



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO



Centro Universitario UAEM Tenancingo

Patogenicidad de hongos asociados a *Rosellinia necatrix* Prill., en la pudrición de raíz en *Rosa* sp.

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO AGRÓNOMO
EN FLORICULTURA**

P R E S E N T A

NAYELI GABRIELA GONZÁLEZ CAMACHO

Directores

Dr. Rómulo García Velasco

Mg. Sc. Justino Gerardo González Díaz

Asesor

M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi

Tenancingo, Estado de México marzo de 2013

DEDICATORIA

A Dios

Por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida, por haberme brindado la sabiduría necesaria para concluir este trabajo tan importante para mi formación profesional, por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar cada día más, por todo el amor con el que me rodeas y porque me tienes en tus manos. ¡Esta tesis es para ti!

A ti Mami

Por tus consejos, valores, cuidados, apoyo, enseñanzas, por el amor que siempre me has brindado, por cultivar e inculcar ese sabio don de la responsabilidad. ¡Gracias por darme la vida! ¡Te amo mamita!

A ti Papi

A quien le debo todo en la vida, le agradezco el cariño, la comprensión, la paciencia, los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado por salir siempre adelante y el apoyo que me brindo para culminar mi carrera profesional. ¡Te amo papito!

A mis hermanos

Mary, Paco y Liz por los momentos de alegría, tristeza, miedos y no menos importante los momentos difíciles que hemos pasado juntos. ¡Gracias por estar conmigo los quiero mucho!

A ti amor

Mil gracias por estos siete años de conocernos en los cuales hemos compartido tantas cosas, hemos pasado tanto que ahora estás conmigo en este día tan importante para mí. Quiero darte las gracias por todo el apoyo que me has dado para continuar y seguir en mi camino, gracias por estar conmigo y recuerda que eres muy importante para mí. ¡Te amo!

A todos mis profesores

No solo de la carrera sino los de toda la vida, mil gracias porque de alguna manera forman parte de lo que ahora soy. ¡Gracias por sus enseñanzas!

A mis amigos

Los de carrera larga: Güera, Alis, Ale, Ruth, Juancho, Feli, Fer, Pedro, Santos, Isra y German que gracias al equipo que formamos logramos llegar hasta el final del camino. ¡Gracias por su amistad, los quiero!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma del Estado de México y en especial al Centro Universitario UAEM Tenancingo por el financiamiento del proyecto, titulado “Eficiencia productiva sustentable en el cultivo de rosa en invernadero ante las tendencias globales”; Convenio PROMEP 103.5/11/1041 y por darme la oportunidad de formar parte de ellas.

A mis directores de tesis el Dr. Rómulo García Velasco, M. en C. Justino Gerardo González Díaz, M. en C. Grisel Domínguez Arizmendi y no menos importante a Ing. Agr. Floric. Nohemí de la Cruz Linares gracias por su tiempo, por su apoyo así como la sabiduría que me transmitieron en el desarrollo de mi formación profesional que gracias a ello pude realizar esta investigación.

A Dena y Alis les agradezco su amistad y cariño que me han brindado hasta este momento, también gracias por darme la oportunidad de aprender y compartir grandes experiencias durante estos cinco años.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Importancia del cultivo de <i>Rosa</i> sp.	3
2.2. Enfermedades fungosas en el área radicular de <i>Rosa</i> sp.....	4
2.2.1. <i>Pythium</i> sp. Pringsh.....	5
2.2.2. <i>Verticillium albo-atrum</i> Reinke y Berthier y <i>V. dahliae</i> Kleb.....	5
2.2.3. <i>Phytophthora</i> sp. Bary	6
2.2.4. <i>Rosellinia necatrix</i> Prill.	7
2.2.4.1. Clasificación taxonómica de <i>Rosellinia necatrix</i>	8
2.2.4.2. Biología de <i>Rosellinia necatrix</i>	9
2.2.4.3. Características Morfológicas de <i>Rosellinia necatrix</i>	10
2.2.4.4. Sintomatología ocasionada por <i>Rosellinia necatrix</i>	11
2.2.5. <i>Fusarium</i> spp.....	13
2.2.5.1. Clasificación taxonómica de <i>Fusarium oxysporum</i> Schlechtend	14
2.2.5.2. Biología de <i>Fusarium oxysporum</i>	14
2.2.5.3. Características morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i>	16
2.2.5.4. Sintomatología ocasionada por <i>Fusarium oxysporum</i>	17
2.2.6. <i>Ophiostoma</i> spp. H. y P. Sydow	18

2.2.6.1. Clasificación taxonómica de <i>Ophiostoma stenoceras</i> (Robak) Melin y Nannf.....	20
2.2.6.2. Biología de <i>Ophiostoma</i> spp.	20
2.2.6.3. Características morfológicas de <i>Ophiostoma stenoceras</i>	21
2.2.6.4. Sintomatología ocasionada por <i>Ophiostoma stenoceras</i>	22
2.3. Determinación de patogenicidad a través de los postulados de Koch	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. OBJETIVOS	26
5. HIPÓTESIS	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. Colecta de material enfermo	27
6.2. Aislamiento y purificación de los hongos asociados a <i>R. necatrix</i>	27
6.3. Identificación de los hongos aislados.....	28
6.4. Determinación de patogenicidad de <i>R. necatrix</i> hongo 1 y hongo 2, inoculados individualmente y en asociación	31
6.4.1. Plantación y mantenimiento de plantas de <i>Rosa</i> sp.....	31
6.4.2. Incremento del inoculó <i>R. necatrix</i> , hongo 1 y hongo 2.....	32
6.4.3. Inoculación de <i>R. necatrix</i> , hongo 1 y hongo 2.....	32
6.4.4. Reaislamiento de los hongos inoculados en plantas de <i>Rosa</i> sp.....	34
6.4.5. Variables evaluadas en plantas de rosa inoculadas.....	34
6.5. Diseño experimental y análisis estadístico.....	35
7. RESULTADOS	36
7.1. Aislamiento de hongos asociados a <i>R. necatrix</i>	36

7.2. Identificación de los hongos aislados en asociación con <i>R. necatrix</i>	36
7.2.1. Identificación del hongo 1	36
7.2.2. Identificación del hongo 2	38
7.3. Determinación de patogenicidad de <i>Rosellinia necatrix</i> , <i>Ophiostoma stenoceras</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	40
7.3.1. Incidencia de la enfermedad	40
7.3.2. Síntomas observados en las plantas inoculadas.....	42
7.3.3. Altura de planta	45
7.3.4. Peso seco de raíz.....	46
7.4. Reaislamiento	47
8. DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES.....	54
10. RECOMENDACIONES	55
11. LITERATURA CITADA.....	56
12. ANEXOS	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Inoculación de <i>R. necatrix</i> , hongo 1 y hongo 2 en plantas de <i>Rosa</i> sp., variedad Royal Baccara injertadas en patrón Manetti	33
Cuadro 2. Incidencia de la enfermedad en plantas de <i>Rosa</i> sp., inoculadas con <i>O. stenoceras</i> , <i>F. oxysporum</i> y/o <i>R. necatrix</i>	41
Cuadro 3. Sintomatología registrada en follaje, área radicular y muerte de plantas de <i>Rosa</i> sp., inoculadas con <i>O. stenoceras</i> , <i>F. oxysporum</i> y/o <i>R. necatrix</i>	43
Cuadro 4. Incremento de la altura de las plantas de <i>Rosa</i> sp., inoculadas con <i>O. stenoceras</i> , <i>F. oxysporum</i> y/o <i>R. necatrix</i> ., a los día 85 ddi.	46
Cuadro 5. Peso seco de raíz de plantas de <i>Rosa</i> sp., inoculadas con <i>O. stenoceras</i> , <i>F. oxysporum</i> y/o <i>R. necatrix</i>	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de *O. stenoceras* en medio de cultivo OMA. A) peritecios color negro, sobre el micelio superficial blanco, B) peritecios con base globosa (40x), C) ascosporas en forma de gajos de naranja (100x), D) expulsión de ascosporas por el canal ostiolar (100x), E) cuello de peritecio ancho en la base adelgazándose en el apice (100x), F) hifas ostiolares septadas (40x), G) conidios secundarios subglobosos (100x) fase asexual (*Sporothrix* sp.), H) conidios agrupados en forma de flor (*Sporothrix* sp.), I) micelio superficial abundante color blanco..... 38

Figura 2. Características morfológicas de *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA. A) micelio algodonoso de color blanco a púrpura, B) macroconidios (MA) y microconidios (MI) (100x), C) clamidosporas intercalares solitarias (IS) y clamidosporas intercalares agrupadas (IA) (10x), D) clamidosporas terminales dispuestas en cadena (100x)..... 40

Figura 3. Incidencia de la enfermedad. A) plantas sanas al momento del establecimiento del experimento, B) y C) plantas enfermas inoculadas con *R. necatrix*, *O. stenoceras* y/o *F. oxysporum*, D) izquierda: planta sana, derecha: planta enferma. 42

Figura 4. Síntomas en la parte aérea de plantas de *Rosa* sp., variedad Royal Baccara, injertadas en patrón Manetti inoculadas con: (T1) *O. stenoceras*, (T2) *F. oxysporum*, (T3) *R. necatrix*, (T4) *O. stenoceras* + *Fusarium oxysporum*, (T5) *F. oxysporum* + *R. necatrix*, (T6) *O. stenoceras* + *R. necatrix*, (T7) *O. stenoceras*+ *F. oxysporum* + *R. necatrix*, (T8) sin inocular (testigo). 44

Figura 5. Daños en raíz de plantas de *Rosa* sp. Variedad Royal Baccara injertadas en patrón Manetti inoculadas con:(T1) *O. stenoceras*, (T2) *F. oxysporum*, (T3) *R. necatrix*, (T4) *O. stenoceras* + *F. oxysporum*, (T5) *F. oxysporum* + *R. necatrix*, (T6) *O. stenoceras* + *R. necatrix*, (T7) *O. stenoceras* + *F. oxysporum* + *R. necatrix*, (T8) sin inocular (testigo)..... 44

Figura 6. Recuperación *in vitro* de *O. stenoceras*, *F. oxysporum* y *R. necatrix*, inoculados en plantas de rosa. (T1= *O. stenoceras*, T2= *F. oxysporum*, T3= *R. necatrix*, T4= *O. stenoceras* + *F. oxysporum*, T5= *F. oxysporum* + *R. necatrix*, T6= *O. stenoceras* + *R. necatrix*, T7= *O. stenoceras* + *F. oxysporum* + *R. necatrix*, T8= Testigo) 48

RESUMEN

A nivel nacional, el Estado de México es uno de los principales productores de rosa, distribuyéndose la mayor producción en los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas. Este cultivo puede ser afectado por más de un patógeno en el área radicular, los cuales en conjunto pueden contribuir al desarrollo de una misma enfermedad dificultando la efectividad de los métodos de manejo; por lo anterior se planteó como objetivo determinar la patogenicidad de los dos hongos asociados a *Rosellinia necatrix*, aislados de raíces de plantas de *Rosa* sp., en el municipio de Tenancingo, Estado de México.

De acuerdo a la identificación morfológica los dos hongos asociados a *R. necatrix* se identificaron como *Fusarium oxysporum* y *Ophiostoma stenoceras*. Se determinó la patogenicidad de *R. necatrix*, *F. oxysporum* y *O. stenoceras*, inoculados individualmente y en asociación en plantas de *Rosa* sp., variedad Royal Baccara injertadas en patrón Manetti. El experimento se realizó bajo un diseño factorial, con ocho tratamientos y 16 repeticiones, los datos se analizaron con el programa InfoStat.

Se presentó incidencia del 100 % en los tratamientos donde se inoculó *R. necatrix* (T3) y en asociación con *O. stenoceras* (T6) y/o *F. oxysporum* (T5); mientras que cuando se inocularon los tres hongos juntos (T7) esta fue del 93.8 %. Por otro lado al inocular en asociación a *O. stenoceras* y *F. oxysporum* (T4) la incidencia fue del 18.8 %, mientras que inoculado individualmente *O. stenoceras* (T1) presentó incidencia del 6.3 %. En el

tratamiento donde se inoculó a *F. oxysporum* (T2) y el testigo (T8) no se manifestaron daños durante todo el periodo de evaluación.

Los primeros síntomas se manifestaron a partir de los 12 ddi en el T7 y los últimos a los 62 ddi en el T1 y T4. Los síntomas que se manifestaron en los tratamientos T3, T5, T6 y T7 fueron marchitez y/o amarillamiento, pudrición y escaso desarrollo radicular, y cordones miceliales color blanco a gris que cubrían las raíces; mientras que en T1 y T4 los síntomas fueron amarillamiento y defoliación. Por otro lado la muerte de las plantas se presentó a partir de los 39 ddi en los tratamientos T3, T5, T6 y T7.

El menor crecimiento de las plantas y peso seco de raíz se presentó en los tratamientos donde se inoculó a *R. necatrix* de manera individual y asociado con *O. stenoceras* y/o *F. oxysporum*.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cultivo ornamental de mayor demanda es la rosa, seguido del clavel, ave de paraíso, gladiola y crisantemo (Orozco, 2007). En el año 2010, en México se cultivaron 668 ha de rosa para flor de corte, de las cuales se cosecharon 652 ha, para el 2011 la superficie sembrada se incrementó a 673 ha, cosechándose 655 ha, equivalentes a \$1, 013, 500. 43 pesos (SIAP, 2012).

El Estado de México participa con el 80% de la producción de flores de corte (Gómez-Gómez, 2010; SEDAGRO, 2003; Cabezas, 2002), por lo que ocupa el primer lugar tanto en producción como en exportación (CESAVEM, 2010); siendo los municipios productores de mayor importancia Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas.

El cultivo de rosa es atacado por diferentes patógenos, los cuales pueden dañar la parte aérea y/o radicular de la planta, provocando graves problemas de reducción de productividad y sobrevivencia, lo que se traduce en pérdidas económicas para los agricultores (Rodríguez, 2001). En México se tiene el reporte de la presencia de *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *Verticillium albo-atrum*, *Verticillium dahliae* (Mendoza et al., 1993) y *Rosellinia necatrix* (García-Velasco et al., 2010; Mendoza et al., 1993).

De los patógenos mencionados anteriormente, destaca *R. necatrix*, el cual se ha encontrado en cultivos de rosa de los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas (Domínguez, 2008), siendo este el agente causal de la pudrición blanca de raíz (García-Velasco et al., 2010).

Los hongos fitopatógenos del suelo, invaden las raíces de las plantas, provocando alteraciones fisiológicas y afectando los mecanismos de resistencia al ataque de ciertas enfermedades. Estos hongos pueden ser parásitos especializados y parásitos no especializados; estos últimos están limitados por la resistencia a la invasión de los tejidos maduros del hospedante, provocando que la infección se limite a plántulas y sus tejidos jóvenes y maduros, o plantas con tejidos viejos pero predispuestas a la infección por condiciones adversas como toxinas o deficiencias nutrimentales (Rodríguez, 2001).

Con la finalidad de proponer métodos de manejo fitosanitario, es importante el conocimiento de los hongos fitopatógenos que atacan a las raíces de las plantas, así como el papel que éstos tienen dentro de la cadena trófica y su relación con otros organismos del suelo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Importancia del cultivo de *Rosa* sp.

En México, la mayor superficie dedicada a la floricultura se encuentra en el Estado de México, principalmente en los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas, dichos municipios aportan el 80% de la producción estatal (Gómez-Gómez, 2010; SEDAGRO, 2003; Cabezas, 2002). Los cultivos de mayor importancia, por superficie cultivada, son: rosa (*Rosa* sp.), clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev), ave de paraíso (*Strelitzia reginae* Ait.), lilis (*Lilium* spp. L.), tulipán (*Tulipa* spp. L.), limonium (*Limonium sinuatum* L.), gypsophila (*Gypsophila paniculata* L.), gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus ex Hooper f.), gladiola (*Gladiolus grandiflora* L.), alstroemeria (*Alstroemeria aurantiaca* L.), entre otros de menor importancia económica (SECOFI, 2005; Cabezas, 2002; Terrazas, 2002). Cabe destacar que los cultivos de mayor demanda son rosa, clavel, ave de paraíso, gladiola y crisantemo (Orozco, 2007).

