolates obtained in the field. Each test was done by duplicated and incubated at room temperature (19-25 °C). To observe compatibility reactions, the slides were removed from the plates and were made Trypan Blue staining with lactophenol 0.1% and examined under microscope the compatibility reactions. For the classification of anastomosis reaction were used the categories proposed by MacNish *et al.* (1993).

### DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from genetically pure cultures following the methodology for filamentous fungi proposed by Raeder and Broda (1985) with minor modifications. Was collected and lyophilized the mycelium of *R. solani* obtained from inoculating 50 ml of potato dextrose broth (PDB, Difco) with five or six cubes of 0.25 cm<sup>2</sup> of mycelium growing on Potato Dextrose Agar (PDA, Difco) for 48-72 h at 28 to 25 °C. The mycelium was ground and macerated in extraction buffer (200 mM tris / HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS).

### AFLP analysis

It was conducted an analysis of Amplified Restriction Fragment Length Polymorphism following the protocol of Vos *et al.* (1995) with slight modifications. Genomic DNA was digested with 5U of *EcoRI* and *MseI* (Roche®) at 37 °C for 3 h. Digested samples were incubated at 70 °C for 15 min to inactivate restriction enzymes. *EcoRI* (5 pmol) and *MseI* (50 pmol) adapters were ligated to the DNA fragments, cut in ligation buffer (1X T4 DNA ligase) and 1U of T4 DNA ligase and incubated at 37 °C overnight. Selective amplification was made using six primer combinations (E-ACA + M-GTA; E-ACG + M-GTA; E-ACA + M-GGT; E-AGA + M-GGT; E-AAC + M-CAG; EACG + M-CAG). Preamplification of the ligated DNA and diluted 10<sup>-1</sup> was conducted with complementary primers to the *EcoRI* and *MseI* adapters using a selective nucleotide of adenine and cytosine, respectively, in a thermocycler (PX2 Thermo Electron Corporation, Milford, MA, USA.) using the following parameters: 20 cycles at 94 °C for 30 s, 56 °C for 30 s and 72 °C for 60 s.

The second amplification was carried out with six primer combinations of *EcoRI* (700 and 800 nm) and *MseI* using three selective nucleotides. Electrophoresis was performed on a Licor IR2sequencer equipped with two infrared lasers

La segunda amplificación se llevó a cabo con seis combinaciones de iniciadores de *EcoRI* (700 y 800 nm) y *MseI* usando tres nucleótidos selectivos. La electroforesis se llevó a cabo en un secuenciador LiCor IR2 equipado con dos lasers infrarrojos con capacidad de detección en dos longitudes de onda: 700 y 800 nm. Para el análisis se registraron solamente bandas brillantes, claramente distinguibles entre 50 y 700 pares de bases.

### Relaciones genéticas

A cada fragmento AFLP se le asignó un valor de 1 para presencia y 0 para su ausencia en cada individuo. De ésta manera se generó una matriz binaria, la cual sirvió como base para construir dendrogramas usando el coeficiente de Dice (Nei and Li, 1979), UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, Sokal and Sneath, (1963), y el Método de Jackknifing para comprobación. El método de remuestreo bootstrap se ejecutó para determinar la robustez del dendrograma considerando 1000 iteraciones a partir de los datos originales, el límite de confianza para cada par se determinó con el algoritmo de Felsenstein *et al.* (1985). Los dendrogramas se graficaron con el programa TreeView 1.6.6 (Page, 2001).

## Resultados y discusión

### Colectas

Se identificaron y colectaron plantas de diferentes variedades de chile con síntomas de marchitamiento y amarillamiento; de 304 plantas colectadas en 128 se encontró *Rhizoctonia solani*, lo cual representa 42% de incidencia. A partir de ellas se obtuvieron 73 aislados de raíz y 115 de tallo. Los tipos de chile colectados fueron mirasol, serrano, güero, de árbol, puya, ancho, mirasol de tres venas, caribe, guajón, tornachile, pasilla, cristalino, páprika bola, cascabel, guajillo, piquín, jalapeño, anaheim y cayene; estos nombres provienen del conocimiento del agricultor del predio de donde proviene la colecta y de acuerdo a la apreciación de los autores. Los estados donde se obtuvieron aislados fueron Zacatecas, San Luis Potosí, Durango, Guanajuato, Chihuahua, Colima y Querétaro. Con base en los criterios de colecta establecidos se estimó que se tiene una muestra representativa de la diversidad genética existente en la región de muestreo, ya que se trató de una selección completamente al azar, por tanto es alta la probabilidad de tener los aislados

with detection capability at two wavelengths: 700 and 800 nm. For analysis were recorded only bright bands clearly distinguishable between 50 and 700 base pairs.

