

Rosellinia necatrix EN *Rosa* sp. Y SU EVALUACIÓN A SENSIBILIDAD DE FUNGICIDAS

Rómulo García-Velasco¹; Justino Gerardo González-Díaz¹; Grisel Domínguez-Arizmendi¹;
Victoria Ayala-Escobar²; Sotero Aguilar-Medel¹.

¹Centro Universitario Tenancingo. Universidad Autónoma del Estado de México.
km 1.5 Carretera Tenancingo-Villa Guerrero. Tenancingo, Estado de México. C.P. 56400
Correo-e: rgarciave@uaemex.mx (¹Autor para correspondencia).

²Instituto de Fitosanidad. Colegio de Postgraduados. km 36.5 carretera México-Texcoco. Montecillo, Estado de México. C. P. 56230.

RESUMEN

En el año 2006 el cultivo de rosa en los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas cubrió una superficie de 415 ha, siendo importante su valor de producción equivalente a 688,722,450.00 pesos. Este cultivo presenta una pudrición blanca en raíces, ocasionando pérdidas de plantas, ya que su control es poco efectivo. El presente estudio tuvo por objetivos la identificación de la especie del hongo asociado a la pudrición blanca de raíz en plantas de rosa, y la evaluación de su sensibilidad a fungicidas. Se colectaron muestras de plantas con raíces infectadas en Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas, en el Estado de México, obteniendo nueve cepas. Se evaluaron los fungicidas quintozeno, benomilo, fluazinam y tiofanato metílico, a dosis de 1 g·L⁻¹, 0.6 g·L⁻¹, 0.5 ml·L⁻¹ y 0.6 g·L⁻¹, respectivamente. El hongo asociado a la pudrición blanca de raíz presentó micelio con hinchamientos piriformes antes de la septa; como signos se encontraron cordones miceliales en raíz y cuello de la planta. El hongo fue identificado taxonómicamente como *Rosellinia necatrix* Prill. (*Dematophora necatrix* (Hart.) Berl.); lo cual fue corroborado mediante análisis molecular. Las cepas T1GRJ, T2GRJ y T3GRJ, de Tenancingo, y las cepas VG1GRJ, VG2GRJ, VG3GRJ y VG4GRJ, de Villa Guerrero, fueron insensibles al fungicida quintozeno, mientras que con los fungicidas benomilo, fluazinam y tiofanato metílico no presentaron crecimiento micelial. La cepa T4GRJ de Tenancingo presentó sensibilidad a todos los fungicidas. La cepa CH1GRJ de Coatepec Harinas, fue insensible a quintozeno y presentó ligero crecimiento con fluazinam; mientras que con benomilo y tiofanato metílico el crecimiento fue nulo.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: Resistencia, quintozeno, benomilo, fluazinam, tiofanato metílico.

Rosellinia necatrix IN *Rosa* sp. AND AN EVALUATION OF ITS SENSITIVITY TO FUNGICIDES

ABSTRACT

In 2006 rose cultivation in the municipalities of Tenancingo, Villa Guerrero and Coatepec Harinas covered an area of 415 ha, representing a significant production value equivalent to 688,722,450.00 pesos. This crop is attacked by white root rot disease, resulting in plant losses since control methods are ineffective. The objectives of this study were to identify the fungus species associated with white root rot disease in rose plants and evaluate its sensitivity to fungicides. Samples of plants with infected roots were collected in Tenancingo, Villa Guerrero and Coatepec Harinas in the State of Mexico, obtaining nine strains. The fungicides quintozone, benomyl, fluazinam and thiophanate methyl were evaluated at doses of 1 g·L⁻¹, 0.6 g·L⁻¹, 0.5 ml·L⁻¹ and 0.6 g·L⁻¹, respectively. The fungus associated with white root rot disease presented mycelium with pyriform swellings before the septum; as symptoms, mycelial cords were found on the root and neck of the plant. The fungus was identified taxonomically as *Rosellinia necatrix* Prill. (*Dematophora necatrix* (Hart.) Berl.), which was confirmed by molecular analysis. The strains T1GRJ, T2GRJ and T3GRJ of Tenancingo and the strains VG1GRJ, VG2GRJ, VG3GRJ and VG4GRJ of Villa Guerrero were insensitive to the fungicide quintozone, while with the fungicides benomyl, thiophanate methyl and fluazinam no mycelial growth appeared. The strain T4GRJ of Tenancingo showed sensitivity to all fungicides. The strain CH1GRJ of Coatepec Harinas was insensitive to quintozone and presented slight growth with fluazinam, while with benomyl and thiophanate methyl there was no growth.

ADDITIONAL KEYWORDS: Resistance, quintozone, benomyl, fluazinam, thiophanate methyl.