En el año 2006 en el Estado de México, se tenían cultivadas bajo invernadero 440 ha de rosa para flor de corte; esta superficie se incrementó 42 % en el 2007, y a partir de ésta fecha la superficie aumentó gradualmente, de manera que en 2011 se cultivaron 673 ha, de las cuales se cosecharon 655 ha equivalentes a \$1, 013, 500.43 pesos (SIAP, 2012).

2.2. Enfermedades fungosas en el área radicular de *Rosa* sp.

De los diversos microorganismos que atacan a las plantas, los hongos son el grupo que más enfermedades ocasionan a los cultivos, existiendo más de 8,000 especies que dañan. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongos fitopatógenos, y una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta (Agrios, 2005; Rodríguez, 2001).

Los factores que determinan el desarrollo de una enfermedad son: hospedero susceptible, patógeno y condiciones ambientales óptimas para que el patógeno cause la enfermedad al hospedero. Cada uno de estos componentes muestran considerable variabilidad, y cuando alguno de estos sufre cambios, el grado de severidad de la enfermedad cambia en cada una de las plantas y en toda la población vegetal (Agrios, 2005; Sepúlveda, 2005; Arauz, 1998; Coscolla, 1980).

El cultivo del rosal, es afectado por una serie de enfermedades tanto en la parte foliar como en la radicular; siendo más complicadas estas últimas por estar en la parte subterránea, dentro de estas se encuentran: *Verticillium albo-atrum* Reinke y Berthier (Kenneth *et al.*, 2007; Mendoza *et al.*, 1993), *Cylindrocarpon destructans* (Zinssm) Sholten, *Cylindrocladium scoparium* Morg., *Gnomonia radicola* NoordelKesteren y Veenb.- Rijks., *Phytophthora* sp. Bary., *Pythium* sp. Pringsh (Agrios, 2005; López *et al.*, 2005; Pizano de Márquez, 2003; Rodríguez, 2001), *Verticillium dahliae* Kleb. (Mendoza, 2002), *Rhizoctonia solani* Kühn. (Hyakumachi *et al.*, 2005), *Fusarium oxysporum* Schlechtend (Barguil *et al.*; 2009) y *Rosellinia necatrix* Prill. (García-Velasco *et al.*, 2010;

Mendoza, 2002; Mendoza *et al.*, 1993). En México se reportan daños a causa de *Phytophthora* sp., *Pythium* sp., *V. albo-atrum*, *V. dahliae* (Mendoza, 1993) y *R. necatrix* (García-Velasco *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 1993).

2.2.1. *Pythium* sp. Pringsh

Este patógeno se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, tanto en climas tropicales como templados (Agrios, 2005). Es un oomycete conocido como patógeno de debilidad ya que causa graves daños en plántulas. Las condiciones óptimas de desarrollo son alta humedad del suelo y temperatura cercana a los 20 °C. Se dispersa por medio de zoosporas, las cuales tienen la capacidad de moverse a través del agua, y establecerse sobre el material vegetativo donde después de un tiempo germinan provocando que otras plantas se infecten (Pizano de Márquez, 2003).

Los síntomas iniciales se manifiestan en la parte aérea de la planta con achaparramiento, amarillamiento y marchitez. Las lesiones en raíz pueden ser húmedas, cristalinas y color café (Mendoza, 2002).

2.2.2. *Verticillium albo-atrum* Reinke y Berthier y *V. dahliae* Kleb

Es un hongo imperfecto, distribuido en todo el mundo, ataca cultivos perennes tales como forestales, frutales, herbáceos, plantas de ornato e incluso malezas (Agrios, 2005).

En general las plantas muestran achaparramiento, deteniendo parcialmente su crecimiento (Tamayo, 2007). En *Rosa* sp., los síntomas iniciales se presentan en las hojas apicales de tallos jóvenes provocando marchitez en toda la planta; las hojas se tornan de amarillo a café, se debilitan y mueren. La defoliación inicia desde la base de los tallos (Mendoza *et al.*, 1993).

En etapas iniciales de la enfermedad los tallos pueden seguir su crecimiento hasta presentar muerte descendente comenzando del ápice hacia la corona. A lo largo de los brotes se presentan lesiones necróticas o púrpura-oscuras. La muerte descendente progresiva puede provocar la muerte total de la planta. Los síntomas aparecen en periodos de estrés tales como sequía (Kenneth *et al.*, 2007; Mendoza *et al.*, 1993). Los síntomas característicos son amarillamiento foliar, defoliación, y amarillamiento en los tallos.

Los efectos de esta enfermedad en las hojas son más notorios en el día, recuperándose durante la noche; cuando la transpiración es alta, los brotes continúan flácidos y no se recuperan (Pizano de Márquez, 2003; Kenneth *et al.*, 2007).

2.2.3. *Phytophthora* sp. Bary

La temperatura óptima para su desarrollo es de 25-27 °C (Pizano de Márquez, 2003). Ataca a diversos cultivos tales como hortalizas, arbustos, frutales y flores de ornato; se puede presentar tanto en plántulas como en plantas adultas (Rosales, 2009; Agrios, 2005). El patógeno puede matar plántulas y plantas anuales en días e incluso meses

después del trasplante. En plantas adultas el tiempo en el que se presenta la muerte depende de las condiciones ambientales en las que se presenta el patógeno.

Dentro de los síntomas que ocasiona se reporta que las raíces jóvenes mueren y con frecuencia aparecen lesiones necróticas en las raíces maduras (Rosales, 2009; Daughtrey, 2001). Un síntoma característico, es que el patógeno invade el tejido de la corona a nivel de suelo avanzando hacia abajo causando pudrición de raíz, la corteza se torna café y se desprende lo que ocasiona disminución en la absorción de agua y nutrientes (Mendoza, 2002).

El patógeno se dispersa a través de zoosporas, las cuales requieren alta humedad, bajo condiciones de elevada humedad en el suelo la pudrición radicular aumenta dificultando su control (Pizano de Márquez, 2003).

2.2.4. *Rosellinia necatrix* Prill.

La enfermedad ocasionada por *R. necatrix*, es conocida como la pudrición blanca de raíz, causa pérdidas de gran importancia económica a nivel mundial en cultivos ornamentales y árboles frutales (Ruano-Rosa *et al.*, 2007; Hoopen *et al.*, 2006; Melgarejo, 2003; López-Herrera *et al.*, 1998; Mendoza *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1992; Mehrotra *et al.*, 1990). En México, se reportó por primera vez en 1978, atacando a manzano y peral en los estados de Puebla e Hidalgo (Romero-Cova, 1993).

Dentro de los ornamentales que afecta destacan: rosa (*Rosa* sp.), (García-Velasco *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1992), tulipán (*Tulipa* spp. L.), begonia

(*Begonia* sp. L.), peonia (*Paeonia* spp. L.) (Fresa, 1975), jazmín (*Jasminum* spp. L.), violeta (*Viola* spp. L.), ciclamen (*Cyclamen persicum* L.) y clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) (Smith *et al.*, 1992).

Otras especies afectadas son: durazno (*Prunus persica* L. Batsch), ciruelo (*Prunus domestica* L.), ciprés (*Cupressus sempervirens* L.) (Fresa, 1975), fambruesa (*Rubus idaeus* L.), fresa (*Fragaria vesca* L.), cerezo (*Prunus avium* L.), higuera (*Ficus carica* L.), cítricos (Smith *et al.*, 1992), cacao (*Theobroma cacao* L.) (García *et al.*, 2005), remolacha (*Beta vulgaris* L.), haba (*Vicia faba* L.) (Pérez-Jiménez *et al.*, 2003; Fresa, 1975), aguacate (*Persea americana* Miller.) (Tamayo, 2007; Ruano-Rosa *et al.*, 2007; Ploetz, 2003; Pérez-Jiménez *et al.*, 2002; López-Herrera *et al.*, 1998; Szejnberg *et al.*, 1987), manzana (*Malus* sp.), pera (*Pyrus communis* L.) (Hoopen *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2005; Mendoza *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1992; Mehrotra *et al.*, 1990; Szejnberg *et al.*, 1987; Szejnberg y Madar 1980), café (*Coffea* sp.) (Hoopen *et al.*, 2006; García *et al.*, 2005; Mehrotra *et al.*, 1990) y vid (*Vitis vinifera* L.) (Hoopen *et al.*, 2006; Ikeda *et al.*, 2005; Mehrotra *et al.*, 1990).

2.2.4.1. Clasificación taxonómica de *Rosellinia necatrix*

Hoopen *et al.* (2006), reportan que se encuentra ubicado dentro de la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio: Eucarionte

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Ascomycotina

Clase: Euascomycetes

Subclase: Pyrenomycetes

Orden: Sphaeriales

Familia: Xilariaceae

Género: *Rosellinia*

Especie: *Rosellinia necatrix* Prill.

2.2.4.2. Biología de *Rosellinia necatrix*

El género de *Rosellinia* se encuentra conformado por aproximadamente 300 especies (Hoopen *et al.*, 2006). Las especies que destacan por su importancia económica son: *R. arcuata*, *R. bunodes*, *R. necatrix*, *R. pepo* (Hoopen *et al.*, 2006; Mehrotra *et al.*, 1990), *R. aquila* y *R. quercina* (Smith *et al.*, 1992).

Rosellinia spp., se distribuye mundialmente, tanto en zonas tropicales como subtropicales. Se ha reportado en Colombia, Estados Unidos, Oeste de África, Oeste de la India, Nueva Zelanda, Japón, Italia, Francia, Portugal, Suiza, Grecia, Hungría, Gran Bretaña (Hoopen *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 1992), California, Israel, España (Ploetz, 2003; Rodríguez, 2001; Mendoza *et al.*, 1993) y México (García-Velasco *et al.*, 2010; Romero-Cova, 1993).

R. necatrix es un parásito facultativo con un amplio rango de hospedantes, es decir es capaz de sobrevivir y crecer en el suelo en ausencia del hospedero (García *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1992). Se desarrolla especialmente en suelos húmedos donde las raíces

sufren asfixia, invade la raíz y la base del tallo, hasta alcanzar la superficie del suelo. Puede atacar a las plantas en cualquier etapa de su desarrollo (García *et al.*, 2005)

En la naturaleza se encuentra en estado sexual (*R. necatrix*) y asexual (*Dematophora necatrix* Hartig) (Pérez-Jiménez *et al.*, 2003; Ploetz, 2003; Szejnberg *et al.*, 1987). Ocasiona la pudrición blanca de la raíz en aproximadamente 170 especies de plantas (Ruano-Rosa *et al.*, 2007; Hoopen *et al.*, 2006; Ruano-Rosa *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1992; Mehrotra *et al.*, 1990; Szejnberg, 1980).

La enfermedad se presenta, en suelos con alto contenido de materia orgánica y en lugares donde se han sembrado cultivos susceptibles al hongo (Tamayo, 2007), en suelos arcillosos, con temperatura entre 20-25 °C (Ploetz, 2003; Mendoza *et al.*, 1993), pH de 6.2 y humedad del suelo entre 75-100 % (Pérez-Jiménez *et al.*, 2003; Freeman *et al.*, 1992).

2.2.4.3. Características Morfológicas de *Rosellinia necatrix*

La fase sexual presenta peritecios con ostiolo papilado bien diferenciado (Pérez-Jiménez *et al.*, 2003), que se encuentra formado por una pared de tres capas, la capa exterior es gruesa color marrón; presenta un pedicelo provisto de filamentos entrelazados con paredes endurecidas. Se encuentran ligeramente agregados, son globosos, color negro y pedicelado en la base, con diámetro de 1 a 2 mm embebido en un subiculum marrón; las hifas del subiculum son de dos tipos, unas uniformes con diámetro de 5-8 µm de ancho y otras presentan hinchazones típicas piriformes o

raquetoides desarrolladas inmediatamente antes de la septa (Sivanesan *et al.*, 1972 citado en Holliday, 1995).

Las ascas son cilíndricas, alargadas, unitunicadas, octosporicas de 250-380 x 8-12 μm ; ascosporas cimbiformes, rectas o curvadas, color marrón oscuro de 30-50 x 5-8 μm . Parafisos numerosos y filiformes (Sivanesan *et al.*, 1972; citado en Holliday, 1995; Mendoza *et al.*, 1993). Estroma negro esférico o semigloboso, su diámetro es de 1.64 ± 0.18 mm y su altura de 2.19 ± 0.11 mm, se encuentra formado en dos capas, la externa (ectostroma) es negra y rígida y la interna (endostroma) tiene coloración crema con aspecto polvoriento en la madurez cuya función es unir el peritecio al estroma (Pérez-Jiménez *et al.*, 2003), clamidosporas ausentes (Pérez-Jiménez, 2006).

La fase asexual presenta micelio con hinchamientos piriformes antes de la septa (micelio raqueteado) que conforma los cordones miceliales (Khan, 1959 y Makambilia, 1978, Citados en Pérez-Jiménez, 2006; Sivanesan *et al.*, 1972, Citado en Holliday, 1995 y Freeman *et al.*, 1992). Mendoza *et al.* (1993) menciona que se presentan hifas septadas hialinas, conforme el micelio madura se torna color café, y se comienzan a observar los hinchamientos en forma de pera cerca de cada septa, lo que le da un aspecto de raquetado.

2.2.4.4. Sintomatología ocasionada por *Rosellinia necatrix*

Los síntomas característicos que ocasiona el patógeno en la planta son: pudrición de raíz, disminución de crecimiento, pequeño y escaso follaje, clorosis, marchitez,

decaimiento y finalmente la muerte (Ruano-Rosa *et al.*, 2007; Tamayo, 2007; Mendoza *et al.*, 1993; Smith *et al.*, 1992).

Romero-Cova (1993), reporta que las plantas infectadas presentan poco follaje y muerte de ramas; en frutales los frutos son escasos y pequeños. Otra característica importante es que en plantas herbáceas el patógeno invade todas las partes subterráneas, mientras que en huéspedes leñosos permanece en el parénquima, floema y cambium (Smith *et al.*, 1992). Las raíces secundarias y terciarias se cubren de micelio blanco, el cual se torna negro conforme madura. El patógeno también afecta el vigor de la planta produciendo la caída de hojas y secamiento de las ramas (Melgarejo, 2003).

En *Rosa* sp., la enfermedad se presenta en áreas del cultivo que presentan exceso de humedad. Los síntomas característicos son disminución del crecimiento de la planta, pudrición radicular, amarillamiento, marchitez, pequeño y escaso follaje y finalmente muerte de la planta (García-Velasco *et al.*, 2010; Domínguez, 2008).

Mendoza *et al.* (1993), señala que los síntomas son más notorios durante el verano, manifestándose pudrición de la raíz; bajo la corteza de la raíz dañada se puede observar el micelio blanco algodonoso, que posteriormente se obscurece tornándose de café claro a oscuro. En una misma planta es común la presencia de tallos muertos y otros aparentemente sanos. En la parte subterránea se observan cordones miceliales de coloración grisácea rodeando la raíz. A causa de la pudrición ocasionada por el patógeno las raíces se desprenden con facilidad del tallo (Domínguez, 2008).

2.2.5. *Fusarium* spp.

El género *Fusarium*, comprende especies de distribución cosmopolita. Se encuentra en climas tropicales, subtropicales y templados (Benadof, 2010; Palmero, 2008; Leslie *et al.*, 2006; Calle, 2005; González *et al.*, 2005; Mora, 2001); sin embargo, presenta mayor incidencia en regiones de clima cálido, en donde ocasiona grandes pérdidas económicas (Carrillo *et al.*, 2003).

Habita en el suelo como saprofito, sobreviviendo sobre restos vegetales en descomposición, o a través de estructuras de resistencia (micelio, esporas, clamidosporas), sobre todo en regiones de clima templado a frío (Alvarado, 2005; Agrios, 2005). También se ha reportado como parásito facultativo en plantas, animales y humanos (Camacho *et al.*, 2008; Agrios, 2005; Mora, 2001).