### Genetic relationships

Each AFLP fragment was assigned a value of 1 for presence and 0 for its absence in each individual. In this way was generated a binary matrix, which served as the basis to construct dendrograms using the Dice coefficient (Nei and Li, 1979), UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, Sokal and Sneath (1963), and the Jackknifing method for verification. The bootstrap resampling method was performed to determine the robustness of the dendrogram considering 1 000 iterations from the original data, the confidence limit for each pair is determined by the algorithm of Felsenstein *et al.* (1985). The dendrograms were plotted with the program TreeView 1.6.6 (Page, 2001).

## Results and discussion

### Collections

Were identified and collected plants of different varieties of pepper with symptoms of wilting and yellowing; from 304 plants collected in 128 *Rhizoctonia solani* was found, representing 42% incidence. From these 73 isolates were obtained from roots and 115 from stems. The collected types of pepper were mirasol, serrano, güero, de árbol, puya, ancho, three veins mirasol, caribbean, guajon, tornachile, pasilla, cristalino, paprika ball, cascabel, guajillo, piquín, jalapeno, anaheim and cayenne; these names come from the farmer's knowledge from where the collection was made and according to the discretion of the authors. The states where isolates were obtained Zacatecas, San Luis Potosí, Durango, Guanajuato, Chihuahua, Colima and Querétaro. Based on the established collection criteria, was estimated that it had a representative sample of the genetic diversity in the sampling region because it was a completely random selection, so there is a high probability of having the most common isolates present in the fields of collection. After applying the selection criteria to obtain genetically pure isolates, were obtained 60 and 51 isolates from stem and root respectively. Table 1 shows, the states, number of municipalities, number of lots and the number of isolates per municipality.

más comunes presentes en los campos de colecta. Después de aplicar los criterios de selección para la obtención de aislados genéticamente puros se obtuvieron 60 aislados de tallo y 51 de raíz. El Cuadro 1 señala, además de los estados donde se colectó, el número de municipios considerados, el número de lotes y el número de aislados por municipio.

**Cuadro 1. Distribución por estados de aislados de *R. solani* obtenidas de tallo y raíz de plantas de Chile con síntomas de marchitez.**

**Table 1. Distribution by states of *R. solani* isolates obtained from stems and roots of pepper plants with wilt symptoms.**

Estado	No. de Municipios	No. de lotes	Tallo*	Raíz*
Guanajuato	15	25	25	21
Querétaro	1	2	2	0
San Luis Potosí	2	5	3	1
Zacatecas	5	23	41	30
Durango	3	10	11	4
Chihuahua	11	37	25	14
Colima	3	16	8	3
Total	40	118	115/60	73/51

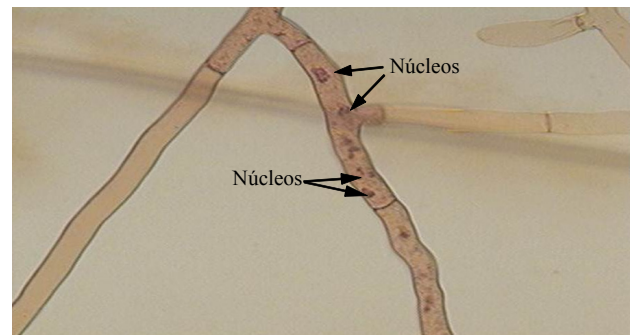
\*Los números después de la diagonal indican el número resultante de aislados en tallo y raíz después de aplicar los criterios para la obtención de cultivos genéticamente puros.

Las muestras procesadas originaron colonias fúngicas, no esporulantes, incoloras en etapa juvenil y café cuando maduran, constan de largas ramificaciones que crecen en ángulos rectos respecto a la hifa principal; presentan la formación de un septo de la ramificación cerca del punto de origen (Figura 1), lo cual concuerda con las características morfológicas de *R. solani* descritas por Parmeter y Whitney (1970). Por medio de tinción de núcleos con safranina se determinó que los aislados de *Rhizoctonia solani* de los diferentes estados donde se realizaron las colectas son polinucleados, con un promedio de 8 núcleos por célula llegando a tener hasta 23 (Figura 1).