INTRODUCCIÓN

El Estado de México es el principal productor de flores en el país, destacando el cultivo de *Rosa* sp. (rosa) (Terrazas, 2002). En el año 2006 el municipio de Villa Guerrero contó con una superficie de 265 hectáreas dedicada a este cultivo, el municipio de Tenancingo con 115 y el de Coatepec Harinas con 35 ha. La producción respectiva de los tres fue de 2,208,248, 958,295 y 291,655 toneladas de tallos florales, con un valor de 529,978,800, 114,995,400 y 43,748,250 pesos, respectivamente (SEDAGRO, 2006).

Este cultivo frecuentemente es atacado por una serie de fitopatógenos. En México se tienen reportes de la presencia de *Rosellinia necatrix* Prill. dañando del área radical y cuello de la planta (Mendoza, 2002). Este hongo se encontró por primera vez en 1978, dañando plantaciones de manzano en el estado de Puebla (Romero-Cova, 1993).

Rosellinia sp. es un parásito facultativo con un amplio rango de hospedantes (García *et al.*, 2005). Se ha reportado su daño en alrededor de 170 especies en 63 géneros y 30 familias (Khan, 1959). Ataca a un gran número de especies leñosas y semileñosas, aunque se ha encontrado en bulbos y rizomas (Pérez-Jiménez, 2006), pero principalmente árboles frutales, forestales y plantas ornamentales (Fresa, 1975; Streets, 1979).

La enfermedad se presenta en manchones, sobre todo en zonas del terreno con exceso de humedad. En el suelo se pueden observar las raíces invadidas por micelio blanco algodonoso que se torna negro conforme envejece (Fresa, 1975; Simons, 1997). En la parte aérea, las plantas presentan follaje escaso, además de muerte de ramas; las hojas muertas pueden permanecer adheridas a las ramas durante mucho tiempo (Romero-Cova, 1993).

El control químico de *Rosellinia necatrix* se basa en tratamientos de esterilización de suelo (Ruano-Rosa *et al.*, 2007; García *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1992) mediante aplicaciones preventivas de bromuro de metilo (Fresa, 1975), o en aplicaciones de fungicidas en cuanto aparecen los primeros síntomas de la enfermedad (Tamayo, 2007). En México los fungicidas químicos más utilizados para el control de *Rosellinia necatrix* son quintozeno, benomilo, fluazinam y tiofanato metílico (Mendoza, 2002).

Algunos autores reportan que este método de control no da buenos resultados (Ruano-Rosa, 2006; García *et al.*, 2005; Fresa, 1975), lo que posiblemente se deba a la presencia de resistencia. La resistencia se puede definir como la capacidad adquirida de un microorganismo para crecer en presencia de un compuesto al que habitualmente era sensible (Madigan *et al.*, 2004; Dekker, 1977).

En un estudio realizado en España por López-Herrera y Zea-Bonilla (2007) para determinar la resistencia de *R. necatrix* procedente de raíces de aguacate, fueron probados *in vitro* e *in vivo* los efectos del benomilo, carbendazim, tiofanato metílico y fluazinam, todos pertenecientes al grupo de los bencimidazoles. En los ensayos *in vitro* los

INTRODUCTION

The State of Mexico is the main flower producer in the country, highlighted by the growing of *Rosa* sp. (rose) (Terrazas, 2002). In 2006 the municipality of Villa Guerrero had an area of 265 hectares dedicated to this crop, while the municipalities of Tenancingo and Coatepec Harinas had 115 and 35 ha, respectively. The respective production of the three municipalities was 2,208,248, 958,295 and 291,655 tons of floral stems with a value of 529,978,800, 114,995,400 and 43,748,250 pesos, respectively (SEDAGRO, the State of Mexico's secretariat of agricultural development, 2006).

This crop is often attacked by a number of phytopathogens. In Mexico there have been reports of *Rosellinia necatrix* Prill. damaging the root area and neck of the plant (Mendoza, 2002). This fungus was first found in 1978, damaging apple orchards in the State of Puebla (Romero-Cova, 1993).

Rosellinia sp. is a facultative parasite with a wide range of hosts (García *et al.*, 2005). Damage caused by this parasite has been found in about 170 species, 63 genera and 30 families (Khan, 1959). It attacks a large number of woody and semi-ligneous species, although it has also been found in bulbs and rhizomes (Pérez-Jiménez, 2006). It mainly attacks fruit, and forest plants ornamental trees (Fresa, 1975; Streets, 1979).

The disease occurs in patches, particularly in ground areas with excess moisture. On the ground one can see the roots invaded by cottony white mycelium which turns black as it ages (Fresa, 1975; Simons, 1997). In the above-ground part, plants exhibit sparse foliage and branch die-back; dead leaves may remain attached to the branches for a long time (Romero-Cova, 1993).