Causa graves pérdidas económicas en la agricultura mundial ya que es el agente causal del marchitamiento provocado por obstrucción vascular y pudrición basal de una gran variedad de plantas como son hortalizas, árboles frutales, ornamentales y malezas (Camacho *et al.*, 2008; Agrios, 2005; González *et al.*, 2005; Monzón *et al.*, 2003; Garcés *et al.*, 2001).

2.2.5.1. Clasificación taxonómica de *Fusarium oxysporum* Schlechtend

De acuerdo a Alexopoulos (1979), se encuentra ubicado en la siguiente clasificación taxonómica:

Dominio: Eucarionte

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Subclase: Deuteromycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum* Schlechtend.

2.2.5.2. Biología de *Fusarium oxysporum*

Del género *Fusarium* se conocen aproximadamente 50 especies (Benadof, 2010). Las especies que destacan por su importancia económica son *F. oxysporum* (Palmero, 2008), *F. solani* (Mart.) Sacc., *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg., y *F. moniliforme* Sheld. (Montiel-González *et al.*, 2005).

F. oxysporum es un fitopatógeno cosmopolita, siendo más abundante en zonas tropicales y subtropicales (Camacho *et al.*, 2008; González *et al.*, 2005; Garcés *et al.*, 2001; Mora, 2001). Ataca a más de 100 especies de plantas angiospermas y

gimnospermas, entre las que destacan hortalizas anuales y perennes, árboles frutales y ornamentales, de este último grupo destacan el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev.), gladiola (*Gladiolus grandiflora* L.), ciclamen (*Cyclamen* sp.), gerbera (*Gerbera jamesonii* Bolus) (Palmero, 2008; Agrios, 2005; Mendoza, 2002; Vidalie, 1992) y rosa (*Rosa* sp.) (Barguil *et al.*, 2009).

Puede sobrevivir en residuos vegetales en forma de clamidosporas y/o micelio. Se disemina con facilidad a través del agua, insectos, viento, semillas, vegetales infectados, y equipo agrícola contaminado (Alvarado, 2005; Agrios, 2005). Es capaz de causar daño debido a la producción de micotoxinas que afectan el desarrollo de las plantas. Estas sustancias, son consecuencia de metabolitos secundarios producidos cuando el hongo se encuentra en condiciones de estrés (Cullison, 2003).

Una vez que el patógeno penetra a la raíz produce micelio y microconidios que se extienden de forma ascendente a través de los vasos xilématicos, la planta responde al ataque liberando algunos polisacáridos como (gomas y tilosas), los cuales cubren los haces vasculares para impedir que el hongo avance (Agrios, 2005).

El patógeno ocasiona mayores daños cuando el suelo se encuentra saturado de agua y con temperatura de 14-23 °C. El hongo penetra en forma directa a través de las células epidermales, o indirectamente mediante lenticelas, heridas o estomas (Viteri, 2008).

De acuerdo a Mora (2001) y Paulitz *et al.* (2001), las condiciones óptimas para el desarrollo del patógeno son: temperatura entre 20-25 °C, alta intensidad lumínica, humedad relativa de 75-95 % y alta densidad de plantación; sin embargo, los mayores daños se presentan a 37 °C (Cullison, 2003). La planta es más susceptible al ataque del patógeno a concentraciones altas de nitrógeno (Paulitz *et al.*, 2001), siendo más susceptible cuando se adiciona en forma amoniacal y disminuye en forma de nitrato (Agrios, 2005; Daughtrey, 2001).

2.2.5.3. Características morfológicas de *Fusarium oxysporum*

F. oxysporum presenta tres tipos de esporas asexuales: microconidios, macroconidios y clamidosporas (Mora, 2001; Nelson *et al.*, 1981). En medio de cultivo PDA presenta micelio aéreo algodonoso de coloración variable, que va de blanco hasta rosado, violeta, purpura, o morado oscuro (Monzón *et al.*, 2003; Mora, 2001; Nelson *et al.*, 1981; Domsch *et al.*, 1980).

Los microconidios son abundantes, de 5-13 µm de largo por 2.5-4 µm de ancho (Sanabria *et al.*, 2002; Nelson *et al.*, 1981). Presentan de 1 a 2 células, aunque la mayoría no presenta septas, son hialinos, elipsoidales a cilíndricos, esféricos, ovoides, elongados o en forma de riñón; formados sobre fialides (monofialides) laterales, cortas y anchas, simples o sobre conidióforos cortos poco ramificados (cabeza falsa) (Quilambaqui, 2005; Sanabria *et al.*, 2002; Mora, 2001; Rodríguez, 2000).

Los macroconidios presentan pared delgada, son fusiformes, en forma de media luna y multiseptados, generalmente de 3 a 5 septas; formados típicamente en esporodocios;

la célula basal presenta forma de pie, mientras que la célula apical es afilada. En promedio miden 27-46 μm de largo por 3.0-4.5 μm de ancho (Góngora *et al.*, 2006; Sanabria *et al.*, 2002; Mora, 2001; Rodríguez, 2000; Nelson *et al.*, 1981; Domsch *et al.*, 1980).

Las clamidosporas son de pared gruesa, producidas sobre el micelio maduro. Se encuentran dispuestas en el micelio de forma terminal o intercalar, solitarias o en pares, de pared lisa o rugosa, de 5-15 μm de diámetro (McPartland *et al.*, 2000).

2.2.5.4. Sintomatología ocasionada por *Fusarium oxysporum*

El patógeno puede afectar en cualquier etapa el desarrollo de la planta. La enfermedad se manifiesta con clorosis foliar, marchitez, decoloración vascular, achaparramiento, ahogamiento del cuello, pudrición de raíz, lesiones necróticas extensivas en el cuello y base del tallo, clorosis en nervaduras de hojas jóvenes, reducción del sistema radicular, pérdida de turgencia y muerte de la planta (Camacho *et al.*, 2008; Viteri, 2008; Góngora *et al.*, 2006; Agrios, 2005; Alvarado, 2005; González *et al.*, 2005; Montiel-González *et al.*, 2005; Quilambaqui, 2005; Apodaca *et al.*, 2004; Luna *et al.*, 2004; Mendoza, 2002; Mora, 2001; Garcés *et al.*, 2001; Helmuth, 2000).

En plantas jóvenes inicialmente las raíces principales presentan manchas ligeramente rojizas, que posteriormente adquieren coloración que va de rojo oscuro a pardo en los conductos del xilema, y se extiende hasta cubrir la corona del tallo. En un corte transversal del tallo se observa necrosis vascular color café en forma de anillo que se extiende hasta la parte apical de la planta (Carrillo *et al.*, 2003).

El patógeno penetra al sistema vascular a través del xilema no diferenciado en la parte juvenil de las raíces, cuando la endodermis todavía no está formada. En la raíz los síntomas se muestran con pudrición necrótica sobre la raíces laterales más pequeñas acelerando el marchitamiento del follaje (Carrillo *et al.*, 2003). Por lo general el crecimiento de la planta se retarda y cuando el clima es seco las hojas pueden tornarse amarillas e incluso desprenderse de la planta. En ocasiones, aun cuando las plantas no presentan marchitez, decaen y mueren rápidamente (Rosales *et al.*, 2009; Agrios, 2005).

2.2.6. *Ophiostoma* spp. H. y P. Sydow

El género *Ophiostoma* cuenta con 110 especies (Kirk *et al.*, 2001); de éstas, las reportadas en la literatura con mayor frecuencia son: *Ophiostoma virescens* R.W. Davidson, *O. piliferum* (Fries) H. y P. Sydow, *O. ips* (Rumbold) Nannf., *O. minus* (Hedgc.) Syd. y P. Syd., *O. piceae* (Münch) Syd. y P. Syd., *O. pluriannulatum* (Hedgcock) H. P. Sydow, (Seifert, 1999) y *O. ulmi* (Buisman) Nannf. (Harrington *et al.*, 2001). Estos patógenos ocasionan la enfermedad del manchado azul de la madera en especies forestales (Piontelli *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Harrington, 2005; Kirisits, 2004; Paine *et al.*, 1997); y son causantes de importantes pérdidas económicas en bosques de coníferas y cultivos agrícolas tales como frutales (Kamgan *et al.*, 2008; López *et al.*, 2007; Wingfield *et al.*, 1993; Seifert, 1999).

Dentro de las especies afectadas por *Ophiostoma* spp., se encuentran: pino de las alturas (*Pinus hartwegii* Lindl.), olmo (*Ulmus minor* Mill.), encino (*Quercus oleoides*

Schltdl. y Cham.), eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.), hule (*Hevea brasiliensis* Muell.), higo (*Ficus carica* L.), piña (*Ananas sativus* (Lindl) Schult.), plátano (*Musa cavendishii* Lambert y Paxton var. nana), mango (*Mangifera indica* L.), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), camote (*Ipomoea batatas* L.) y cítricos (Gibbs, 1999; Marmolejo y Butin, 1993; Upadhyay, 1981).

En México se han reportado daños a causa de *Ophiostoma abietinum* Marm. y Butin, *O. conicolum* Marm. y Butin, *O. ips* (Rumbold) Nannf, *O. minus* (Hedgc.) Syd. y P. Syd., *O. piceae* (Münch) Syd. y P. Syd., *O. piliferum* (Fries) H. y P. Sydow y *O. Pluriannulata* (Hedgcock) H. y P. Sydow. Marmolejo y Butin (1993); siendo algunas de las especies afectadas: ocote chino (*Pinus leiophylla* Schl. y Cham.), pino canis (*Pinus maximinoi* H.E. Moore), pino blanco (*P. pseudostrobus* Lindl) (Terrazas *et al.*, 2006), oyamel blanco (*Abies vejari* Martínez.), piñón (*Pinus cembroides* Zucc.), pino ocote (*P. teocote* Schiede ex Schltdl. y Cham), pino prieto (*P. Arizona* Engelm.), encino rojo (*Quercus affinis* Scheidw), pino de las alturas (*P. hartwegii* Lindl.) y pino lacio (*P. pseudostrobus* Lindl.) (Marmolejo y Butin 1993).

2.2.6.1. Clasificación taxonómica de *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Melin y

Nannf.

Ophiostoma stenoceras se encuentra ubicado en la siguiente clasificación taxonómica (Piontelli *et al.*, 2006; Kirk *et al.*, 2001).

Dominio: Eucarionte

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Pyrenomycetes

Orden: Ophiostomales

Familia: Ophiostomataceae

Género: *Ophiostoma*

Especie: *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Melin y Nannf.

2.2.6.2. Biología de *Ophiostoma* spp.

Es un hongo cosmopolita, considerado como saprofito o patógeno oportunista. Forma complejas relaciones ecológicas y mutualísticas no sólo con plantas, sino con varios tipos de insectos que actúan como vectores (Terrazas *et al.*, 2006; Harrington, 1999; Paine *et al.*, 1997; Whitney, 1982; Upadhyay, 1981;), principalmente del orden Coleoptera (López *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2006). El vínculo entre estos insectos y el patógeno está relacionado con el hecho de que tanto las estructuras sexuales (peritecios) como asexuales (conidióforos) tienen forma erecta, en la que quedan

embebidas en un líquido mucilaginoso tanto las ascosporas como los conidios (López *et al.*, 2007).

Los daños que ocasiona el patógeno se deben a que afecta el floema y cambium vascular del hospedero (Piontelli *et al.*, 2006; Farrell *et al.*, 2001; Harrington, 1999). Las condiciones óptimas para su crecimiento son: alta humedad, temperatura de 22-30 °C (Seifert, 1999), con una máxima de 40 °C (Schmidt y Czeschlik, 2006), y pH entre 3.5-6.5. La mayoría de las especies de *Ophiostoma* requieren de fuentes de carbono, nitrógeno y vitaminas (tiamina y piridoxina) para su crecimiento; al igual que de ácidos grasos para la producción de peritecios (Seifert, 1999).

2.2.6.3. Características morfológicas de *Ophiostoma stenoceras*

La fase sexual de *Ophiostoma* spp., se caracteriza por presentar un ascocarpo (peritecio) color negro en forma de botella, por lo general con cuello largo el cual puede ser recto u ondulado (Enmend *et al.*, 1991, citado por Zipfel *et al.*, 2006). Ascas desarrolladas en la base del centrum del ascocarpo (Malloch y Blackwell, 1993), son de tipo evanescente, globoso u oval con ocho ascosporas dispuestas en cadenas. Las ascosporas son unicelulares, aseptadas, hialinas, de forma asimétrica, cilíndricas, semilunares, alantoides o reniformes, y se encuentran contenidas en una masa mucilaginosa color amarillento dentro del ostiolo (Enmend *et al.*, 1991, citado por Zipfel *et al.*, 2006; Upadhyay, 1981).

O. stenoceras presenta peritecios con base globosa de 140-200 µm de diámetro, se encuentran superficialmente o inmersos en el tejido, con hifas de 50-160 µm de largo

color café grisáceos, cuello peritecial color negro, alargado, liso, de 310-1100 μm de largo, anchos en la base de 22-40 μm , adelgazándose hacia el ápice de 11-15 μm ancho. Hifas ostiolares simples o ramificadas, septadas, de 25-40 μm de largo, de color café claro en la base tornándose hialinas hacia el ápice. Las ascas no se observan. Las ascosporas son hialinas, alantoides, cilíndricas, reniformes o en forma de gajos de naranja, unicelulares de 2.5-5.5 μm de largo x 1.5-2 μm de ancho (Piontelli *et al.*, 2006).

La fase asexual de *O. stenoceras* (*Sporothrix* sp. Hekt y Perk) presenta abundante micelio fasciculado, hialino y septado. En medio de cultivo avena agar presenta color crema a café oscuro al reverso de la caja Petri. Los conidióforos son abundantes y ocasionalmente ramificados, poco diferenciados, de 15-38 μm de largo, las células conidiogenas apicales se encuentran lateralmente en las hifas. Los conidios son holoblasticos, unicelulares, lisos, hialinos, de pared delgada, claviformes a elipsoidales y subglobosos dispuestos a semejando los pétalos de una flor. Presenta conidios secundarios, dispuestos lateralmente sobre las hifas, escasos, redondos a subglobosos de paredes gruesas, adquiriendo tonalidades café, de 3- 4 μm diámetro (Piontelli *et al.*, 2006).

2.2.6.4. Sintomatología ocasionada por *Ophiostoma stenoceras*

En especies forestales *Ophiostoma* spp., ocasiona pérdida de peso seco de las plantas (Seifert, 1999), además afecta la estética de la madera debido al manchado azul que ocasiona; los daño se presentán en la corteza de los tallos, reduciendo el crecimiento de los árboles y las propiedades estructurales (López *et al.*, 2007; Romón *et al.*, 2007;

Kirisits, 2004; Ciesla, 1988), la cual se manifiesta debido a la pigmentación marrón de las hifas (Seifert, 1999).

La enfermedad ocasionada por *O. stenoceras* se manifiesta con severo amarillamiento en el ápice de la planta, daño cortico vascular de color ámbar a grisáceo en la parte basal y cuello de las plantas. Es común la presencia de galerías de insectos xilófagos (insectos que se alimentan de la madera) junto al micelio fúngico y azulado de la madera (Piontelli *et al.*, 2006; Kåårik, 1980). El patógeno puede ocasionar la muerte de las plantas por sí sólo o en asociación con alguna especie de insectos descortezadores (Harrington, 1999).

2.3. Determinación de patogenicidad a través de los postulados de Koch

Para verificar el agente causal de una enfermedad es necesario establecer la relación entre el microorganismo y la enfermedad que se manifiesta, lo anterior con la finalidad de demostrar la patogenicidad del (los) microorganismo (s). La patogenicidad se define como la capacidad de un organismo para causar una enfermedad (Arauz, 1998).

Rivera (1991) menciona que cuando en una planta se observan lesiones de una enfermedad infecciosa, por lo general se encuentran asociados varios organismos, de los cuales no todos son patógenos, por lo que para discriminar entre ellos se requiere de un procedimiento capaz de comprobar de forma clara y contundente la patogenicidad atribuible a cada organismo, tal procedimiento se conoce como los postulados de Koch (Agrios, 2005), los cuales se describen a continuación:

1. El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen.
2. El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un medio de cultivo puro y deben describirse sus características morfológicas (parasito no obligado).
3. El patógeno que se desarrolle en un medio de cultivo puro, debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
4. El patógeno debe aislarse nuevamente en cultivo puro y sus características deben corresponder a las registradas anteriormente (Agrios, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

En el Estado de México la *Rosa* sp., es uno de los cultivos de mayor importancia económica debido a la superficie cultivada, que en 2011 fue de 673 ha (SIAP, 2012). Este cultivo es afectado por una serie de enfermedades, entre las más importantes destacan aquellas que dañan el área radicular de las plantas; tales daños afectan significativamente la productividad y calidad del producto final.