### Grupos de anastomosis

Con los resultados obtenidos mediante el uso de las cepas probadoras se construyó el Cuadro 2, donde se observa que el grupo GA4 fue el más común pues aislados de todos los estados bajo estudio pertenecen a él. Los grupos relativamente raros fueron GA2-1, GA2-2IIIB y GA11, presentes solamente en Guanajuato; el grupo GA2-2IV presente solamente en Zacatecas y el grupo GA12 presente solamente en Durango. El estado que tuvo mayor diversidad

The processed samples originated fungal colonies, non sporulating, colorless in juvenile stage and brown when mature, consist of long ramifications which grow at right angles to the main hyphae; present formation of a septum from a ramification near the point of origin (Figure 1), which is consistent with the morphological features of *R. solani*, described by Parmeter and Whitney (1970). Through staining of nuclei with safranin was determined that *Rhizoctonia solani* isolates from different states where collections were made are multinucleate, with an average of 8 nuclei per cell coming to have up to 23 (Figure 1).



**Figura 1. Célula teñida con safranina. Algunos núcleos se señalan con flechas.**

**Figure 1. Cell stained with safranin; some nuclei are indicated by arrows.**

### Anastomosis groups

With the results obtained by using tester strains, was constructed Table 2, which shows that group GA4 was the most common, as isolate from all states under this study belong to it. Relatively rare groups were GA2-1, GA2-2IIIB and GA11, present only in Guanajuato; GA2-2IV was present only in Zacatecas and GA12 only in Durango. The state that had higher diversity of anastomosis groups was Guanajuato with four, followed by Durango and Zacatecas with three; in San Luis Potosí and Queretaro was found only one group.

This classification represents an important advance in understanding the characteristics of the isolates, as it will allow establishing criteria for the degree of genetic diversity between them, which also has relevance in the development of control strategies. Other groups have been found in Mexico, although none of them in pepper where the identification of *R. solani* as part of the complex causing wilt is relatively recent; so Meza-Moller *et al.* (2007) documented the presence of GA1 and GA2 group in pepper and grape, in Sayula Jalisco and Horcasitas,

en cuanto a grupos de anastomosis fue Guanajuato con cuatro, seguido de Durango y Zacatecas con tres; en San Luis Potosí y Querétaro solamente se encontró un grupo.

Esta clasificación representa un avance importante en el conocimiento de las características de los aislados, ya que permitieran establecer criterios en relación al grado de diversidad genética entre ellos, lo cual además tendrá relevancia en el establecimiento de estrategias para su control. Otros grupos se han encontrado en México, aunque ninguno de ellos en Chile donde la identificación de *R. solani* como integrante del complejo que ocasiona la marchitez es relativamente reciente; así Meza-Moller *et al.*, (2007) documentaron la presencia del grupo GA1 y GA2 en plantas de Chile y uva, en Sayula, Jalisco y Horcasitas, Sonora, respectivamente. El grupo GA2-2IIIB se observó en frijol en el estado de Veracruz, México (López-Olmos *et al.*, 2005). Mientras que el grupo GA3 se determinó en papa en Navidad, Nuevo León; Arteaga, Coahuila; Ayahualulco, Veracruz; Tapalpa, Jalisco; Huatabampo, Sonora y León Guanajuato (Virgen-Calleros *et al.*, 2000). El grupo GA5, se encontró en el estado de Veracruz en cultivo de frijol (López-Olmos *et al.*, 2005).

Los grupos GA6 y GA7, distribuidos en plantas de Chile y papa en Sayula, Jalisco y Toluca, Estado de México, respectivamente (Virgen-Calleros *et al.*, 2000; López-Olmos *et al.*, 2005). El grupo GA4, que tuvo la mayor frecuencia de aparición, es uno de los más reconocidos a nivel mundial y no ha sido asociado con un hospedero específico, ya que se ha encontrado en varios cultivos como soya, remolacha, calabazas, cacahuate, entre otros; se considera como causante de la pudrición de la semilla y de la raíz en diferentes cultivos; además existen reportes de que este grupo junto con los grupos GA2.1, GA2-2IV, también presentes en México según los resultados de este trabajo, ocasionan el "damping off" (ahogamiento) de la planta.