Chemical control of *Rosellinia necatrix* is based on soil sterilization treatments (Ruano-Rosa *et al.*, 2007; García *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 1992) through preventative applications of methyl bromide (Fresa, 1975), or fungicide applications when the first symptoms of the disease appear (Tamayo, 2007). In Mexico the most widely used fungicides for *Rosellinia necatrix* control are quintozene, benomyl, fluazinam and thiophanate methyl (Mendoza, 2002).

Some authors report that this control method does not give good results (Ruano-Rosa, 2006; García *et al.*, 2005; Fresa, 1975), possibly due to the presence of resistance. Resistance can be defined as the acquired ability of a microorganism to grow in the presence of a compound to which it was habitually sensitive (Madigan *et al.*, 2004; Dekker, 1977).

In a study conducted in Spain by López-Herrera and Zea-Bonilla (2007) to determine the resistance of *R. necatrix* taken from avocado roots, the effects of benomyl, carbendazim, thiophanate methyl and fluazinam, all belonging

compuestos inhibieron totalmente el crecimiento del hongo, mientras que las evaluaciones *in vivo* mostraron que el carbendazim y el benomilo son menos efectivos.

En la región florícola sur del Estado de México, que incluye los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas, no existen reportes formales de la presencia de *Rosellinia* spp. causando daños al cultivo de rosa, a pesar de que hay evidencias de tales daños. El presente estudio tuvo como objetivos determinar si *Rosellinia necatrix* Prill. se encuentra asociado a la pudrición blanca de raíz en el cultivo de rosal, y, de ser este el caso, evaluar su sensibilidad a los fungicidas utilizados para su control en los municipios de Tenancingo, Villa Guerrero y Coatepec Harinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del hongo

Se seleccionaron nueve invernaderos, cuatro en el municipio de Tenancingo, cuatro en Villa Guerrero y uno en Coatepec Harinas donde las plantas de rosa presentaban síntomas de marchitez, muerte de plantas y signos como cordones miceliales en raíz y cuello de las plantas; de cada invernadero se tomaron muestras de raíces que fueron etiquetadas y transportadas en frío al laboratorio para su procesamiento; los síntomas y signos de cada planta fueron registrados.

De las raíces seleccionadas se cortaron rodajas de 1 mm de grosor, y se desinfectaron durante 2 minutos en hipoclorito de sodio al 2 %; enseguida se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron con papel absorbente estéril. Posteriormente se colocaron en cajas Petri estériles con papel absorbente estéril durante 24 h; transcurrido este tiempo las rodajas fueron sembradas en medio de cultivo jugo V8 (3 g de carbonato de calcio, 200 ml de jugo V8, 20 g de agar-agar y 800 ml de agua destilada). Las siembras se mantuvieron a temperatura de 24-26 °C en oscuridad y fueron observadas diariamente para revisar el crecimiento micelial; una vez confirmada la presencia del hongo se obtuvieron colonias puras.

Identificación del fitopatógeno

En los nueve aislamientos obtenidos se realizaron preparaciones temporales de los cordones miceliales para la observación al microscopio de los hinchamientos raquetoides que presenta el micelio justo antes de la septa, los cuales son descritos por Holliday (1995), Freeman y Szejberg (1992), Pérez-Jiménez (2006) y Khan (1959), como característica importante en la identificación del hongo. Los hinchamientos piriformes y el micelio que se encuentra antes de la septa fueron medidos, tanto en el material obtenido en campo como en el cultivado en laboratorio, con un micrómetro adaptado a un microscopio compuesto CarlZais®. La identificación se confirmó mediante PCR.

to the benzimidazole group, were tested *in vitro* and *in vivo*. In the *in vitro* tests, the compounds completely inhibited fungal growth, while the *in vivo* evaluations showed that carbendazim and benomyl are less effective.

In the flower-growing region in the south of the State of Mexico, which encompasses the municipalities of Tenancingo, Villa Guerrero and Coatepec Harinas, there are no formal reports of the presence of *Rosellinia* spp. causing rose crop damage, although there is evidence of such damage. The objectives of this study were to determine whether *Rosellinia necatrix* Prill. is associated with white root rot disease in rose growing, and, if this is the case, assess its sensitivity to fungicides used for its control in the municipalities of Tenancingo, Villa Guerrero and Coatepec Harinas.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of the fungus

We selected nine greenhouses, four in the municipality of Tenancingo, four in Villa Guerrero and one in Coatepec Harinas, where rose plants presented wilting symptoms, death of plants and signs such as mycelial strands in the root and neck of the plants. Root samples were taken from each greenhouse, labeled and transported in a cooler to the laboratory for processing; the symptoms and signs of each plant were recorded.

From the selected roots, 1-mm-thick slices were cut and disinfected for 2 minutes in 2 % sodium hypochlorite. They were then rinsed three times with sterile distilled water and dried with sterile absorbent paper. Next, they were placed in sterile Petri dishes with sterile absorbent paper for 24 h. Then the slices were planted on V8 juice medium (3 g of calcium carbonate, 200 ml of V8 juice, 20 g of agar-agar and 800 ml of distilled water). The plantings were kept at a temperature of 24-26 °C in darkness and observed daily to review mycelial growth. Once the presence of the fungus was confirmed, pure colonies were obtained.