García-Velasco y colaboradores (2010), determinaron que *Rosellinia necatrix* es el agente causal de la pudrición blanca de raíz en plantas de rosa; sin embargo, en trabajos anteriores, al aislar a *R. necatrix* se obtuvieron de manera consistente a dos especies de hongos en cultivos *in vitro* (Domínguez, 2008, datos no publicados) de raíces de plantas de rosa. Esta información es importante, debido a que en la naturaleza es común encontrar asociaciones de diferentes organismos en una misma planta, los cuales en conjunto pueden incrementar los daños en las plantas infectadas, y por lo tanto dificultar los métodos de manejo, lo que conduce al incremento significativo de los costos de producción.

Por lo anterior es de suma importancia realizar un diagnóstico certero, lo cual contribuirá a realizar un manejo adecuado de las enfermedades que afectan al cultivo, y con esto disminuir los costos de producción y contaminación ambiental a causa de los productos químicos utilizados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la patogenicidad de los dos hongos asociados a *Rosellinia necatrix*, aislados de raíces de plantas de *Rosa* sp.

4.2. Objetivos específicos

1. Aislar y purificar de raíces de plantas de rosa a los dos hongos asociados a *Rosellinia necatrix*.
2. Identificar morfológicamente a nivel de especie a los dos hongos asociados a *Rosellinia necatrix*.
3. Determinar la patogenicidad de *Rosellinia necatrix* y los dos hongos asociados, inoculados individualmente y en asociación.

5. HIPÓTESIS

La presencia de los dos hongos asociados a *Rosellinia necatrix* probablemente contribuye a incrementar los daños a causa de la pudrición blanca de raíz en *Rosa* sp.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Colecta de material enfermo

En mayo del 2009 se colectaron muestras de material vegetal enfermo, proveniente de dos invernaderos de rosa de Santa Ana Ixtlahuatzingo, Tenancingo, Estado de México. Para la toma de muestras se consideraron síntomas típicos ocasionados por *R. necatrix*, los cuales consisten en marchitez, amarillamiento, escaso follaje de color naranja adherido al tallo y cordones miceliales de color blanco a grisáceo en raíz y corona en plantas de rosa.

Las muestras colectadas consistieron en el sistema radicular de las plantas enfermas, los cuales se colocaron en bolsas de polietileno y se transportaron al Laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo, para llevar a cabo el aislamiento y purificación de los hongos.

6.2. Aislamiento y purificación de los hongos asociados a *R. necatrix*

Las raíces enfermas cubiertas con cordones miceliales, se lavaron con agua potable para eliminar los residuos de suelo. De cada raíz se cortaron los ápices en trozos de aproximadamente 1 mm de grosor, estos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2 % (Clorox®) durante 2 minutos, en seguida se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron con papel absorbente estéril y se colocaron en cajas Petri estériles con papel absorbente estéril, y se incubaron durante 24 h a temperatura

ambiente para eliminar el resto de humedad en el tejido (Técnica propuesta por Ayala, 2008; Domínguez, 2008).

La siembra se llevó a cabo en cajas Petri con medio de cultivo jugo V8 agar (Herdez®) (V8-A) (anexo 1), para lo cual el tejido de raíz se sembró sumergiéndolo en el medio de cultivo. Las siembras se mantuvieron en obscuridad a 25 °C dentro de una incubadora microbiológica (LINDBERG/BLUEM®).

Las siembras fueron revisadas diariamente bajo microscopio estereoscópico (Carl Zeiss®) para detectar la zona de crecimiento de cada colonia. Por otro lado, con la finalidad de detectar las características morfológicas de cada especie se realizaron preparaciones temporales teñidas con azul de algodón, las cuales se observaron bajo microscopio compuesto (Carl Zeiss®).

Posteriormente, se procedió a purificar a las dos especies obtenidas, diferentes a *R. necatrix*, en los medios de cultivo V8-A y papa dextrosa agar (PDA) (Bioxon®).

6.3. Identificación de los hongos aislados

Para la identificación, se consideraron las características culturales y morfológicas de cada uno de los hongos obtenidos. Para el registro de las características culturales de las colonias, las cajas Petri se observaron bajo microscopio estereoscópico. Para la observación de las estructuras reproductivas de los hongos se realizaron preparaciones semipermanentes observadas bajo microscopio compuesto.

6.3.1. Identificación cultural y morfológica del hongo 1

Se utilizaron colonias de 7-10 días de edad crecidas en los medios de cultivo harina de avena-agar (OMA) (anexo 2) y harina de maíz-agar (CMA) (anexo 3) (Hawksworth *et al.*, 1995). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 25 °C dentro de una incubadora microbiológica.

Las características culturales registradas consistieron en: color, forma y textura de la colonia en cada uno de los medios de cultivo. Por otro lado, para la identificación morfológica se consideraron la forma, color, número de células y tamaño de las estructuras producidas. La identificación se llevó a cabo utilizando claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1998) y literatura especializada (Piontelli *et al.*, 2006; Aghayeva *et al.*, 2004; Upadhyay, 1981; Aoshima, 1965 y Davidson, 1942).

Para corroborar la identificación morfológica, de manera independiente a este trabajo, se realizó la identificación molecular en el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco Estado de México. Esta se realizó amplificando y secuenciando la región ITS1 e ITS2 del ADNr utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Las secuencias obtenidas se compararon con las reportadas en la base de datos del GenBank-NCBI (www.ncbi.nlm.gov) (NCBI, 2012).

6.3.2. Identificación cultural y morfológica del hongo 2

Se utilizaron colonias de 6-10 días de edad crecidas en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (Silva, 2006). Los cultivos se mantuvieron en condiciones de obscuridad a 25 °C dentro de una incubadora microbiológica.

Las características culturales registradas fueron: color, forma y consistencia de la colonia. Por otro lado, las características morfológicas registradas consistieron en: tamaño, forma, color y número de células de las estructuras. Una vez que se registraron dichas características, se procedió a realizar la identificación utilizando claves taxonómicas (Barnett y Hunter, 1998) y literatura especializada (Vázquez *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2004; González *et al.*, 2004; McPartland *et al.*, 2000; Romero-Cova, 1993).

Para corroborar la identificación morfológica, de manera independiente a este trabajo, se realizó la identificación molecular en el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Posgraduados, Montecillo, Texcoco Estado de México. Esta se realizó amplificando y secuenciando la región ITS1 e ITS2 del ADNr con la técnica de PCR. Las secuencias obtenidas se compararon con las reportadas en la base de datos del GenBank-NCBI (www.ncbi.nlm.gov) (NCBI, 2012).

6.4. Determinación de patogenicidad de *R. necatrix* hongo 1 y hongo 2, inoculados individualmente y en asociación

La cepa utilizada de *R. necatrix*, fue proporcionada por el laboratorio de Fitopatología del Centro Universitario UAEM Tenancingo.

La determinación de patogenicidad de cada uno de los hongos se llevó a cabo en las siguientes etapas: 1) Plantación y mantenimiento de plantas de rosa, 2) Incremento de inoculó, 3) Inoculación del (los) hongo (s) en las plantas de rosa y 4) Reaislamiento del (los) hongos (s) inoculados.

6.4.1. Plantación y mantenimiento de plantas de *Rosa* sp.

Para la plantación se utilizó una mezcla de sustrato de tepojal + peatmoss (2:3) desinfectado con Bunema® (ingrediente activo metam sodio) a una dosis de 1 L/200 L de agua, aplicado en drench. Previo a su utilización, el sustrato se dejó reposar durante 30 días.

Con el sustrato desinfectado, se llenaron macetas de 12 pulgadas y se procedió a la plantación de las plantas de *Rosa* sp., cultivar Royal Baccara, injertadas en patrón Manetti.

Después del establecimiento, las plantas se fertilizaron cada tercer día durante dos semanas con Ultrasol® MAP (12-61-00) a dosis de 0.75 g/planta y Sinerba plus® (ácidos húmicos, fúlvicos, potasio, activadores fisiológicos y metabólicos) a dosis de 20 mL/planta.

6.4.2. Incremento del inoculó *R. necatrix*, hongo 1 y hongo 2

El incremento de inoculó de *R. necatrix* se realizó en semillas de trigo (*Triticum* sp.), las cuales previamente se sometieron a un proceso de esterilización, realizado de la siguiente manera: en un matraz Erlenmeyer de 500 mL se colocaron 380 g de semillas humedecidas con 350 mL de agua destilada y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio durante 24 h, después de este tiempo se eliminó el agua. Posteriormente las semillas se esterilizaron durante 40 minutos a 125 °C a una presión de 1.5 kg/cm², por tres días consecutivos.

Las semillas estériles se inocularon con *R. necatrix*, el matraz se selló con papel aluminio y se mantuvo en incubadora a 25 °C bajo condiciones de obscuridad durante tres semanas.

Los hongos 1 y 2 se incrementaron en medio de cultivo papa dextrosa (PD) (anexo 4) (Santos *et al.*, 2010), por separado los dos hongos se sembraron en matraces Erlenmeyer de 250 mL con medio de cultivo, los cuales se sellaron con papel aluminio y se mantuvieron bajo condiciones de laboratorio a 20 ± 5 °C, en un agitador orbital (Shaker®) a 165 rpm durante tres semanas.

6.4.3. Inoculación de *R. necatrix*, hongo 1 y hongo 2

La inoculación de los hongos se realizó a los 91 días después del trasplante. Con la finalidad de homogeneizar la distribución del inoculo en el sustrato se utilizó un aro de madera de 14.5 cm de diámetro colocado alrededor del tallo de la planta; en éste diámetro se removieron 2 cm de profundidad del sustrato para descubrir las raíces, y a

cuatro de éstas se les realizó una herida de 1 cm de longitud con un bisturí estéril, e inmediatamente se realizó la inoculación, de acuerdo al tratamiento correspondiente (Cuadro 1).

Los hongos 1 y 2 se inocularon con una suspensión de 125 mL a una concentración de 1×10^6 conidios/mL (Santos *et al.*, 2010; Silva, 2006; Duran-González *et al.*, 1993). *R. necatrix* se inoculó adicionando al sustrato 20 g de semillas de trigo colonizadas (Palomo-Ríos *et al.*, 2011; Hsiao *et al.*, 2007; Mansilla *et al.*, 2002).

Cuadro 1. Inoculación de *R. necatrix*, hongo 1 y hongo 2 en plantas de *Rosa* sp., variedad Royal Baccara injertadas en patrón Manetti

Tratamiento	Hongo 1	Hongo 2	<i>R. necatrix</i>
T1	+	-	-
T2	-	+	-
T3	-	-	+
T4	+	+	-
T5	-	+	+
T6	+	-	+
T7	+	+	+
T8	-	-	-

- = Sin inoculo, + = Con inoculo

Adicionalmente, se registró la temperatura del sustrato para determinar si ésta era la adecuada para el desarrollo de los hongos, utilizando un termómetro de superficie (marca Trend®) la cual se enterró en el sustrato a una profundidad de 15 cm. Esta se revisó diariamente dos veces al día, la primera a las 8:00 am y la segunda a las 14:00 pm.

6.4.4. Reaislamiento de los hongos inoculados en plantas de *Rosa* sp.

Para el reaislamiento de los hongos inoculados, independientemente de la presencia o ausencia de enfermedad, se tomaron al azar tres plantas por cada tratamiento y posteriormente se realizó el procedimiento para llevar a cabo el aislamiento y purificación, descrito en el apartado 6.2.

Para reaislar a *R. necatrix* se utilizó el medio de cultivo V8-A y para los hongos 1 y 2 medio PDA. De cada planta se sembraron cuatro cajas Petri con 5 trozos de raíz, dando un total de 12 cajas Petri por tratamiento. Las siembras se mantuvieron en oscuridad a 25 °C en una incubadora microbiológica.

6.4.5. Variables evaluadas en plantas de rosa inoculadas

Por cada tratamiento se evaluaron las siguientes variables:

1. Incidencia de la enfermedad: Diariamente se revisaron las plantas inoculadas y se registró la presencia o ausencia de los síntomas en la planta.
2. Tiempo de aparición de síntomas: Se registró el desarrollo de la enfermedad respecto al tiempo y la sintomatología que manifestaban las plantas inoculadas.
3. Altura de la planta: Se evaluó cada 15 días, para lo cual se utilizó una regla métrica, y se calculó a partir de la base de la planta hasta el ápice del tallo principal.
4. Peso seco de raíz: A los 85 días después de la inoculación (ddi), se extrajeron al azar ocho plantas por tratamiento e inmediatamente se cortaron y lavaron las

raíces con agua potable para eliminar el sustrato adherido a éstas, y se secaron con papel absorbente estéril. Las raíces se cortaron en trozos y se colocaron en bolsas perforadas de papel estraza, y se colocaron dentro de una horno de secado (Felisa®) a 70 °C durante 5 días; transcurrido este periodo de tiempo se determinó el peso seco con la utilización de una balanza granataria (Ohaus®).

6.5. Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento se realizó con un diseño experimental completamente al azar, mediante arreglo factorial, en el que se consideraron tres factores y dos niveles, siendo los factores los tres hongos inoculados (hongo 1, hongo 2 y *R. necatrix*) y los niveles su presencia o ausencia (+, -). Se tuvieron ocho tratamientos cada uno con 16 repeticiones, según el siguiente modelo matemático:

$$Y_i = \mu + A + B + C + AxB + AxC + BxC + AxBxC + EE$$

Donde: Y_i = variables evaluadas (Altura de la planta, peso seco), μ = media poblacional, A = hongo 1, B = hongo 2, C = *R. necatrix*, AxB = Interacción hongo 1 y hongo 2, AxC = Interacción hongo 1 y *R. necatrix*, BxC = Interacción hongo 2 y *R. necatrix*, $AxBxC$ = Interacción hongo 1, hongo 2 y *R. nectarix* y EE = error estándar.

La comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Los datos se analizaron con el programa InfoStat versión 2008.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento de hongos asociados a *R. necatrix*

En las siembras realizadas se encontró la presencia de dos hongos diferentes a *Rosellinia necatrix*. Estos se diferenciaron por color y forma de crecimiento en el medio de cultivo; además de sus características morfológicas.

7.2. Identificación de los hongos aislados en asociación con *R. necatrix*

7.2.1. Identificación del hongo 1

Este hongo presentó abundante crecimiento micelial y desarrollo de peritecios en medio de cultivo OMA, mientras que en CMA el crecimiento fue lento y sin formación de peritecios. Por lo tanto, las características consideradas para llevar a cabo la identificación fueron las registradas en OMA (Figura 1).

Las características culturales observadas fueron: micelio abundante color blanco y superficial con crecimiento redondo simétrico y de borde regular (Figura 1I).

Se encontraron peritecios de base globosa (Figura 1B), de 140 μm de diámetro, superficiales o parcialmente inmersos en el medio de cultivo, cuello peritecial liso y color negro de 453 μm de largo, ancho en la base de 40.3 μm , adelgazándose en el ápice de 15 μm (Figura 1E); hifas ostiolares de 35 μm , divergentes, simples y septadas, color café en la base y hialinas hacia el ápice (Figura 1D, F). No se observaron ascas,

ascosporas hialinas, en forma de gajos de naranja, unicelulares de 2.7-2.9x4.7-6.0 μm (Figura 1C).

De acuerdo a estas características correspondientes a la fase sexual el hongo se identificó como *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Melin & Nannf. (Piontelli *et al.*, 2006; Aghayeva *et al.*, 2004; Upadhyay, 1981; Aoshima, 1965; Davidson, 1942).