Además de las cepas probadoras también se establecieron confrontaciones pareadas entre aislados de los diversos estados, los cuales representan todos los grupos de anastomosis encontrados. Las confrontaciones probaron todas las combinaciones posibles; la gran mayoría de confrontaciones resultaron ser del tipo C1 (83.5%), las reacciones de compatibilidad fueron menores con sólo un 9.5% de confrontaciones, mientras que las confrontaciones de tipo C2 fueron únicamente 7% (Cuadro 3). Una vez más los resultados muestran que los aislados mexicanos son poco compatibles entre sí, lo cual sugiere amplia diversidad genética, lo cual puede explicarse por la gran diversidad de tipos de chiles que se siembran en la región estudiada,

Sonora, respectivamente. GA2-2IIIB group was found in bean in the state of Veracruz, Mexico (López-Olmos *et al.*, 2005). While GA3 group was determined in potato in Navidad, Nuevo Leon; Arteaga, Coahuila; Ayahualulco, Veracruz; Tapalpa, Jalisco; Huatabampo, Sonora and León, Guanajuato (Virgen-Calleros *et al.*, 2000). The GA5 group was found in the state of Veracruz in bean (López-Olmos *et al.*, 2005).

**Cuadro 2. Grupos de anastomosis internacionales de *R. solani* presentes en siete estados de México. Solamente se consideraron las fusiones perfectas o C3.**

**Table 2. International anastomosis groups of *R. solani* present in seven states from Mexico. Only perfect or C3 mergers were considered.**

Cepas probadoras	SLP	Dgo	Col	Gto	Qro	Zac	Chih
GA2-1				C3			
GA2-2IIIB				C3			
GA2-2IV						C3	
GA4	C3	C3	C3	C3	C3	C3	C3
GA7		C3					C3
GA11				C3			
GA12		C3					
GA13			C3			C3	

SLP= San Luis Potosí; Dgo= Durango; Col= Colima; Gto= Guanajuato; Qro= Querétaro; Zac= Zacatecas; Chih= Chihuahua.

GA6 and GA7 groups, spread in pepper and potato plants in Sayula, Jalisco and Toluca, State of Mexico, respectively (Virgen-Calleros *et al.*, 2000; López-Olmos *et al.*, 2005). GA4 group, which had the highest frequency of occurrence, is one of the most recognized worldwide and has been associated with a specific host, as it has been found in several crops such as soybeans, beets, pumpkins, peanuts, etc.; is considered to cause rot in seed and root in different crops; there are also reports that this group along with GA2.1, GA2-2IV, also present in Mexico according to the results of this work, cause "damping off" (drowning) of the plant.

Besides tester strains also established paired comparisons between isolates from different states, which represent all anastomosis groups found. The comparisons tried all possible combinations; the vast majority of comparisons turned out to be the type C1 (83.5%), compatibility reactions were lower with only 9.5% of comparisons, while comparisons C2 type were only 7% (Table 3). Again the results show that Mexican isolates are low compatible with each other, suggesting an extensive genetic diversity, which can be explained by the wide variety of types of peppers that are grown in the study



lo que probablemente indujo un proceso de coevolución ampliamente documentado en otros patosistemas. En este sentido se considera que el estado donde se presenta mayor variabilidad genética es Colima con 92% de interacciones C1 y el de menor variabilidad es Querétaro con 100% de interacciones C3. En general se puede apreciar en el resto de los estados un equilibrio entre las interacciones C1 y C3. La Figura 2 muestra los tipos de confrontaciones analizadas.

region, which probably induced a process coevolution widely documented in other pathosystems. In this regard it is considered that the state which presents greater genetic variability is Colima with 92% of C1 interactions and the lowest variability is Querétaro with 100% C3 interactions. In general it can be seen that in the rest of the states there is a balance between interactions C1 and C3. Figure 2 shows the types of comparisons analyzed.

**Cuadro 3. Porcentaje de las interacciones encontradas en las confrontaciones entre aislados de *R. solani* de siete estados de México.**

**Table 3. Percentage of interactions encountered in the comparisons between isolates of *R. solani* in seven states of Mexico.**

Estado	SLP	Dgo.	Col.	Gto.	Qro.	Zac.	Chih.
SLP	ND	29C1; 71C3	25C1; 75C3	43C1; 57C3	100C1	50C1; 50C3	17C1; 83C3
Dgo		57C1; 43C3	77C1; 5C2; 18C3	53C1; 4C2; 43C3	83C1; 17C3	61C1; 2C2; 37C3	46C1; 54C3
Col			92C1; 8C3	75C1; 4C2; 21C3	100C1	40C1; 60C3	45C1; 19C2; 36C3
Gto				52C1; 3C2; 45C3	50C1; 25C2; 25C3	57C1; 4C2; 39C3	47C1; 53C3
Qro					100C3	57C1; 28C2; 15C3	100C3
Zac						43C1; 57C3	60C1; 5C2; 35C3
Chih							50C1; 17C2; 33C3