Phytopathogen identification

In the nine isolates obtained, temporary preparations of the mycelial cords were made for microscopic observation of the raquetoid swellings presented by the mycelium just before the septum, which are described by Holliday (1995), Freeman and Szejberg (1992), Pérez-Jiménez (2006) and Khan (1959) as an important characteristic in identifying the fungus. The pyriform swellings and the mycelium, which is found before the septum, were measured in both the field and laboratory-grown material using a micrometer adapted to a CarlZais® compound microscope. The identification was confirmed by PCR.

Extraction and amplification of *Rosellinia necatrix* DNA

Once the nine strains were taxonomically identified as *R. necatrix*, three were selected: T1GRJ, VG1GRJ and CH1GRJ; total DNA was obtained from each one using the 3 % CTAB

Extracción y amplificación de ADN de *Rosellinia necatrix*

Una vez identificadas taxonómicamente las nueve cepas como *R. necatrix* se seleccionaron tres: T1GRJ, VG1GRJ y CH1GRJ; de cada una se obtuvo ADN total por el método de CTAB 3 % descrito por Ahrens y Seemüller (1992) con 1 g de micelio del hongo cultivado en medio de cultivo jugo V8 por 20 días. Se realizó la reacción de PCR para la amplificación de las regiones intergénicas transcripcionales (ITS1-ITS2) del componente ADN 18S ribosomal de hongos (Edel, 2000). Los oligonucleótidos utilizados fueron ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG GC-3') (White *et al.*, 1990). El programa de amplificación consistió de: 1 ciclo a 94 °C por 3 min; 35 ciclos a 94 °C por 30 seg, 55 °C por 45 seg, 72 °C por 45 seg.; y 1 ciclo a 72 °C por 7 seg. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1.0 % en una solución buffer TAE 1X a 80 volts por 45 min; se incluyó un marcador de peso molecular de 1 Kb (1 Kb Ladder, Invitrogen®) como referencia. El gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 mg·ml⁻¹) y se visualizó bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador GelDoc marca Biorad®. Los productos de la PCR fueron purificados según protocolo del kit (QIAquick PCR purification) y enviados a secuenciar a Macrogen Inc. Seoul, Korea. Las secuencias nucleotídicas obtenidas se alinearon al GenBank-NCBI y se compararon con las disponibles en ese mismo banco de datos, usando el método de Blast (Stephen *et al.*, 1990)

Evaluación de sensibilidad a fungicidas

De las cepas obtenidas se evaluó la sensibilidad *in vitro* a fungicidas comerciales con los siguientes ingredientes activos: quitozeno, benomilo, fluazinam y tiofanato metílico. Las dosis determinadas con base en la recomendación del fabricante, fueron las siguientes: 1 g·L⁻¹ para quitozeno, 0.6 g·L⁻¹ para benomilo, 0.5 ml·L⁻¹ para fluazinam y 0.6 g·L⁻¹ para tiofanato metílico. Los fungicidas fueron adicionados al medio de cultivo jugo V8 que fue vertido en cajas Petri de 8 cm de diámetro; una vez solidificado, se colocó en el centro de la caja una rodaja de 7 mm de diámetro de medio que contenía a *R. necatrix*; como testigos absolutos se sembraron las mismas cepas, pero sin fungicidas. Las siembras se mantuvieron a 24-26 °C en obscuridad, y cada 24 h se registró el crecimiento micelial del hongo utilizando un calibrador digital. Las mediciones se dieron por terminadas cuando las cajas de los testigos absolutos fueron completamente cubiertas por el crecimiento micelial.

Diseño experimental

Se realizaron tres experimentos, uno por municipio; en Tenancingo y Villa Guerrero el experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial, siendo factores fungicida y cepa. En el factor cepa, los niveles fueron las cepas aisladas en cada municipio; en el factor fungicida los niveles fueron quitozeno, benomilo,

method described by Ahrens and Seemüller (1992) with 1 g of mycelium from the fungus grown on V8 juice culture medium for 20 days. The PCR reaction was performed for amplification of the internal transcribed spacers (ITS1-ITS2) of the 18S ribosomal DNA component of fungi (Edel, 2000). The oligonucleotides used were ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') and ITS5 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') (White *et al.*, 1990). The amplification program consisted of: 1 cycle at 94 °C for 3 min; 35 cycles at 94 °C for 30 sec, 55 °C for 45 sec, 72 °C for 45 sec.; and 1 cycle at 72 °C for 7 sec. The amplified products were analyzed by agarose gel electrophoresis (1 % agarose) in a 1X TAE buffer solution at 80 volts for 45 min; a 1 Kb molecular weight marker (1 Kb Ladder, Invitrogen®) was used for reference. The gel was stained with ethidium bromide (0.5 mg·ml⁻¹) and visualized under ultraviolet light in a Bio-Rad® Gel Doc imager. The PCR products were purified according to the QIAquick PCR purification kit profile and sent for sequencing at Macrogen Inc. in Seoul, South Korea. The nucleotide sequences obtained were aligned to the GenBank-NCBI and compared with those available in the same databank using the Blast method (Stephen *et al.*, 1990).