Además se observaron estructuras correspondientes a la fase asexual (*Sporothrix* sp.), entre éstas conidios de 5.39 μm de largo x 2.75 μm de ancho, hialinos, unicelulares, lisos, raramente subglobosos, dispuestos en forma de flor (Figura 1H). Conidios secundarios escasos, dispuestos lateralmente sobre las hifas, redondos a subglobosos con pared gruesa, de 3.3 μm de diámetro (Figura 1G) (Piontelli *et al.*, 2006; Barnett y Hunter 1998).

La identificación morfológica coincidió con la identificación molecular, en donde al alinear la secuencia (anexo 5) con las reportadas en la base de datos del GenBank-NCBI se obtuvo el 100 % de similitud con *O. stenoceras* (secuencia homóloga con numero de acceso JX028584.1).

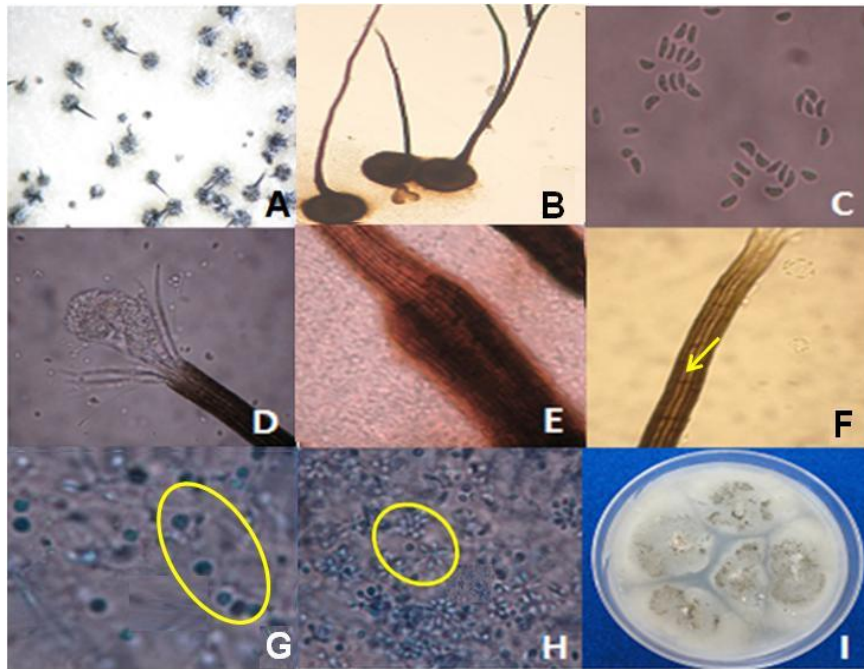


Figura 1. Características morfológicas de *O. stenoceras* en medio de cultivo OMA. A) peritecios color negro, sobre el micelio superficial blanco, B) peritecios con base globosa (40x), C) ascosporas en forma de gajos de naranja (100x), D) expulsión de ascosporas por el canal ostiolar (100x), E) cuello de peritecio ancho en la base adelgazándose en el apice (100x), F) hifas ostiolares septadas (40x), G) conidios secundarios subglobosos (100x) fase asexual (*Sporothrix* sp.), H) conidios agrupados en forma de flor (*Sporothrix* sp.), I) micelio superficial abundante color blanco.

7.2.2. Identificación del hongo 2

En medio de cultivo PDA el hongo presentó micelio aéreo, algodónoso, inicialmente de color blanco que posteriormente se tornó a purpura (Figura 2A). Presentó tres tipos de esporas asexuales: macroconidios, microconidios y clamidosporas. Los macroconidios midieron 25-60 x 3-4.5 μm (largo x ancho) con 3 a 5 septas, hialinos, de forma variable predominando fusiformes, alargados, ligeramente curvados y puntiagudos en ambos extremos, la célula apical presentó forma de gancho y la célula basal forma de pie (Figura 2B).

Los microconidios fueron abundantes y midieron 6.6-6.7 x 2.73-2.57 μm , sin septas, hialinos, elipsoidales o cilíndricos, rectos o curvados, formados sobre fialides laterales simples o cortas o sobre conidióforos poco ramificados (Figura 2B).

Las clamidosporas fueron abundantes, con pared lisa o rugosa, midieron 7.6-9.3 μm de diámetro, hialinas, intercalares solitarias o agrupadas (Figura 2C) y en ocasiones terminales solitarias o dispuestas en cadenas cortas (Figura 2D).

De acuerdo a las características culturales, morfológicas y morfométricas éste hongo se identificó como *Fusarium oxysporum* Schlechtend (Vázquez *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2004; González *et al.*, 2004; Mcpartland *et al.*, 2000; Barnett y Hunter 1998; Romero Cova, 1993); lo cual coincidió con la identificación molecular, en donde al alinear la secuencia (anexo 6) con las reportadas en la base de datos del GenBank-NCBI se obtuvo el 100 % de similitud con *F. oxysporum* (secuencia homóloga con número de acceso KC200103.1).

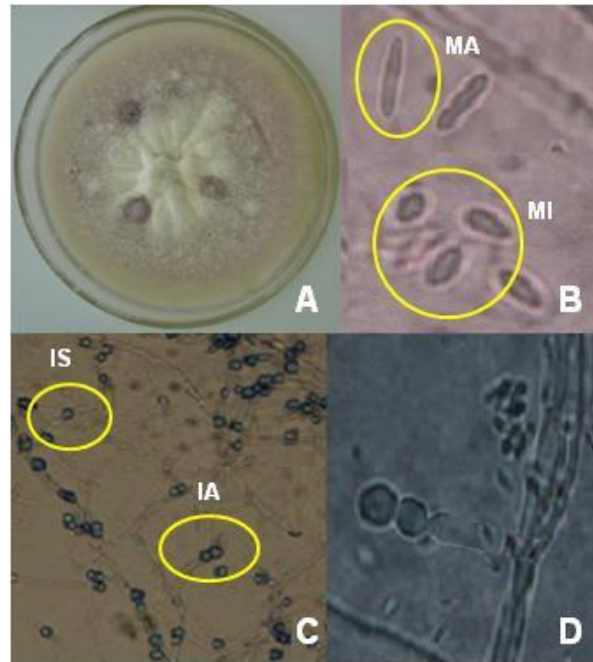


Figura 2. Características morfológicas de *F. oxysporum* en medio de cultivo PDA. A) micelio algodonoso de color blanco a púrpura, B) macroconidios (MA) y microconidios (MI) (100x), C) clamidosporas intercalares solitarias (IS) y clamidosporas intercalares agrupadas (IA) (10x), D) clamidosporas terminales dispuestas en cadena (100x).

7.3. Determinación de patogenicidad de *Rosellinia necatrix*, *Ophiostoma stenoceras* y *Fusarium oxysporum*.

7.3.1. Incidencia de la enfermedad

La temperatura promedio del sustrato durante el periodo de evaluación a las 8:00 am fue de 8.5 °C (máxima 15 °C y mínima 4.5 °C) y a las 2:00 pm de 18.6 °C (máxima 27 °C y mínima 10 °C).

Se registró incidencia del 100 % en los tratamientos donde se inoculó de manera individual a *R. necatrix* (T3) y en asociación con *O. stenoceras* (T6) o *F. oxysporum*

(T5), en T7 donde se inocularon los tres hongos la incidencia registrada fue del 93.8 %, mientras que en el tratamiento donde se inoculó individualmente a *O. stenoceras* (T1) esta fue del 6.3 %; por otro lado cuando se inoculó a *O. stenoceras* asociado con *F. oxysporum* (T4) la incidencia fue del 18.8 %. Es importante destacar que en el tratamiento donde se inoculó de manera individual a *F. oxysporum* (T2) las plantas permanecieron sanas durante todo el periodo de evaluación, al igual que el testigo (T8) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Incidencia de la enfermedad en plantas de *Rosa* sp., inoculadas con *O. stenoceras*, *F. oxysporum* y/o *R. necatrix*.

Tratamiento	<i>O. stenoceras</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. necatrix</i>	Incidencia (%)
T1	+	-	-	6.3
T2	-	+	-	0
T3	-	-	+	100
T4	+	+	-	18.8
T5	-	+	+	100
T6	+	-	+	100
T7	+	+	+	93.8
T8	-	-	-	0

- = Sin inóculo, + = Con inóculo



Figura 3. Incidencia de la enfermedad. A) plantas sanas al momento del establecimiento del experimento, B) y C) plantas enfermas inoculadas con *R. necatrix*, *O. stenoceras* y/o *F. oxysporum*, D) izquierda: planta sana, derecha: planta enferma.

7.3.2. Síntomas observados en las plantas inoculadas

El tiempo en el que se manifestaron los síntomas en las plantas de rosa estuvo en función del (los) hongo (s) inoculado (s) y aumentó gradualmente hasta llegar en algunos casos a la muerte de las plantas. En T7 los síntomas, en las primeras plantas, se manifestaron a partir de los 12 ddi, en T6 a los 22 ddi, en T3 a los 26 ddi, en T5 a los 30 ddi y en T1 y T4 a los 62 ddi.

De manera general los síntomas que se manifestaron en follaje fueron marchitez y/o amarillamiento. En los tratamientos donde se inoculó a *R. necatrix* (T3, T5, T6, T7) se presentaron dos tipos de síntomas: A) El 46.2 % de las plantas enfermas mostraron marchitez total del follaje, y a medida que transcurrió el tiempo algunos tallos se defoliaron, pero en su mayoría las hojas permanecieron adheridas al tallo tomando una coloración marrón brillante; y B) El 53.8% de las plantas enfermas presentaron pequeño y escaso follaje y amarillamiento, que a medida que transcurrió el tiempo se marchitó.

En ambos casos los tallos presentaron coloración verde (Cuadro 3, Figura 4). Por otro lado se presentó escaso desarrollo radicular, pudrición y cordones miceliales color blanco a gris que cubrían las raíces (Cuadro 3, Figura 5).

En los tratamientos donde se inoculó de manera individual a *O. stenoceras* (T1) y la combinación entre *O. stenoceras* y *F. oxysporum* (T4) los síntomas observados en la parte aérea fueron amarillamiento de las hojas provocando la defoliación (Cuadro 3, Figura 4) y la raíz permaneció sana durante el periodo de evaluación (Cuadro 3, Figura 5).

La muerte de las plantas se presentó a partir de los 39 ddi en los tratamientos T3, T5, T6 y T7 y aumentó paulatinamente, presentando hasta el final del experimento el 87.5 % de mortalidad en T3 y el 62.5 % en T5, T6 y T7. En T1 y T4 aún cuando se manifestaron síntomas no se presentó la muerte de ninguna planta durante todo el periodo de evaluación (Cuadro 3).

Cuadro 3. Sintomatología registrada en follaje, área radicular y muerte de plantas de *Rosa* sp., inoculadas con *O. stenoceras*, *F. oxysporum* y/o *R. necatrix*.

Tratamiento	Follaje		Raíz			
	Amarillamiento	Marchitez	Escaso desarrollo	Pudrición	Cordones miceliales	Muerte (ddi)
T1	+	-	-	-	-	-
T2	-	-	-	-	-	-
T3	+	+	+	+	+	39
T4	+	-	-	-	-	-
T5	+	+	+	+	+	39
T6	+	+	+	+	+	39
T7	+	+	+	+	+	39
T8	-	-	-	-	-	-

- = Ausencia, + = Presencia, ddi: días después de la inoculación.



Figura 4. Síntomas en la parte aérea de plantas de *Rosa* sp., variedad Royal Baccara, injertadas en patrón Manetti inoculadas con: (T1) *O. stenoceras*, (T2) *F. oxysporum*, (T3) *R. necatrix*, (T4) *O. stenoceras* + *Fusarium oxysporum*, (T5) *F. oxysporum* + *R. necatrix*, (T6) *O. stenoceras* + *R. necatrix*, (T7) *O. stenoceras*+ *F. oxysporum* + *R. necatrix*, (T8) sin inocular (testigo).

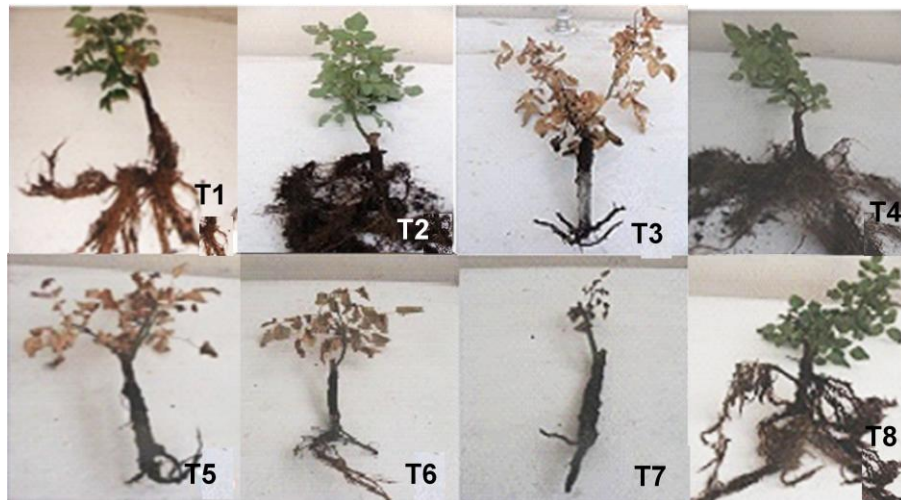


Figura 5. Daños en raíz de plantas de *Rosa* sp. Variedad Royal Baccara injertadas en patrón Manetti inoculadas con:(T1) *O. stenoceras*, (T2) *F. oxysporum*, (T3) *R. necatrix*, (T4) *O. stenoceras* + *F. oxysporum*, (T5) *F. oxysporum* + *R. necatrix*, (T6) *O. stenoceras* + *R. necatrix*, (T7) *O. stenoceras* + *F. oxysporum* + *R. necatrix*, (T8) sin inocular (testigo).

7.3.3. Altura de planta

Al final del periodo de evaluación (85 ddi) el análisis mediante arreglo factorial bajo diseño completamente aleatorizado mostró diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) en el incremento de la altura de las plantas inoculadas con los hongos. De acuerdo a la comparación de medias, con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), los tratamientos resultaron en cinco grupos estadísticamente diferentes.

En un grupo se conjuntaron los tratamientos en los cuales se inoculó a *R. necatrix* de manera individual y en conjunto con *O. stenoceras* y/o *F. oxysporum*; en este grupo se observa que la altura de la planta se redujo considerablemente hasta en un 98.3 %, con respecto al testigo sin inocular (T8).

También se observa que de manera individual *O. stenoceras* y *F. oxysporum* reducen el crecimiento de la planta, pero en menor proporción que cuando se encuentran con *R. necatrix*. Por otro lado, cuando se inoculó en asociación a *O. stenoceras* y *F. oxysporum* se tuvo mayor crecimiento de las plantas en contraste cuando se inocularon individualmente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Incremento de la altura de las plantas de *Rosa* sp., inoculadas con *O. stenoceras*, *F. oxysporum* y/o *R. necatrix*, a los día 85 ddi.

Tratamiento	<i>O. stenoceras</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. necatrix</i>	Medias (cm) [*]
T8	-	-	-	21.91 ^A
T4	+	+	-	17.66 ^{AB}
T2	-	+	-	10.63 ^{ABC}
T1	+	-	-	8.59 ^{BC}
T7	+	+	+	2.56 ^C
T5	-	+	+	1.53 ^C
T6	+	-	+	1.16 ^C
T3	-	-	+	0.37 ^C

- = Sin inoculo, + = Con inoculo, n= 16, EE= 2.86

^{*}Columna con diferente letra indica diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey P<0.05.

7.3.4. Peso seco de raíz

Al final del periodo de evaluación (85 ddi) el análisis mediante arreglo factorial bajo diseño completamente aleatorizado mostró diferencias estadísticas significativas (P<0.05) en el peso seco de raíz de las plantas de rosa inoculadas con los hongos. De acuerdo a la comparación de medias, con la prueba de Tukey (P<0.05), los resultados se agruparon en tres grupos estadísticamente diferentes.

En un grupo se encuentran los tratamientos donde se inoculó de manera individual a *R. necatrix* (T3) y en combinación con *O. stenoceras* y *F. oxysporum* (T7), en los cuales se observa el menor peso seco de raíz en comparación con los demás tratamientos.