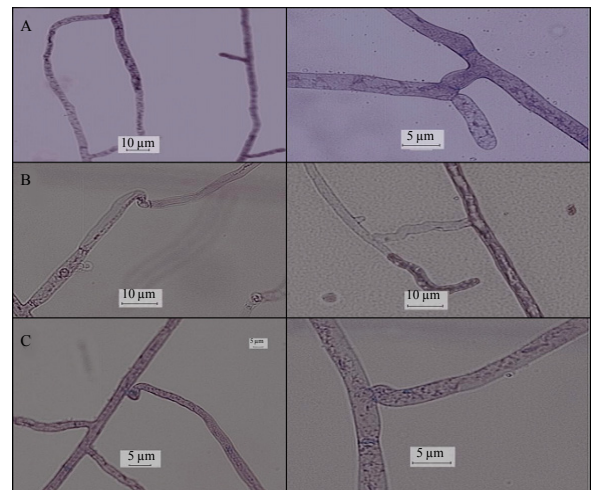
SLP= San Luis Potosí; Dgo= Durango; Col= Colima; Gto= Guanajuato; Qro= Querétaro; Zac= Zacatecas; Chih= Chihuahua.

**Análisis de diversidad genética**

El análisis AFLP de *R. solani* dio como resultado la amplificación de 255 bandas de las cuales 232 fueron polimórficas (91%). Un ejemplo de los resultados obtenidos con AFLP se muestra en la Figura 3. En ella se observa que la variación observada a nivel genotípico es muy alta ya que todos los aislados fueron haplotipos AFLP únicos.

Con la matriz binaria de presencia/ausencia de bandas se calcularon las distancias genéticas entre aislados usando el algoritmo de Dice, con las cuales se construyó el dendrograma UPGMA con bootstrap de 1 000 iteraciones que se presenta en la Figura 4. La alta diversidad intrapoblacional fue tan alta como la diversidad interpoblacional lo cual determinó la construcción de un dendrograma con poca estructura ya que se observan dos grupo bien definidos, pero que contienen aislados de todos los estados; lo mismo se observa en la formación de los cuatro subgrupos: no existen subgrupos que contengan aislados preferentemente de alguna región.

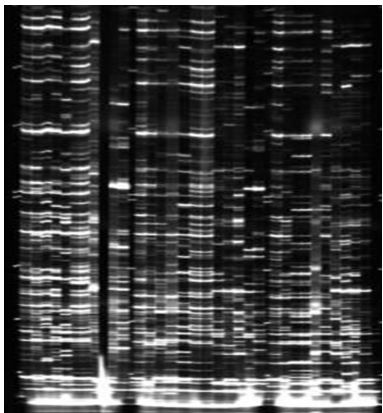
Los reportes señalan a *Phytophthora capsici* como el causante de la marchitez del Chile (Redondo, 1989; Mora, 1988), pero ya que se encuentra recurrentemente asociado a dos hongos reportados también como patógenos de plantas



**Figura 2. Diferentes interacciones obtenidas en las confrontaciones de *R. solani*; A) fusión completa en confrontación tipo C3; B) contacto con muerte celular en confrontación tipo C2, la transparencia de la célula indica su muerte; y C) contacto entre hifas en confrontación tipo C1.**

**Figure 2. Different interactions obtained in the comparisons of *R. solani*, A) complete merger in C3 type comparisons; B) contact with cell death in C2 type comparisons, transparency of cell indicates death; and C) contact between hyphae in C1 type comparisons.**

(Mora, 1988), es necesario identificar al agente causante de esta enfermedad y considerar la posibilidad de que sea un complejo fúngico el que se conjuga para causar el síndrome. Además la alta diversidad genética de estos patógenos, particularmente *R. solani*, dificulta su control debido a su gran capacidad adaptativa, lo cual se comprueba por la multitud de ambientes y hospederos donde puede prosperar. Esta puede ser la causa por la que no se han podido obtener variedades de chile resistentes a la marchitez.



**Figura 3.** Imagen representativa de los resultados obtenidos en el análisis AFLP de *Rhizoctonia solani*. Cada carril corresponde a un aislado diferente. Se observa alto nivel de polimorfismo en los fragmentos detectados, no existen dos aislados iguales.