Evaluation of sensitivity to fungicides

We evaluated the *in vitro* sensitivity of the strains obtained to commercial fungicides with the following active ingredients: quitozene, benomyl, fluazinam and thiophanate methyl. The determined doses, based on the manufacturer's recommendation, were as follows: 1 g·L⁻¹ for quitozene, 0.6 g·L⁻¹ for benomyl, 0.5 ml·L⁻¹ for fluazinam and 0.6 g·L⁻¹ for thiophanate methyl. The fungicides were added to the V8 juice culture medium that was poured into Petri dishes of 8 cm in diameter. Once solidified, a 7-mm-diameter slice of medium containing *R. necatrix* was placed in the center of the dish; as absolute controls, the same strains were planted, but without fungicides. The plantings were kept at 24-26 °C in darkness, and every 24 h the mycelial growth of the fungus was recorded using a digital caliper. The measurements were ended when the dishes containing the absolute controls were completely covered by mycelial growth.

Experimental design

Three experiments, one per municipality, were conducted. In Tenancingo and Villa Guerrero, the experiment was carried out under a completely randomized design with a factorial arrangement, with two factors: strain and fungicide. In the strain factor, the levels were the strains isolated in each municipality; in the fungicide factor, the levels were quitozene, benomyl, fluazinam, thiophanate methyl and the control without fungicide. The treatments were the result of the combination of the levels of each factor, giving a total of 20. Each treatment had seven replicates, and each replicate consisted of a Petri dish. In the municipal-

fluazinam, tiofanato metílico y testigo sin fungicida. Los tratamientos fueron el resultado de la combinación de los niveles de cada factor, dando un total de 20; cada tratamiento tuvo siete repeticiones; cada repetición consistió en una caja Petri. En el municipio de Coatepec Harinas se aisló solamente una cepa; el diseño experimental fue completamente al azar con cinco tratamientos, que consistieron en los fungicidas mencionados más el testigo sin fungicida; cada tratamiento tuvo siete repeticiones, y cada repetición fue en una caja Petri.

Los datos resultantes de los experimentos se sometieron a los procedimientos de análisis de varianza y en su caso, comparación de medias por prueba de Tukey con el programa Statgraphics Plus® Windows® Versión 5.

Para la representación gráfica del crecimiento del hongo con los diferentes fungicidas a través del tiempo, se utilizó regresión simple por cepa y fungicida, seleccionando el de mejor ajuste con base en el coeficiente de regresión; la significancia de los coeficientes se verificó mediante análisis de varianza. Para los cálculos, se utilizó el procedimiento de regresión simple del software Statgraphics Plus® Windows® Versión 5. En todos los modelos la variable dependiente Y fue crecimiento del hongo y la variable independiente X, días.

RESULTADOS

Síntomas registrados en plantas de rosa

La enfermedad se presenta en manchones y avanza en línea recta en las camas de cultivo. Inicialmente, la planta comienza a mostrar marchitez y la muerte se presenta en poco tiempo. En otros casos, conforme avanza la enfermedad las plantas presentan follaje pequeño y escaso, el cual se vuelve clorótico y se marchita hasta llegar a la muerte. Sin embargo, éstas conservan sus hojas por algún tiempo, mostrando un color anaranjado brillante. Es común encontrar plantas con algunos tallos muertos y otros, en apariencia, en buen estado (Figura 1a y 1b).

En la parte subterránea de la planta inicialmente se puede apreciar sobre la corteza de las raíces micelio blanco, algodonoso, que da origen a la formación de cordones miceliales que rodean a las raíces; éstos son de color blanco y conforme maduran se tornan de color gris oscuro a negro. Posteriormente, las raíces se vuelven blandas a causa de la pudrición ocasionada por el hongo, por lo que es fácil desprenderlas del suelo (Figura 1c).

Identificación del hongo fitopatógeno

Se obtuvieron nueve cepas del hongo, las cuales fueron denominadas para el municipio de Tenancingo como T1GRJ, T2GRJ, T3GRJ y T4GRJ, para Villa Guerrero VG1GRJ, VG2GRJ, VG3GRJ y VG4GRJ, y para Coatepec Harinas CH1GRJ.

El hongo presentó micelio septado de color blanco algodonoso con hinchamientos piriformes (micelio

ity of Coatepec Harinas, only one strain was isolated. The experimental design was completely randomized with five treatments, which consisted of the fungicides mentioned plus the control without fungicide. Each treatment had seven replicates, and each replicate was in a Petri dish.