Adicionalmente, aun cuando no hubo diferencias estadísticas significativas (P<0.05), se observa que *O. stenoceras* y *F. oxysporum* inoculados en combinación con *R. necatrix*, T6 y T5 respectivamente, también causan disminución significativa en el peso seco de raíz, en contraste cuando ambos hongos se inocularon individualmente (T1 y T2).

El mayor peso seco se obtuvo cuando se inocularon en asociación *O. stenoceras* y *F. oxysporum* (T4), siendo estadísticamente diferente al testigo (T8) ($P < 0.05$) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Peso seco de raíz de plantas de *Rosa* sp., inoculadas con *O. stenoceras*, *F. oxysporum* y/o *R. necatrix*.

Tratamiento	<i>O. stenoceras</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. necatrix</i>	Peso seco (g)*
T4	+	+	-	18.45 ^A
T8	-	-	-	18.1 ^{A B}
T2	-	+	-	18.09 ^{A B}
T1	+	-	-	17.58 ^{A B}
T6	+	-	+	14.91 ^{A B}
T5	-	+	+	14.49 ^{A B}
T3	-	-	+	13.78 ^B
T7	+	+	+	13.73 ^B

- = Sin inóculo, + = Con inóculo, n= 8, EE= 17.18

* Columna con diferente letra indica diferencias estadísticas significativas. Comparación de medias Tukey ($P < 0.05$).

7.4. Reaislamiento

Los hongos inoculados en las plantas de rosa se recuperaron por medio de siembras *in vitro* realizadas de cada uno de los tratamientos, independientemente de la presencia o ausencia de síntomas en las plantas (Figura 6, Cuadro 2); siendo diferente la frecuencia con la cual cada uno de estos fue reaislado (Figura 6). De acuerdo a lo anterior se confirma que las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, aun cuando no presentaron síntomas en la parte aérea y radicular, efectivamente se encontraron en contacto directo con el hongo, en contraste cuando se inoculó en conjunto con *O. stenoceras* ambos ocasionaron daños en las plantas (Cuadro 2). Por otro lado en T8 (testigo) no se aisló ninguno de estos hongos en los cultivos *in vitro* (Figura 6).

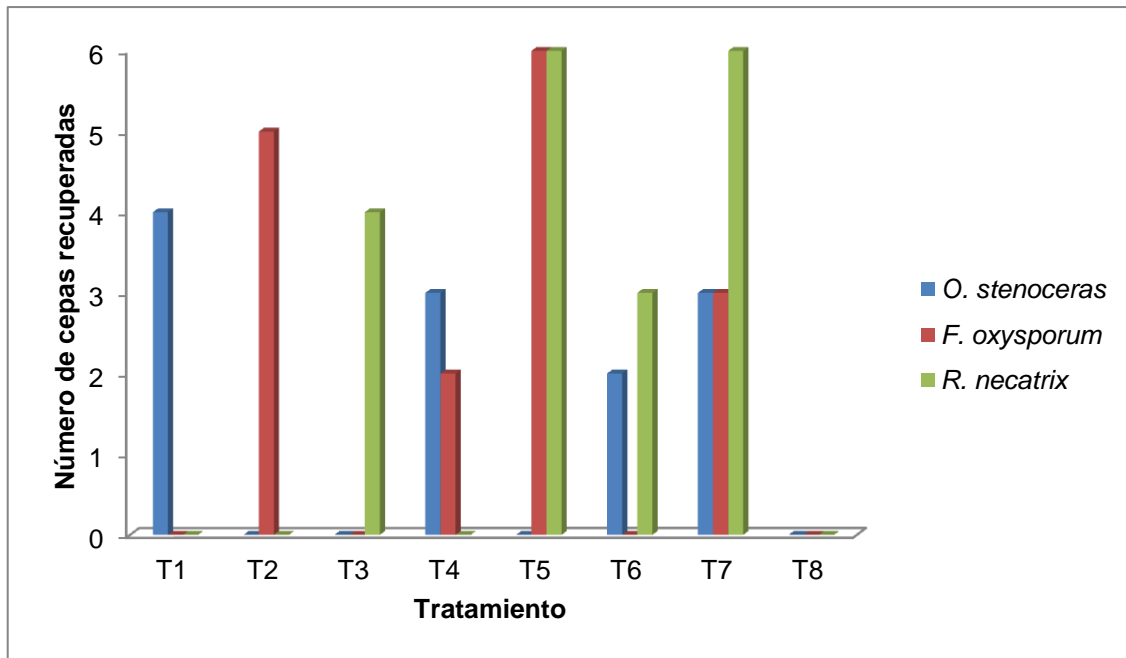


Figura 6. Recuperación *in vitro* de *O. stenoceras*, *F. oxysporum* y/o *R. necatrix*, inoculados en plantas de rosa. (T1= *O. stenoceras*, T2= *F. oxysporum*, T3= *R. necatrix*, T4= *O. stenoceras* + *F. oxysporum*, T5= *F. oxysporum* + *R. necatrix*, T6= *O. stenoceras* + *R. necatrix*, T7= *O. stenoceras* + *F. oxysporum* + *R. necatrix*, T8= Testigo)

8. DISCUSIÓN

En las siembras realizadas a partir de raíces de plantas de *Rosa* sp., se aislaron a dos especies de hongos diferentes a *R. necatrix*, lo cual coincide con trabajos anteriores en donde al aislar a *R. necatrix* también se obtuvieron dos especies de hongos en los cultivos *in vitro* (Domínguez, 2008, datos no publicados). De acuerdo a las características morfológicas los hongos se identificaron como *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Melin y Nannf., (anamorfo *Sporothrix* sp. Hekt y Perk.) (Piontelli *et al.*, 2006; Aghayeva *et al.*, 2004; Barnett y Hunter 1998; Upadhyay, 1981; Aoshima, 1965; Davidson, 1942) (Figura 1) y *Fusarium oxysporum* Schlechtend (Vázquez *et al.*, 2009; Cabrera *et al.*, 2004; González *et al.*, 2004; Mcpartland *et al.*, 2000; Barnett y Hunter 1998; Romero-Cova, 1993) (Figura 2).

El sustrato en el que establecieron las plantas de rosa para realizar las pruebas de patogenicidad, presentó una temperatura de 4.5-27 °C durante todo el periodo de evaluación. En la literatura se reporta que la temperatura óptima para el desarrollo de *R. necatrix* es de 20-25 °C (Ploetz, 2003; Mendoza *et al.*, 1993), para *F. oxysporum* de 14-23 °C (Viteri, 2008), e incluso entre 20-25 °C (Mora, 2001; Paulitz *et al.*, 2001) y para *O. stenoceras* de 22-30 °C (Seifert, 1999), de acuerdo a lo anterior la temperatura registrada en esta investigación se encuentra dentro de los intervalos para el desarrollo de los hongos.

El grado de patogenicidad estuvo en función del (los) hongo (s) inoculado (s). Se observó incidencia del 6.3 % en T1, 18.8 % en T4, 93.8 % en T7, 100 % en T3, T5, T6

y el 0% en T2 y T8 (Cuadro 2, Figura 3). De acuerdo a lo anterior la mayor incidencia se presentó en los tratamientos donde se inoculó a *R. necatrix* de manera individual y en asociación con *F. oxysporum* y/o *O. stenoceras*. Es importante destacar que en los tratamientos en los que se inoculó a *R. necatrix* (T3, T5, T6 y T7) las plantas presentaron menor crecimiento y menor peso seco de raíz (Cuadro 4 y 5); al respecto se han realizado estudios en los que se reporta que este patógeno ocasiona disminución en el crecimiento (López-Herrera, 2000) y en el peso seco de raíz de plantas de aguacate infectadas (López-Herrera *et al.*, 1999).

En el tratamiento donde se inoculó de manera individual a *O. stenoceras* (T1) se presentó una incidencia del 6.3 % (Cuadro 2) y una reducción significativa en el crecimiento de la planta con respecto al testigo (Cuadro 4). En la literatura no se tienen reportes de la presencia de este hongo causando daños en plantas de rosa; sin embargo, se reporta que el género *Ophiostoma* sp., ataca principalmente a coníferas, olmo, frutales, latifoliadas, entre otras especies de angiospermas (López *et al.*, 2007; Jacobs *et al.*, 2001; Wingfield *et al.*, 1993; Harrington y Cobb, 1988), en las cuales puede ocasionar disminuciones significativas en el peso seco (Seifert, 1999).

En el tratamiento donde se inoculó a *F. oxysporum* (T2), no se presentaron síntomas ni signos de la enfermedad durante el periodo de evaluación (Cuadro 2 y 3); sin embargo se ha reportado que este hongo puede ser patogénico en plántulas injertadas de rosa (Barguil *et al.*, 2009), es importante mencionar que en este reporte no se menciona la variedad, patrón y días después de la inoculación en los cuales se manifestaron los síntomas, información útil para el presente estudio. Aun cuando no se presentaron

daños visuales a causa de *F. oxysporum*, se registró disminución en el crecimiento de la planta y en el peso seco de la raíz (Cuadro 4 y 5). Al respecto se ha reportado que el patógeno puede ocasionar reducción en el crecimiento (Bruna, 1991), y en el peso seco de raíz (Corpas *et al.*, 2006) de las plantas atacadas.

En el tratamiento donde se inoculó a *F. oxysporum* y *O. stenoceras* (T4), se presentó una incidencia del 18.8 % (Cuadro 2), por lo que puede suponerse la existencia de sinergismo entre estos hongos, ya que cuando se inocularon individualmente la incidencia fue menor. Stakman y Harrar (1968), mencionan que el sinergismo es la facultad que tienen los organismos para desarrollarse mejor o producir mayores efectos cuando están asociados que cuando lo hacen cada uno por separado; como ejemplos mencionan a la asociación entre *Diplodia natalensis* Pole Evans y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc., los cuales producen mayores daños en la corteza de los cítricos que el que pueden producir cada uno por sí sólo; otro caso son *Oosporacitri aurentii* (Ferraris) Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc., los cuales en conjunto son capaces de ocasionar pudrición en frutos de cítricos más rápidamente que cuando se encuentran de manera individual.

Se presentaron dos tipos de síntomas en los tratamientos donde se inoculó a *R. necatrix* (T3, T5, T6, T7), por un lado se observó marchitez total en el follaje, y a medida que transcurrió el tiempo algunos tallos se defoliaron, pero en su mayoría las hojas permanecieron adheridas al tallo tomando una coloración marrón brillante; y por otro las plantas presentaron pequeño y escaso follaje y amarillamiento, que a medida que transcurrió el tiempo se marchitó. En ambos casos los tallos presentaron coloración

verde en la corteza. También se presentó escaso desarrollo radicular, pudrición y cordones miceliales color blanco a gris que cubrían las raíces (Cuadro 3, Figura 4 y 5). Estos síntomas coinciden con lo reportando por García-Velasco *et al.*, (2012) y Domínguez (2008), en plantas de rosa. Además se confirma que *R. necatrix* es el agente causal de la enfermedad de la pudrición blanca de raíz en rosa (García-Velasco y colaboradores, 2010).

En los tratamientos donde se inoculó de manera individual a *O. stenoceras* (T1) y en combinación con *F. oxysporum* (T4), los síntomas observados en la parte aérea fueron amarillamiento, y defoliación; mientras que la raíz permaneció sana durante todo el periodo de evaluación (Cuadro 3, Figura 4 y 5). En la literatura se reporta que especies del género *Ophistostoma* spp., ocasionan la enfermedad del manchado azul de la madera en especies forestales (Piontelli *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Harrington, 2005; Kirisits, 2004; Paine *et al.*, 1997). Piontelli *et al.* (2006), reportan que *O. stenoceras* causa daño cortico vascular y amarillamiento foliar en árboles de *Eucalyptus* sp., siendo este último síntoma observado en las plantas de rosa inoculadas con el hongo de manera individual y en asociación con *F. oxysporum*. Es importante destacar que los síntomas de amarillamiento y defoliación también han sido reportado por Barguil *et al.* (2009) en plántulas de rosa dañadas por *F. oxysporum*.

La muerte de las plantas se presentó a los 39 ddi, solamente en los tratamientos donde se inoculó a *R. necatrix* de manera individual y en asociación con *F. oxysporum* y/o *O. stenoceras* (T3, T5, T6 y T7) (Figura 4 y 5), este periodo de tiempo es cercano a lo

reportado en árboles de aguacate y plantas de fresa inoculados con *R.necatrix*, la cual ocurre entre los 28-33 ddi (Palomo-Ríos *et al.*, 2011; Ruano-Rosas *et al.*, 2010).

La mayor mortalidad se presentó en el tratamiento donde se inoculó individualmente a *R. necatrix* (T3), siendo esta de 87.5 %; en los tratamientos donde se inoculó en asociación a *R. necatrix*, *F. oxysporum* y *O. stenoceras* (T5, T6 y T7) esta fue menor (62.5 %). Este comportamiento es similar a lo reportado por Pedroza-Sandoval (2000), quien al determinar la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid., *Rhizoctonia solani* Kühn. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), encontró que al inocular solamente a *M. phaseolina* el número de plantas muertas fue mayor que cuando se encontró en asociación con *R. solani* y *F. solani*.

9. CONCLUSIONES

Se aislaron dos especies de hongos de raíces de plantas de rosa asociados a *R. necatrix*, los cuales de acuerdo a sus características morfológicas correspondieron a *O. stenoceras* y *F. oxysporum*.

Los tratamientos en los cuales se inoculó a *R. necatrix*, tanto de manera individual como en asociación con *O. stenoceras* y/o *F. oxysporum* fueron los más patogénicos, debido a que las plantas presentaron la mayor incidencia, menor altura y menor peso seco de raíz.

La incidencia a causa de *O. stenoceras* fue baja (6.3 %), por otro lado *F. oxysporum* no ocasionó síntomas; sin embargo, en ambos casos no se puede descartar su patogenicidad en plantas de rosa, debido a que con su inoculación se presentó disminución en el crecimiento de las plantas y en el peso seco de la raíz.

Es posible la existencia de sinergismo para causar enfermedad por parte de *F. oxysporum* y *O. stenoceras* ya que en conjunto incrementaron la incidencia en las plantas inoculadas.

Se confirmó como agente causal de la pudrición blanca de raíz en rosa a *R. necatrix*, debido a la sintomatología que manifestaron las plantas en parte aérea, así como la presencia de cordones miceliales en la raíz.

10. RECOMENDACIONES

Se sugiere que en nuevas investigaciones se amplíe el periodo de evaluación para verificar la patogenicidad de *O. stenoceras* y *F. oxysporum*.

Se sugiere evaluar estrategias de manejo para la pudrición blanca de raíz en rosa ocasionada por *R. necatrix*.

11. LITERATURA CITADA

- Aghayeva, D. N., Z. W. De Beer and T. Kirisitis. 2004. Two new *Ophiostoma* species with *Sporothrix* anamorphs from Austria and Azerbaijan. *Mycologia* 96: 866-828.
- Agrios, G. N. 2005. Plant Pathology. 5th edition. Academic Press. New York. USA. 922 p.
- Alexopoulos, C. and C. Mims. 1979. Introductory Mycology. 3th edition. John Wiley and Sons. New York, USA. 632 p.
- Alvarado, A. P. A. 2005. Identificación de cepas patógenas de *Fusarium* Link. Causantes de nueva patología en el cultivo de calas de colores bajo condiciones productivas de invernadero en Chile. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía. Chile. 118 p.
- Aoshima, K. 1965. Studies on wood-staining fungi of Japan. (In Japanese with English summary). PhD thesis, University of Tokyo, Tokyo. 161 p.
- Apodaca, S. M. A., E. Zavaleta, S. Osada, R. García y J. G. Valenzuela. 2004. Hospedantes asintomáticos de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *radicis-lycopersici* W. R. Jarvis y Shoemaker en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 22(1): 7-13.
- Arauz, C. L. F. 1998. Fitopatología un enfoque Agroecológico. Primera Edición. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 443 p.
- Barguil, B. M., F. M. P. Viana, R. M. Anjos and J. E. Cardoso. 2009. First report of dry rot caused by *Fusarium oxysporum* on rose (*Rosa* spp.) in Brazil. *Embrapa Agroindústria Tropical* 93(7): 766.
- Barnett, L. H. and B. B. Hunter. 1998. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. 4th edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Benadof, F. D. 2010. *Fusarium* especies. *Revista Chilena de infectología*. Providencia Santiago 27(4): 327-328.
- Bruna, V. A. 1991. Marchitez y pudriciones de corona y raíces en espárrago (*Asparagus officinalis* L) causado por *Fusarium oxysporum* Schlechtend f. sp. *asparagi* Cohen. *Agricultura técnica Chile* 51(1): 52-54.