**Figure 3.** Representative image of the results obtained in AFLP analysis of *Rhizoctonia solani*. Each lane corresponds to a different isolate. Observed high level of polymorphism in the detected fragments, there are no two identical isolates.

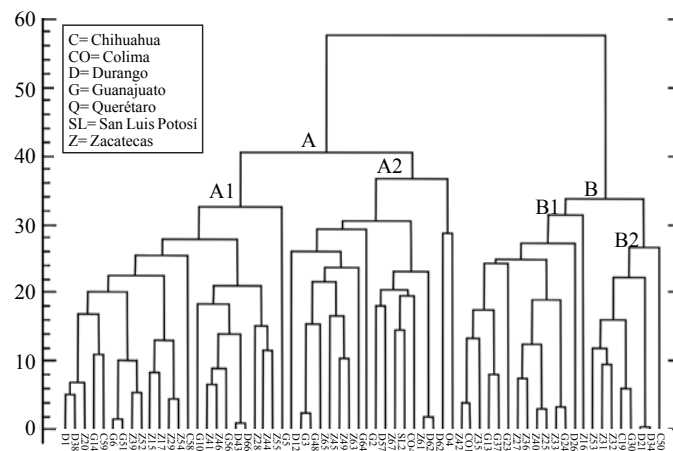
El uso de los AFLP ha permitido aclarar las relaciones filogenéticas, de patogenicidad y la diversidad genética de aislados de éste patógeno provenientes de diversas especies. Así, Ceresini *et al.* (2002) encontraron que 32 aislados estudiados del grupo GA3 obtenidos de papa tenían distinto fenotipo AFLP, mientras que 28 fenotipos AFLP se determinaron en 36 aislados del grupo GA3 obtenidos de tabaco. Esta alta diversidad genética concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio. Por otra parte, mediante el uso de AFLP (López-Olmos *et al.*, 2005) encontraron relación entre el genotipo y el grupo de anastomosis en aislados de *R. solani* obtenidos de plantas de frijol, aunque no se encontró asociación con la patogenicidad.

Taheri (2011) demostró por medio de análisis de varianza molecular (AMOVA) que la región geográfica fue el factor determinante de la estructura genética de las poblaciones

### Analysis of genetic diversity

AFLP analysis of *R. solani* gave as result the amplification of 255 bands of which 232 were polymorphic (91%). An example of the results obtained with AFLP is shown in Figure 3. It shows that the observed variation at the genotypic level is high since all isolates were unique AFLP haplotypes.

With the binary matrix of presence/absence of bands were calculated the genetic distances between isolates using Dice algorithm with which UPGMA dendrogram was constructed with bootstrap of 1000 iterations as presented in Figure 4. The high intrapopulation diversity was as high as the interpopulation diversity which determined the construction of a dendrogram with little structure and that there are two well-defined groups, but contain isolates from all states; the same is observed in the formation of four subgroups: there are no subgroups containing isolates from a particular region.



**Figura 4.** Dendrograma obtenidos por el método de UPGMA. Diversidad genética de aislados de *Rhizoctonia solani* provenientes de 7 estados de México.

**Figure 4.** Dendrogram obtained by the UPGMA method. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* isolates from 7 states of Mexico.

The reports point to *Phytophthora capsici* as causing pepper blight (Redondo, 1989; Mora, 1988), but because it is recurrently associated with two fungi also reported as plant pathogens (Mora, 1988), it is necessary to identify the causative agent of this disease and consider the possibility of being a fungal complex that combines to cause the syndrome. Moreover, the high genetic diversity of these pathogens, particularly *R. solani*, difficult control due to its highly adaptation capacity, which is proven by the multitude of environments and hosts where it can thrive. This may be the reason why has not been able to obtain pepper varieties resistant to wilt.

del grupo GA4 HG-1; sin embargo en los resultados aquí presentados la región geográfica de origen no tuvo importancia, en el dendrograma los agrupamientos se dan independientemente de ésta, lo cual puede deberse a que en éste trabajo se analizaron simultáneamente aislados de diversos grupos de anastomosis.

## Conclusiones

La diversidad genética de *R. solani* es alta, lo cual se comprobó por los perfiles AFLP que indican que todos los aislados estudiados pueden considerarse como haplotipos, ya que no se encontraron dos patrones similares. Otro indicativo de diversidad fue la gran mayoría de interacciones de tipo C1, que denotan incompatibilidad, en las confrontaciones entre aislados de los diferentes estados de México estudiados. Esta conclusión tiene implicaciones importantes tanto para el control de *R. solani* como para el control de la marchitez del chile, ya que una amplia diversidad genética frecuentemente conlleva una amplia capacidad adaptativa, lo que requiere el desarrollo continuo de estrategias integrales para reducir las poblaciones fúngicas.