The data resulting from the experiments were subjected to analysis of variance procedures and, if required, to Tukey's comparison of means test using the Statgraphics Plus Program® Windows® Version 5 software.

For the graphic representation of fungal growth with the different fungicides over time, we used simple regression by strain and fungicide, selecting the best fit based on the regression coefficient; the significance of the coefficients was verified by analysis of variance. For the calculations, we used the simple regression procedure in the Statgraphics Plus Program® Windows® Version 5 software. In all models the dependent variable Y was fungal growth and the independent variable X, days.

RESULTS

Symptoms recorded in rose plants

The disease occurs in patches and advances in a straight line in the growing beds. Initially, the plant begins to show wilting and death occurs in a short time. In other cases, as the disease advances the plants present small and scarce foliage, which becomes chlorotic and withers until death occurs. However, they retain their leaves for some time, showing a bright orange. It is common to find plants with some dead stems and others, in appearance, in good condition (Figure 1a and 1b).

In the underground part of the plant, initially white cottony mycelium can be seen on the bark of the roots, giving rise to the formation of mycelial cords that surround the roots. These are white and as they mature they turn from dark grey to black. Subsequently, the roots become soft due to the rot caused by the fungus, making it easy to remove them from the soil (Figure 1c).

Identification of the phytopathogenic fungus

Nine strains of the fungus were obtained. They were named for the municipality of Tenancingo as T1GRJ, T2GRJ, T3GRJ and T4GRJ, for Villa Guerrero as VG1GRJ, VG2GRJ, VG3GRJ and VG4GRJ, and for Coatepec Harinas as CH1GRJ.

The fungus had cottony-white septate mycelium with pyriform swellings (raquetoid mycelium) just before the septum. The mycelium forms mycelial cords that are initially white, but over time they turn from gray to black, in

raquetoides) justo antes de la septa. El micelio forma cordones miceliales que inicialmente son de color blanco, pero a medida que pasa el tiempo se tornan de color gris a negro, en los cuales los hinchamientos piriformes del micelio son más evidentes; estas características corresponden a *Rosellinia necatrix* Prill., estado asexual *Dematophora necatrix* (Hart.) Berl., (Khan, 1959; Freeman y Szejnberg, 1992); [Makambila, 1978 citado en Pérez-Jiménez (2006); Sivanesan *et al.* (1972), citado en Holliday, 1995]. Los hinchamientos piriformes obtenidos de micelio maduro (color gris a negro) de raíces enfermas midieron en promedio 8.7 μ de ancho; el micelio que se encontró después de la septa midió 4.1 μ ; mientras que estas estructuras en condiciones de laboratorio midieron 5.2 μ y 2.6 μ , respectivamente (Figuras 1d y 1e).

El crecimiento de *R. necatrix* en medio de cultivo V8 en oscuridad en un rango de 24 a 26 °C tardó de 16 a 18 días en cubrir una caja Petri de 8 cm de diámetro. El crecimiento del micelio fue pegado al sustrato y radial, seguido de anillos concéntricos de micelio negro, en el cual se formaron microesclerocios sobre o inmersos en el sustrato al fondo de la caja Petri.

which the pyriform swellings of the mycelium are more evident. These characteristics correspond to *Rosellinia necatrix* Prill., asexual state *Dematophora necatrix* (Hart.) Berl., (Khan, 1959; Freeman and Szejnberg, 1992); [Makambila, 1978 cited in Pérez-Jiménez (2006); Sivanesan *et al.* (1972), cited in Holliday, 1995]. The pyriform swellings obtained from mature mycelium (gray to black) found on diseased roots measured on average 8.7 μ in width and the mycelium found after the septum measured 4.1 μ , while these structures in laboratory conditions measured 5.2 μ and 2.6 μ , respectively (Figures 1d and 1e).

Growth of *R. necatrix* on V8 culture medium in darkness within a temperature range of 24 to 26 °C took 16 to 18 days to cover a Petri dish of 8 cm in diameter. The mycelial growth was stuck to the substrate and roots, followed by concentric rings of black mycelium in which microsclerotia formed on or within the substrate at the bottom of the Petri dish.