- Cabezas, A. C. E. 2002. Nutrición vegetal en flor de corte en el Sur del Estado de México. Grupo Visaflor S. A de C. V. Villa Guerrero Estado de México. *In: 2° Simposio Nacional de Horticultura. Publicación Técnica-Científica del Departamento de Horticultura. Saltillo, Coahuila.*
- Cabrera, M. G., R. E. Álvarez, N. T. Sosa de Castro y A. Sosa. 2004. Patógenos de *Chrysanthemum* sp., en cultivos de las provincias de corrientes y Chaco, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicación Científica y Tecnológica. Resumen: A-028.
- Calle, B. J. 2005. Caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos de suelo e identificación de bacterias foliares en el cultivo de cebolla. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez. 127 p.
- Camacho, R. N. y J. A. Gil. 2008. Evaluación preliminar de modelos de infección cruzada por *Fusarium* sp., aislados de procesos patológicos en plantas, animales y humanos. Tesis de Licenciatura en Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Microbiología Industrial. Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. 184 p.
- Carrillo, F. J. A., T.J. Montoya, R. S. García, J. E. Cruz, I. Márquez y A. J. Sañudo. 2003. Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21(2): 123-127.
- CESAVEM. 2010. Manejo Fitosanitario de ornamentales. Disponible en Línea: <http://www.cesavem.org/?accion=ornamentales> (Consultado Enero 21 de 2012).
- Ciesla, W. M., 1988. Pine bark beetles: a new pest management challenge for Chilean foresters. *Journal of Forestry* 86(12): 27-31.
- Corpas, C., M. E. Rubio, A. M. Prados-Ligero, J. M. Melero-Vara y J. M. Basallote. 2006. Influencia de las condiciones ambientales sobre *Fusarium* spp., y la podredumbre de rizomas y raíces en Espárrago. Pp. 26. *In: Memorias del XIII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología. Murcia, España. 377 p.*
- Coscollá, R. 1980. Incidencia de los factores climáticos en la evolución de las plagas y enfermedades de las plantas. Servicio de defensa contra plagas e inspección Fitopatológica. *Bol. Serv. Plagas. Silla Valencia* 6: 123-139.
- Cullison, W. 2003. *Fusarium* soil microbiology Department of Crop and Soil Environmental Sciences. Disponible en línea: http://www.soils1.cses.vt.edu/ch/biol_4684/Microbes/fusarium.html (Consultado Agosto 25 de 2010).

- Daughtrey, M., R. L. Wick and J. L. Peterson. 2001. Plagas y Enfermedades de las plantas en Maceta con flores. The American Phytopathological Society. Edition Mundi-Presa. España. 90 p.
- Davidson, R. W. 1942. Some additional species of *Ceratostomella* in the United States. *Mycologia* 34: 650–662.
- Domínguez, A. G. 2008. *Rosellinia necatrix* Prill., asociado a la pudrición blanca de la raíz en *Rosa* sp., y su evaluación a sensibilidad de fungicidas en la zona de Villa Guerrero, Estado de México. Tesis de Licenciatura de Ingeniero Agrónomo en Floricultura. Centro Universitario Tenancingo UAEM. México. 74 p.
- Domsch, K. H., W. Gams and A. Traute-Heidi. 1980. Compendium of soil fungi. Volumen I. Academic Press. Universidad de Harvard. 1264 p.
- Duran-González., R. Jiménez-Díaz., y J. Melero-Vara. 1993. Importancia de las enfermedades del espárrago causado por especies de *Fusarium* en Andalucía. Pp. 1551-1556. *In: Actas del II Congreso Ibérico de ciencias hortícolas. Tomo II. Zaragoza, España* 1651 p.
- Farrell, B. D., A. S. Sequerira, B. C. O Meara, B. B. Normark, J. H. Chung and B. H. Jordal. 2001. The evolution of agricultura in beteles (*Curculionidae, Scolytinae and Platypodinae*). *Evolution* 55: 2011-2027.
- Freeman, S. and A. Szejnberg. 1992. *Rosellinia*. Pp 71-73. *In: Singleton, L., D. Mihail and M. Rush (eds.). Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi. ASP PRESS. St. Paul Minnesota. 259 p.*
- Fresa, R. A. 1975. Podredumbre de las Raíces de los Frutos. Pp. 237-342. *In: Sarasola A. A. y A. M. Rocca de Sarasola (eds.). Fitopatología. Curso Moderno. Tomo 2. Micosis. Hemisferio Sur Buenos Aires Argentina. 374 p.*
- Garcés, De. G. M., M Orozco, Rocio, G., y H. Valencia. 2001. *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. *Acta Biológica Colombiana* 6(1): 8-25.
- García, C. J., A. George; T. Argyle, M. Hoopen y U. Krauss. 2005. ¿Existe la tolerancia genetica del Cacao (*Theobroma cacao*) a *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo*?. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 75: 21-31.
- García-Velasco R., J. G. González-Díaz., G. Domínguez-Arizmendi y A. Velásquez-Pedroza. 2010. Patogenicidad de *Rosellinia necatrix* Prill., en *Rosa* sp. *In: Memorias del XII Congreso Internacional/ IXXXVII Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Mérida, Yucatán, Mexico del 4-8 Julio 2010.*

- García-Velasco, R., J. G. González-Díaz, G. Domínguez-Arizmendi, V. Ayala-Escobar y S. Aguilar-Medel. 2012. *Rosellinia necatrix* en *Rosa* sp., y su evaluación a sensibilidad de fungicidas. *Revista Chapingo serie Horticultura* 18(1): 39-54.
- Gibbs, J. N. 1999. The biology of Ophiostomatoid fungi causing sapstain in trees and freshly cut logs. Pp 153-160. *In: Wingfield, M. J., K. A. Seifert, J. F. Webber (eds.). Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 293 p.*
- Gómez-Gómez, A. A. 2010. La situación de las flores de corte Mexicanas dentro de la política comercial Internacional de México. *Revista electrónica de ciencias sociales* 2(9): 1-30.
- Góngora, S. A. C., y G. P. Rojas. 2006. Incidencia de las enfermedades en Uchuva *Physalis peruviana* L. por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación de los diferentes estratos de la planta en el departamento de Cundinamarca. Tesis de licenciatura Microbióloga agrícola y Veterinaria. Facultad de Ciencias básicas Bogotá, D. C. 87 p.
- González, F. J., S. Walls, y M. Mancilla. 2005. Detección mediante PCR-RFLP de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* Agente causal de fusariosis en frutilla. *Boletín Micológico* 20: 63-72.
- González, P. E., M. J. Yáñez, S. V. Santiago y P. A. Montero. 2004. Biodiversidad fungosa en la marchitez del chile y algunos factores involucrados, en Tlacotepec de José Manzo, el verde, Puebla. *Agrociencia* 38(6): 653-661.
- Harrington, T. C. and F. W. Cobb. 1988. *Leptographium* root diseases on conifers. American Phytopathological Press, St. Paul, Minnesota, U.S.A. 149 p.
- Harrington, T. C., D. McNew, J. Steimel, D. Hofstra and R. Farrell. 2001. Phylogeny and taxonomy of the *Ophiostoma piceae* complex and the Dutch elm disease fungi. *Mycology* 93:111-136.
- Harrington, T. C. 2005. Ecology and evolution of mycophagous bark beetles and their fungal partners. Pp. 257-291. *In: Vega F. E. and M. Blackwell (eds.). Insect-Fungal Associations: Ecology and Evolution. Oxford University Press, Oxford New York USA. 297 p.*
- Harrington, T. C. 1999. Diseases of conifers caused by species of *Ophiostoma* and *Leptographium*. Pp. 161-172. *In: Wingfield, M. J., K. A. Seifert, J. F. Webber (eds.). Ceratocystis and Ophiostoma. Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 293 p.*

- Hawksworth, D. L., P. M. Kirk, B. C. Sutton and D. N. Pegler. 1995. Ainsioorth & Bisby's Dictionary of the Fungi, 8th edition. International Mycological Institute, CAB International: Waliingford. 540 p.
- Helmuth, W. R. 2000. Manual: manejo integrado de plagas de cultivos tropicales. Ediciones ABYA-YALA. Ecuador. 111 p.
- Holliday, P. 1995. Fungus Diseases of Tropical Crops. Courier Dover Publications. USA. 624 p.
- Hoopen, M. and U. Krauss. 2006. Biology and control of *Rosellinia bunodes*, *Rosellinia necatrix* and *Rosellinia pepo*: A review. Crop Protection 25: 89-107.
- Hsiao, W. W. 2007. First report of white root rot of Japanese serissa (*Serissa japonica* (Thunb.) Thunb.), caused by *Rosellinia necatrix* in Taiwan. Plant Disease 91(11): 1512-1513.
- Hyakumachi, M., A. Priyatmojo, M. Kubota, and H. Fukui. 2005. New anastomosis groups, AG-T and AG-U, of binucleate *Rhizoctonia* spp. causing root and stem rot of cut-flower and miniature roses. Phytopathology 95: 784-792.
- Ikeda Ken-ichi, Hitoshi Nakamura and Naoyuki Matsumoto. 2005. Comparison between *Rosellinia necatrix* isolates from soil and diseased roots in terms of hypovirulence. FEMS Microbiology Ecology 54: 307-315.
- InfoStat (2008). InfoStat, versión 2008. Manual del Usuario. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba. Primera Edición, Editorial Brujas Argentina. 336 p.
- Jacobs, K. M. and J. Wingfield. 2001. Leptographium species: tree pathogens, insect associates and agents of blue-stain. American Phytopathological St., Press. University of Minnesota, U.S.A. 207 p.
- Kåårik, A. 1980. Fungi causing sapstain in wood. Swedish University Agricultural Science, Department Forest Products, Report Nr R114:1–112. Laundon GF. 1973. Records and taxonomic notes on plant diseases fungi in New Zealand. Transactions of the British Mycological Society 60: 317–337.
- Kamgan, N.G., K. Jacobs, Z. W. De Beer, M. J. Wingfield and J. Roux. 2008. *Ceratocystis* and *Ophiostoma* species, including three new taxa, associated with wounds on native South African trees. Fungal Diversity 29: 37-59.

- Kenneth, H. R. and A. R. Cloyd. 2007. Compendium of Rose Diseases and Pests. APS The American Phytopathological Society. Second Edition. Minnesota, USA. 83 p.
- Kirisits, T. 2004. Fungal associates of European bark beetles with special emphasis on the Ophiostomatoid fungi. Pp. 181-237. *In*: Lieutier F., K. R. Day, A. Battisti, J. C. Grégoire and H. F Evans (eds.). Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis Kluwer Academic Publishers. Dordercht The Netherlands. 569 p.
- Kirk, P.M., P. F. Cannon, J. C. Davidm and J. A. Stalpers (eds.). 2001. Dictionary of the Fungi.9th Ed. CAB International UK 655 p.
- Leslie, J. F. and B. A. Summerell. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. First Edition. Blackwell Publishing. Australian. 300 p.
- López, B, A.; S. R. López, M. E. Vázquez, S. A. Rodríguez, M. Mendoza y E. Padrón. 2005. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos. Revista Mexicana de Fitopatología 23(2): 183-190.
- López, R. S., P. Romón, J. C. Iturrondobeitia y A. Goldarazena. 2007. Los escolítidos de las coníferas del País Vasco. Guía práctica para su identificación y control. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco. Vitoria-Gasteiz, España. 189 p.
- López-Herrera, C. J., R. M. Pérez-Jiménez, T. Zea-Bonilla, M. J. Basallote-Ureba and J. M. Melero-Vara. 1998. Soil solarization in established Avocado trees for control of *Dematophora necatrix*. Journal Plant Disease 82: 1088-1092.
- López-Herrera, C. J., R. M. Pérez-Jiménez, A. Llobel, E. Monte-Vázquez y T. Zea-Bonilla. 1999. Estudios in vivo de *Trichoderma* como agente de biocontrol contra *Phytophthora cinnamomi* y *Rosellinia necatrix* en Aguacate. Revista Chapingo serie Horticultura 5: 261-265.
- López-Herrera, C. J. 2000. Podredumbre blanca de la raíz causada por *Rosellinia necatrix*. Pp. 79-81. *In*: Montesinos *et al.*, (eds.). Enfermedades de los frutales de pepita y de hueso: SEFMundi-Prensa. 147 p.
- Luna, P. A., H. V. Silva, N. Marban y E. Valadez. 2004. Variabilidad Genética de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. Fr. f. sp. *ciceris* (Padwick) Matuo y K. Sato Mediante PCR-RAPD'S en el Bajío, México. Revista Mexicana de Fitopatología 22(1): 44-51.

- Malloch D. W. and M. Blackwell. 1993. Dispersal biology of the Ophiostomatoid fungi. Pp. 195–206. *In*: Wingfield M. J., K. A. Seifert and J. Webber (eds.). *Ceratocystis* and *Ophiostoma*: taxonomy, ecology and pathogenicity. APS, St. Paul, Minnesota. 293 p.
- Mansilla, P. J., O. Aguín and M. C. Salinero. 2002. First Report of a Root Rot Caused by *Rosellinia necatrix* on Camellia in Spain. *Plant Disease* 86:7. 813 p. *Disease Notes*.
- Marmolejo, J., G. y H. Butin. 1993. Las especies de *Ophiostoma* y *Ceratocystiopsis* (Ascomycetes, Microascales) conocidas de Nuevo León, México. Reporte científico especial. Facultad de ciencias forestales. Linares, Nuevo León, México 13:155-170.
- McPartland, M. J., C. R. Clarke y P. D. Watson. 2000. Enfermedades y plagas de cáñamo: gestión y control biológico. CABI Publishing. Series. 251 p.
- Mehrotra, R. S. and K. R. Aneja. 1990. An Introduction to Mycology. New age International Publishers. 766 p.
- Melgarejo, N. P. y H. D. Salazar. 2003. Tratado de fruticultura para zonas áridas y semiáridas. Vol II. Primera Edición. Editorial Mundi prensa. España. 430 p.
- Mendoza, Z. C. y A. González. 1993. Enfermedades del Rosal en México. Primera Edición. Universidad Autónoma de Chapingo México 62 p.
- Mendoza, Z. C. 2002. Fungicida en Ornamentales. Pp. 119-147. *In*: Bautista, M. N. j. Alvarado; J. C. Chavarin y H. Sánchez. (eds.). Manejo Fitosanitario de Ornamentales. Instituto de Fitosanidad y Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. México. 237 p.
- Montiel-González, L., F. González-Flores, B. M. Sánchez-García, S. Guzmán-Rivera, F. P. Gómez-Vazquez, J. A. Costa-Gallegos y R. Rodríguez-Guerra. 2005. Especies de *Fusarium* presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudrición en cinco Estados del Centro de México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 23(1): 1-7.
- Monzón, A. y Rodríguez T. J. L. 2003. Infecciones causadas por el género *Fusarium* spp. Centro Nacional de Microbiología. Disponible en línea: http://www.seimc.org/control/revi_mico/pdf/fusarium.pdf. (Consultado Septiembre 26 de 2010).
- Mora, C. J. R. 2001. Control biológico de la pudrición radicular por *Fusarium oxysporum* en semilleros de café usando endomicorriza y *Trichoderma harzianum*. Tesis

- de Licenciatura carrera de ciencia y producción agropecuaria. Zamorano Honduras. 30 p.
- NCBI. 2012. Taxonomy browser. Disponible en línea: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=169388&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>. (Consultado Mayo 20 de 2012).
- Nelson, P. E., R. Tammen y R. Baker. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. Pp. 51-80. *In*: Mace M. E., A. A. Bell and C. C. H. Beckman (eds.). Fungal wilt diseases of Plants. Academic Press. New York, USA. 100 p.
- Orozco, H. N. E. 2007. Entre la competencia local y la competitividad global: Floricultura comercial en el Estado de México. *Convergencia*. 14(45): 111-160.
- Paine, T.D., K. F. Raffa and T. C. Harrington. 1997. Interactions among Scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annual Review Entomology* 42:179-206.
- Palmero, Li. D. 2008. Biogeografía y patología del genero *Fusarium* en ambientes salinos y semiáridos del litoral Mediterráneo de España. Tesis Doctoral. Universidad Politecnica de Madrid. 201 p.
- Palomo-Ríos, E., M. Barceló, A. Barceló-Muñoz, C. Pliego, R. Blanco-Portales, J. L. Caballero-Repullo, D. Ruano-Rosa, C. López-Herrera, J. A. Mercado-Carmona y F. Pliego-Alfaro. 2011. Transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* para inducir tolerancia a la podredumbre blanca del aguacate. Pp. 1-7. Libro de resúmenes del VII Congreso Mundial del Aguacate. Cairns, Australia del 5-9 de Septiembre 2011.
- Paulitz, T. and R. Belanger. 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology USA* 39:103-133.
- Pedroza-Sandoval, A., H. E. Castillo-Tovar y J. A. Samaniego-Gaxiola. 2000. Evaluación patogénica de diferentes hongos asociados a la pudrición de la raíz en dos variedades de frijol y distintos contenidos de humedad edáfica. *Revista Chapingo serie zonas Áridas*. 101-106 p.
- Pérez-Jiménez, R. M. 2006. A review of the biology and patogenicity of *Rosellinia necatrix*-cause of white root rot disease of fruit frees and other plants. *Journal Phytopathology* 154: 257-266.
- Pérez-Jiménez, R. M., R. M. Jiménez-Díaz and C. J. López-Herrera. 2002. Somatic incompatibility of *Rosellinia necatrix* on avocado plants in southern Spain. *Mycological Research* 106 (2): 239-244.