## Literatura citada

- Bandoni, R. J. 1979. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia*. 11(4):873-874.
- Bensch, S. and Akesson, M. 2005. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Mol Ecol*. 14(10):2899-2914.
- Boidin, J. 1998. Taxonomie moleculaire des Aphylliphorales. *Mycotaxon*. 66:445-491.
- Çebi kiliçoğlu, M. and Özkoç, I. 2013. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* AG-4 isolates from common beans in Black Sea coastal region, Turkey, based on ITS-5.8S rDNA. *Turk. J. Biol.* 37:18-24.
- Ceresini, P. C.; Shew, H. D.; James, T. Y.; Vilgalys, R. J. and Cubeta, M. A. 2007. Phylogeography of the Solanaceae-infecting Basidiomycota fungus *Rhizoctonia solani* AG-3 based on sequence analysis of two nuclear DNA loci. *BMC Evol. Biol.* 7:163.
- Cubeta, M. A. and Vilgalys, R. 1997. Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. *Phytopathology*. 87(4):480-484.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 39(4):783-91.
- Fiers, M.; Edel-Hermann, V.; Héraud, C.; Gautheron, N.; Chatot, C.; Le Hingrat, Y.; Bouček-Mechiche, K. and Steinberg C. 2011. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* associated with potato tubers in France. *Mycologia*. 103(6):1230-44.
- González-García, M. 2008. Aspectos de sistemática y biología del complejo *Rhizoctonia*. *Fitosanidad*. 12(3):147-159.

The use of AFLP has allowed recognizing the phylogenetic relationships, of pathogenicity and genetic diversity of isolates of this pathogen from various species. Thus Ceresini *et al.* (2002) found that 32 isolates from GA3 group obtained from potato had different AFLP phenotype, while 28 AFLP phenotypes were determined in 36 isolates from GA3 group obtained from tobacco. This high genetic diversity agrees with the results obtained in the present study. Moreover, by using AFLP (López-Olmos *et al.*, 2005) found no association between genotype and anastomosis group in isolates of *R. solani* obtained from bean plants, although was not found association with pathogenicity.

Taheri (2011) demonstrated through analysis of molecular variance (AMOVA) that geographic region was a determinant factor of the genetic structure from populations GA4 and HG-1 groups; however the results here presented in the geographic region of origin had no importance, in the dendrogram the groupings occur regardless of this, which may be because in this work were analyzed simultaneously isolates from different anastomosis groups.

## Conclusions

The genetic diversity of *R. solani* is high, which was verified by AFLP profiles indicating that all isolates studied can be considered as haplotype, since was not found two similar pattern. Another indicator of diversity was the vast majority of C1 type interactions, which shows incompatibility in comparison between isolates from different states of Mexico. This conclusion has important implications both for the control of *R. solani* as for the control pepper blight, since a wide genetic diversity often leads to wide adaptive capacity, requiring continued development of comprehensive strategies to reduce fungal populations.

*End of the English version*



- González-García, V.; Portal-Onco, M. A. and Rubio-Susan, V. 2006. Review. Biology and systematics of the form genus *Rhizoctonia*. *Span. J. Agric. Res.* 4(1):55-79.
- González-Hernández, D. 2002. Estado actual de la taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20(2):200-205.
- Gour, R. 2012. Isolation and characterization of Actinomycetes against *Macrophomina phaseolina* and *Rhizoctonia solani*. *Adv. J. Pharm. Sci.* 1(2):31-30.