By aligning the sequence of the amplified product in PCR with the reported sequences in the GenBank-NCBI, 98 % homology was obtained with *Rosellinia necatrix*

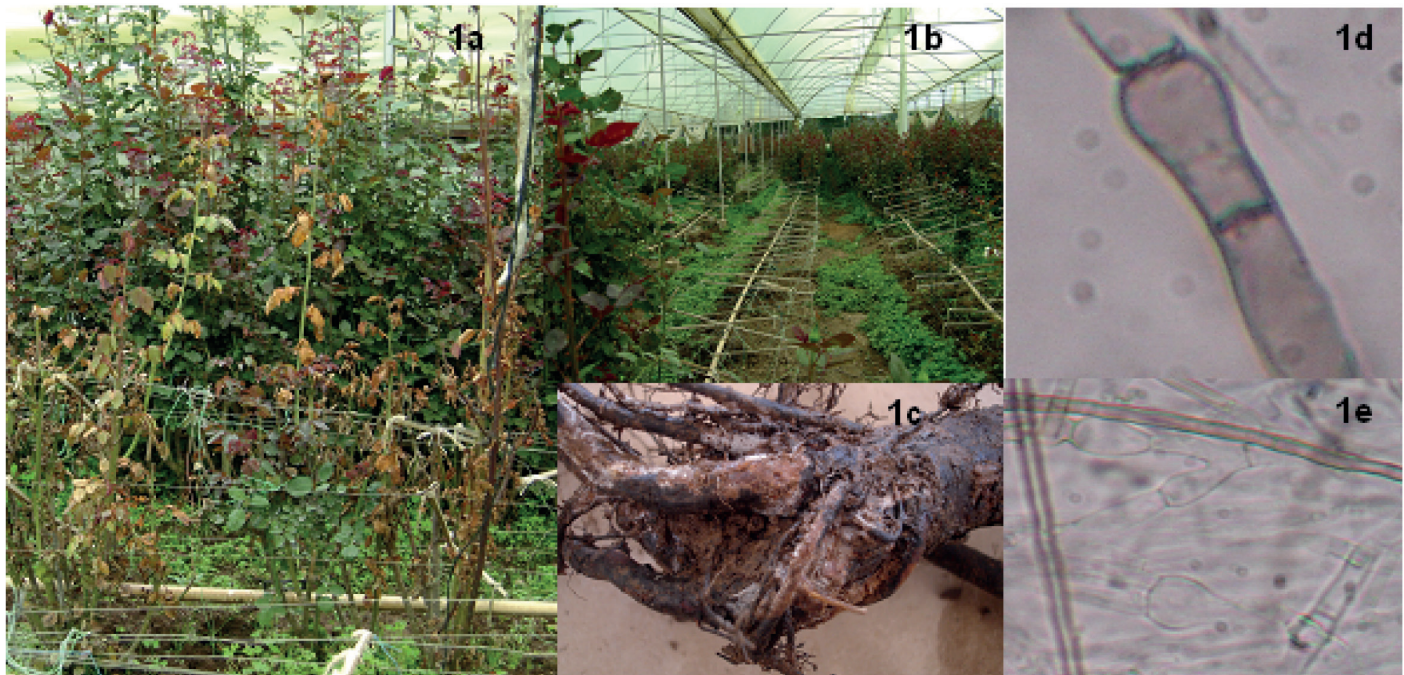


FIGURA 1a. Síntomas aéreos ocasionados por *Rosellinia necatrix* en plantas de rosa; **1b.** Avance de la enfermedad en camas de cultivo; **1c.** Cordones miceliales que envuelven a las raíces; **1d.** Micelio raquetoides proveniente de raíces enfermas (40x); **1e.** Desarrollo micelial en condiciones de laboratorio (100x).

FIGURE 1a. Above-ground symptoms caused by *Rosellinia necatrix* in rose plants; **1b.** Disease progression in growing beds; **1c.** Mycelial cords that surround the roots; **1d.** Raquetoid mycelium from diseased roots (40x); **1e.** Mycelial development in laboratory conditions (100x).

Al alinear la secuencia del producto amplificado en PCR con las secuencias reportadas en el GenBank-NCBI se obtuvo 98 % de homología con *Rosellinia necatrix* en las tres cepas analizadas (GATCATTAAGAGTTC-CACAACTCCCAAACCCATGTGAACATAACCACGCG-TTGCCTCGGCAGGTCGCGTCTACCCTAGTACCC-TACCCTGTAGGGCCTACCCGGTAGGGCGCGGGCCA-ACCTGCCGGCGGCCACGAAACTCTGTTTAGCATT-GAATTCTGAACACATAACTAAATAAGTTAAACTTTCA-ACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAACG-CAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATT-CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCC-CATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCG-TCAATTTCAACCCTTAAGCCCCTGTTGCTTAGCGTT-GGGGGCCTGCAGCGCCTGCTGCAGCCCCTCGAAGT-CAGTGGCGGAGTCGGTCACACACTCTAGACGTAGTA-GATTTCTCATCTCGCCTATGTTGTGCCGGCCCCCT-GCCGTA AACACCCCCCATAACCAAAGTTGACCTCG-GATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA-ATAAGCGG).