- Pérez-Jiménez, R. M., T. Zea y C. J. López. 2003. Podredumbres radiculares del Aguacate en el Sur de España: Revisión y Estado Actual de la Investigación. Pp. 531-536. *In: Actas V Congreso Mundial del Aguacate*. Granada-Málaga España. 845 p.
- Piontelli, E., Ma. A. Palma and L. Torrelli. 2006. *Ectinogonia buqueti* Spinola (Coleoptera) vector de *Ophiostoma stenoceras* (Robak) Melin & Nannf. En bosques de *Eucalyptus* de la V región. *Boletín Micológico* 21: 63-70 p.
- Pizano de Márquez, M. 2003. Investigación Vegetal Aplicada Praktijkonderzoek plant & omgeving. Cultivo Moderno de la Rosa Bajo Invernadero. Ediciones Hortitenia. Bogotá, Colombia. 203 p.
- Ploetz, R. C. 2003. Diseases of tropical fruit crops. Editorial CABI Publishing. Washington, DC, USA. 527 p.
- Quilambaqui, J. M. A. 2005. Aislamiento e Identificación de *Fusarium* spp. Asociado al declinamiento del Esparrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco municipios de Guanajuato, México. *Revista Tecnológica ESPOL* 18(1): 135-140.
- Rivera, C. G. 1991. Conceptos introductorios a la Fitopatología. Primera Edición. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 301 p.
- Robinson, R. A. 1980. New concepts in breeding for disease resistance. *Annual review phytopathology* 18:189-210 p.
- Rodríguez, G. D. A. 2000. Ocurrencia de *Fusarium oxysporum* en plantaciones de Cambur Manzano en el Estado Trujillo, Venezuela. *Postgrado de Fitopatología* 13(1): 22-24.
- Rodríguez, G. M. Del P. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zoológica Mexicana* 1: 53-78.
- Romero, C. S; 1993. Hongos Fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México, México 347 p.
- Romón, P., X. D. Zhou, J. C. Iturrondobeitia, M. J. Wingfield and A. Goldarazena. 2007. *Ophiostoma* species (Ascomycetes: Ophiostomatales) associated with bark beetles (Coleoptera: Scolytinae) colonizing *Pinus radiata* in Northern Spain. *Canadian Journal of Microbiology* 53(6): 756-767.
- Rosales, B. L. y R. C. Romero. 2009. Hongos fitopatógenos en almacigo. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Facultad de Ciencia Agropecuarias. Oxapampa. 14 p.

- Ruano-Rosa, D. Li Schena, A. Ippolito and C. J. López-Herrera. 2007. Comparison of Conventional and molecular methods for the detection of *Rosellinia necatrix* in avocado orchards in Southern Spain. *Plant Pathology* 56: 251-256.
- Ruano-Rosa, D., L. del Moral-Navarrete y C. J. López-Herrera. 2003. Estudio de Temperaturas de Crecimiento *in vitro* en asilados de *Trichoderma* sp., y de *Rosellinia necatrix*. Pp. 525-529. Evaluación del antagonismo mediante cultivos duales, *In: Actas V Congreso Mundial del Aguacate*. Córdoba, España.
- Ruano-Rosa, D., M. Barceló, J. A. Mercado, J. L. Caballero, F. Pliego-Alfaro y C. J. López-Herrera. 2010. Estudio de resistencia a *Rosellinia necatrix* de plantas de fresa transformadas con genes de *Trichoderma*. Pp. 192. *In: XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Vitoria-Gasteiz, España.
- Sanabria, de A. N., A. Guadarrama y H. Romero. 2002. Características de especies de *Fusarium* electroforéticos de proteínas. *Revista de la Facultad de Agronomía*. Maracay 28(161): 1-13.
- Santos, E. y J. M. Hernández. 2010. Susceptibilidad-tolerancia en el Patosistema *Fusarium oxysporum* f. sp. *canariensis* - Palmera canaria. Pp. 117. *In: XV Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología*. Vitoria-Gasteiz, España.
- Seifert, K. A. 1999. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. Pp: 141-151. *In: Wingfield, M. J., K. A. Seifert, J. F. Webber (eds.). Ceratocystis and Ophiostoma Taxonomy, Ecology, and Pathogenicity*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 293 p.
- SEDAGRO. Programa Agrícola 2003. Disponible en línea: <http://www.edomex.gob.mx/portal/page/portal/sedagro/estadisticasagropecuarias> (Consultado Mayo 12 de 2012).
- Secofi. 2005. Anuarios estadísticos. Sistema Nacional de Información e Integración de Mercados (SIIM). Disponible en línea: <http://www.secofi-sniim.gob.mx> (Consultado Noviembre 6 de 2011).
- SIAP. Cierre de la producción agrícola por cultivo 2012. Disponible en línea: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 (Consultado Marzo 20 de 2012).
- Sepúlveda, R. P. 2005. Enfermedades en hortaliza de hojas, Raíz y Bràsticas. Pp. 36-43. *In: Kehr M. E. (ed.). Seminario "Fitosanidad en hortalizas para la zona Sur"*. Instituto de Investigación Agropecuaria INIA. Temuco, Chile 46 p.

- Silva, T. L. A. 2006. Diagnostico de la problemática de enfermedades en el cultivo de Uchuva *Physalis peruviana* L. en el departamento de Antioquia. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias. Bogotá, D.C. 117 p.
- Sivanesan, A. and P. Holliday. 1972. *Rosellinia necatrix*. Description of Pathogenic Fungi and Bacteria, Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England 352: 2.
- Schmidt, O. and D. Czeschlik. 2006. Wood and Tree Fungi: Biology, Damage, Protection, and Use. Springer. Hamburg, Germany. 334 p.
- Smith I, M., J. Dunez, R. A. Lelliatt, D. H. Phillips and S. A. Archer. 1992. Manual de las enfermedades de las plantas. Editorial Mundi-Prensa. España. 671 p.
- Stackman, Louise y Harrar, George.1968. Relaciones mutuas entre organismos, ecológicas y simbióticas. Principios de Patología Vegetal. 2a. Edición. Buenos Aires: Eudeba. 87 p.
- Sztejnberg, A., and Z. Madar, 1980: Host range of *Dematophora necatrix*, the cause of white root rot disease in fruit trees. Plant Disease 64: 662-664.
- Sztejnberg, A., S. Freeman, I. Chet and J. Katan. 1987. Control of *Rosellinia necatrix* in soil and in apple orchard by solarization and *Trichoderma harzianum*. Plant Disease 71: 365-369.
- Tamayo, M. P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. Revista Facultad Nacional de Agronomía sede Medellín. 57 p.
- Terrazas, G. F. J. 2002. Apoyos a la Floricultura por parte de Dependencias Gubernamentales. Pp 1-7. In: Bautista, M. N., J. Alvarado., J. C. Chavarin., H. Sanchez (eds.). Manejo fitosanitario de Ornamentales. Instituto de Fitosanidad y Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 237 p.
- Terrazas, S. G., B. R. Campos, J. T. Méndez, S. E. García y T. D. Cibrián. 2006. Ecología química y hongos asociados de *Dendroctonus valens* LeConte (Coleoptera: Scolytidae). Maestría en Ciencias Forestales. Chapingo. 53 p.
- Upadhyay, H. P., 1981. A monograph of *Ceratocystis* and *Ceratocystiopsis*. University of Georgia Press. Athens. Georgia. 176 p.

- Vásquez, L. A., B. B. Tlapal, M. de J. Yáñez, P. R. Pérez y E. M. Quintos. 2009. Etiología de la marchitez del 'Chile de Agua' (*Capsicum annuum* L.) en Oaxaca, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 32(2): 127-134.
- Vidalie, H. 1992. Producción de Flores y plantas ornamentales. Madrid. Mundi-prensa. 260 p.
- Viteri, D. D. M. 2008. Artrópodos plaga y enfermedades que afectan el cultivo de la soya (*Glycine max* L. (Merr.) en Puerto Rico: Monitoreo e Identificación. Tesis de Maestría. Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez 159 p.
- Wingfield, M. J., P. W. Crous and W. J. Swart. 1993. *Sporothrix eucalypti* (sp. nov.), a shoot and leaf pathogen of *Eucalyptus* in South Africa. *Mycopathologia* 123: 159–164.
- Whitney, H. S. 1982. Relationships between bark beetles and symbiotic organisms. Pp.183-211. *In*: Mitton, J. B. and K. B. Sturgeon (eds.). *Bark Beetles in North American Conifers*, University of Texas Press, Austin, Texas USA 527 p.
- Zhou, X., Z. W. De Beer and M. J. Wingfield. 2006. DNA sequence comparisons of *Ophiostoma* spp., including *Ophiostoma aurorae* sp. nov., associated with pine bark beetles in South Africa. *Studies in Mycology* 55: 269–277.
- Zipfel, R. D. Z. W. de Beer, K. Jacobs, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 2006. Multi-gene phylogenies define *Ceratocystiopsis* and *Grosmannia* distinct from *Ophiostoma*. *Studies in Mycology* 55: 75-97.

12. ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo jugo V8-agar

Se utilizaron 200 mL de Jugo V8 (Herdez[®]), 3 g de Carbonato de calcio (CaCO₃), 20 g de Agar bacteriológico (BD Bioxon[®]) y 800 mL de agua destilada para aforar a 1000 mL de medio de cultivo.

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL se colocó el CaCO₃ y se disolvió con el jugo V8. Posteriormente se centrifugo (SORVALL[®]) durante 5 minutos a 1 500 rpm. Por otro lado se disolvió el agar con agua destilada, y se agregó el sobrenadante que resultó de la centrifugación.

La mezcla se esterilizó a 125 °C a 1.5 kg/cm², durante 15 minutos. Para evitar el crecimiento de bacterias, en el medio de cultivo estéril se adicionó ácido láctico al 25 % (Fermont[®]), a una concentración de 10 mL/ 1000 mL de medio de cultivo.

Anexo 2. Medio de cultivo de agar harina de avena (OMA)

Se utilizaron 30 g de harina de avena (QUAKER[®]), 20 g de agar bacteriológico y 1000 mL de agua destilada.

En un recipiente se mezclaron la harina de avena y 500 mL de agua destilada, la mezcla se calentó hasta llegar a ebullición manteniéndola a fuego lento durante 15 minutos. Posteriormente, se filtró con una gasa colocada en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL. Por separado se disolvió el agar con agua destilada, y se agregó el resultado

de mezcla aforando a 1000 mL. El medio de cultivo se esterilizó durante 20 minutos a 125 °C a una presión de 1.5 kg/cm² (Hawksworth *et al.*, 1995). Finalmente para evitar el crecimiento de bacterias en el medio de cultivo estéril se adicionó ácido láctico al 25 %, a una concentración de 10 mL/ 1000 mL de medio de cultivo.

Anexo 3. Medio de cultivo agar harina de maíz (CMA)

Se utilizaron 30 g de harina de maíz (MASECA[®]), 20 g de agar bacteriológico 1000 mL de agua destilada.

En un recipiente se mezclaron la harina de maíz y 500 mL de agua destilada, y la mezcla se calentó hasta llegar a ebullición manteniéndola a fuego lento durante 15 minutos. Posteriormente, se filtró con una gasa colocada en un matraz Erlenmeyer de 1000 mL. Por separado se disolvió el agar con agua destilada, y se agregó el resultado de mezcla aforando a 1000 mL. El medio de cultivo se esterilizó durante 20 minutos a 125 °C a una presión de 1.5 kg/cm² (Hawksworth *et al.*, 1995). Por último para evitar el crecimiento de bacterias en el medio de cultivo estéril se adicionó ácido láctico al 25 %, a una concentración de 10 mL/ 1000 mL de medio de cultivo.

Anexo 4. Medio de cultivo papa dextrosa (PD)

Para elaborar el medio de cultivo PD se utilizaron 200 g de papa pelada, 12 gr de dextrosa (J. T. Baker[®]) y 1000 mL de agua destilada.

En un recipiente se colocaron 1000 mL de agua destilada, a la cual se le adicionaron trozos de papa de aproximadamente 3 mm de grosor; la mezcla se calentó hasta llegar a ebullición manteniéndola a fuego lento durante 15 minutos, enseguida se filtró con una gasa colocándola en un matraz de Erlenmeyer de 1000 mL, y se le agregó la dextrosa.

El medio de cultivo se esterilizó durante 20 minutos a 125 °C a una presión de 1.5 kg/cm². Por último para evitar el crecimiento de bacterias en el medio de cultivo estéril se adicionó ácido láctico al 25 %, a una concentración de 10 mL/ 1000 mL de medio de cultivo.

Anexo 5. Secuencia de la región ITS1-ITS2 del DNAr de *Ophiostoma stenoceras* H. & P. Sydow

```
ACCTTGTA AAAAGAGTTGCACGTCATGCGCGATTTGAACTGGCAAGGCGCCGACG
GGGCGTCCGAGTGAGATGGAGA ACTTGCGTTTCGGTACTGCGCTCGGAGCCACCA
GCCGGGCCCGCCACTCGCTTTGGGGGCCCTCTGCCAGGCAGAGGAGCCCCAACA
CCAGCGCGCAACGGGGCGCGTGAGGGGGGAAATGACGCTCGGACAGGCATGCC
CGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGGTTCGCTGAATT
CTGCAATTCACATTACGTATCGCATTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAGCCAA
GAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTGATTATTTGTTTCTCAGACGGTTTCTAGTGG
TTGAGATATAAAGTTTCATAGGGCCCGCCGCCCGGCGCGGGAGGGGA
```

Anexo 6. Secuencia de la región ITS1-ITS2 del DNAr de *Fusarium oxysporum*

Schlechtend

TGCCTCGGCGGATCAGCCCGCTCCCGGTAAAACGGGACGGCCCGCCAGAGGACC
CCTAAACTCTGTTTCTATATGTAACCTTCTGAGTAAAACCATAAATAAATCAAACCTTT
CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCG
CCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCACAGCT
TGGTGTTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCCAAATTGATTGGCGGTCACGTCGA
GCTTCCATAGCGTAGTAGTAAAACCCTCGTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCG
TTAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACT
TAAGCATA