- Guigón-López, C. y González-González, P. A. 2001. Estudio regional de las enfermedades de Chile (*Capsicum annuum* L.) y su comportamiento temporal en el Sur de Chihuahua, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 19:49-56.
- Krechel, A.; Faupe, A.; Hallmann, J.; Ulrich, A. and Berg, G. 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid and Whitte) Chitwood. *Can. J. Microbiol.* 48:772-786.
- Liu, Z. L. and Sinclair, J. B. 1993. Differentiation of intraspecific groups within anastomosis group I of *Rhizoctonia solani* using ribosomal DNA internal transcribed spacer and isozyme analysis. *Can. J. Plant Pathol.* 12:376-382.
- López-Olmos, K.; Hernández-Delgado, S. and Mayek-Pérez, N. 2005. AFLP fingerprinting for identification of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) en México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 23(2):147-151.
- MacNish, G. C.; Carling, D. E. and Brainard, K. A. 1993. Characterization of *Rhizoctonia solani* AG-8 from bare patches by pectic isozyme (Zymogram) and anastomosis techniques. *Phytopathology.* 83:922-927.
- Meza-Moller, A.; Esqueda, M.; Gardea, A.; Tiznado, M. y Virgen-Callero, G. 2007. Variabilidad morfológica, patogénica y susceptibilidad a fungicidas de *Rhizoctonia solani* aislado de rizósfera de *Vitis vinifera* var. perlette seedless. *Rev. Mex. Micol.* 24:1-7.
- Meza-Moller, A.; Esqueda, M.; Sánchez-Teyer, F.; Vargas-Rosales, G.; Gardea, A. A. and Tiznado-Hernández, M. 2011. Genetic variability in *Rhizoctonia solani* isolated from *Vitis vinifera* based on Amplified Fragment Length Polymorphism. *Am. J. Agr. Biol. Sci.* 6(3):317-323.
- Mirmajlessi, S. M.; Safaie, N.; Mostafavi, H. A.; Mansouripour, S. M. and Mahmoudy, S. B. 2012. Genetic diversity among crown and root rot isolates of *Rhizoctonia solani* isolated from cucurbits using PCR based techniques. *Afr. J. Agr. Res.* 7:583-590.
- Mora, L. F. 1988. Guía de producción para Chile picante, San José, Costa Rica. Laboratorios Griffith. 22p.
- Nei, M. and Li, W. H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 76(10):5269-5273.
- Page, R. D. M. 2001. TreeView version 1.6.6. TreeView online user's guide. Glasgow: University of Glasgow, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.htm>.
- Parmeter, Jr. and Whitney, H. S. 1970. Taxonomy and nomenclature of the perfect stage. In *Rhizoctonia solani*, Biology and pathology. Parmeter, Jr. J. R. (Ed.). University of California Press, California. 7-19 pp.
- Pérez-Moreno, L.; Durán-Ortiz, L. J.; Ramírez-Malagón, R.; Sánchez-Pale, J. R. y Olalde-Portugal, V. 2003. Compatibilidad fisiológica y sensibilidad a fungicidas de aislamientos de *Phytophthora capsici* Leo. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21:19-25.
- Raeder, U. and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett Appl. Microbiol.* 1(1):17-20.
- Redondo, E.; Rodríguez, R.; Ortega, M.; Larqué, A. y Engleman, E. M. 1989. Mecanismo de infección y patología de las plantas de Chile susceptibles y resistentes al hongo *Phytophthora capsici* Leo. *Agrociencia.* 77:123-137.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2012. Cierre de la producción agrícola. Chile verde. <http://www.siap.gob.mx>. (consultado mayo, 2013).
- Silva-Rojas, H. V.; Fernández-Pavía, S. P.; Góngora-Canul, C.; Macías-López, B. C. y Ávila-Quezada, G. D. 2009. Distribución espacio temporal de la marchitez del Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e identificación del agente causal *Phytophthora capsici* Leo. *Rev. Mex. Fitopatol.* 27(2):134-147.
- Sneh, B.; Jabaji-Hare, S.; Neate, S. and Dijst, G. 1996. *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publisher. 578 p.
- Sneh, B. L. and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. *Am Phytopathol Soc Press.* St. Paul, Minnesota. 133 pp.
- Sokal, R. R. and Sneath, P. H. A. 1963. Principles of numerical taxonomy. San Francisco: H. Freeman & Company. 35 p.
- Taheri, P. 2011. Classification and genetic diversity of *Rhizoctonia solani* populations causing tomato damping-off in Iran. *Proc. IIIrd IS on Tomato Diseases.* Acta Hort. 914:131-134.
- Velásquez, V. R. y Victoriano, L. F. 2007. Presencia de patógenos en almácigos y semilla de Chile (*Capsicum annuum* L.) en Aguascalientes y Zacatecas, México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 25:75-79.
- Virgen-Calleros, G.; Olalde-Portugal, V. and Carling, D. E. 2000. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* on potato in central Mexico and potential for biological and chemical control. *Amer. J. Potato Res.* 77:219-224.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijmans, M.; Vane Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Paleman, J.; Kuiper, M. and Zabeau, Y. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23(21):4407-4414.