Evaluación de sensibilidad a fungicidas

Cepas de Tenancingo

Los análisis de datos en las cepas T1GRJ, T2GRJ, T3GRJ y T4GRJ, mostraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) para los casos de cepas, fungicidas y la interacción cepa por fungicida (Cuadro 1). Los tratamientos sin fungicida presentaron el mayor crecimiento micelial 18 días después de su siembra, seguido por los tratamientos con quintozeno en las cepas T1GRJ, T2GRJ y T3GRJ, ya que este fungicida sólo retrasó el crecimiento micelial por alrededor de tres días (Figura 2), mientras que la cepa T4GRJ fue completamente sensible al no mostrar crecimiento micelial; con los fungicidas tiofanato metílico, fluazinam y benomilo el crecimiento micelial de *Rosellinia necatrix* fue nulo.

Cepas de Villa Guerrero

Las cepas VG3GRJ y VG4GRJ tratadas con el fungicida quintozeno presentaron crecimiento micelial cinco días después de su siembra, en tanto que las cepas VG1GRJ y VG2GRJ con el mismo tratamiento crecieron a partir del día siete (Figura 3); sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Fue hasta el día 13 cuando se encontraron diferencias estadísticas ($P < 0.05$) para el caso de fungicidas y cepas (Cuadro 2). La comparación de medias de Tukey ($P < 0.05$) mostró mayor crecimiento para el tratamiento sin fungicida, seguido por quintozeno, siendo diferentes entre ellos y diferentes a tiofanato metílico, fluazinam y benomilo, los cuales fueron estadísticamente iguales entre ellos. En las cuatro cepas de *R. necatrix* que fueron sensibles a benomilo, fluazinam y tiofanato metílico, no hubo crecimiento micelial durante el transcurso de la prueba.

in the three strains analyzed (GATCATTAAGAGTTC-CACAACTCCCAAACCCATGTGAACATAACCACGCGTTGCCTCGGCAGGTCGCGTCTACCCTAGTACCCTACCCTGTAGGGCCTACCCGGTAGGGCGCGGGCCAACCTGCGGCGGCCACGAAACTCTGTTTAGCATTGAATTCTGAACACATAACTAAATAAGTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTTCTGGCATCGATGAAGAACGCGAAGTAATGTGAATTGCAGAATTGGAACGCACATTGGCCCATTAGTATTCTAGTGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTTAAGCCCCTGTTGCTTAGCGTTGGGGCCTGCAGCGCCTGCTGCAGCCCCTCGAAGTCAGTGGCGGAGTCGTCAACACTCTAGACGTAGTAGATTTCTCATCTCGCCTATGTTGTGCCGGCCCCCTGCCGTA AACACCCCCCATAACCAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATAATAAGCGG).

Evaluation of sensitivity to fungicides

Tenancingo strains

Data analysis in strains T1GRJ, T2GRJ, T3GRJ and T4GRJ showed significant ($P < 0.05$) statistical differences in the case of strains, fungicides and strain interaction by fungicide (Table 1). The treatments without fungicide showed the greatest mycelial growth 18 days after planting, followed by the quintozeno treatments in strains T1GRJ, T2GRJ and T3GRJ, since this fungicide only delayed mycelial growth for about three days (Figure 2), while the T4GRJ strain was fully sensitive as it did not show any mycelial growth; with the fungicides thiophanate methyl, fluazinam and benomyl, there was no mycelial growth of *Rosellinia necatrix*.

Villa Guerrero strains

The strains VG3GRJ and VG3GRJ treated with the fungicide quintozeno showed mycelial growth five days after planting, whereas the strains VG1GRJ and VG2GRJ with the same treatment grew from day seven (Figure 3); however, these differences were not statistically significant. It was not until day 13 that significant ($P < 0.05$) statistical differences were found in the case of fungicides and strains (Table 2). Tukey's comparison of means test ($P < 0.05$) showed greater growth for the treatment without fungicide, followed by quintozeno, which were different from each other and different from thiophanate methyl, fluazinam and benomyl, which were statistically the same. In the four *R. necatrix* strains that were sensitive to benomyl, fluazinam and thiophanate methyl, there was no mycelial growth during the test.

Coatepec Harinas strain

Four days after planting, *R. necatrix* showed mycelial growth in the treatment with quintozeno fungicide (7.37mm);

CUADRO 1. Crecimiento micelial en mm de cepas de *Rosellinia necatrix* de Tenancingo, Estado de México, sometidas a diferentes fungicidas, a 18 días de sembradas.

Fungicidas	Cepas				Fungicida
	T1GRJ	T2GRJ	T3GRJ	T4GRJ	
	crecimiento micelial en mm				
Sin fungicida	80.00 a ^{zy}	76.75 a	79.15 a	50.42 b	71.58 A ^{zx}
Quintozeno	25.31 c	25.3 c	22.05 c	7.00 d	19.91 B
Benomilo	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Fluazinam	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Tiofonato metilico	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Cepa	25.262 A ^{zx}	24.61 A	24.44 A	15.68 B	

^zValores con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

^y Letras minúsculas corresponden a la comparación de la interacción de los factores cepa por fungicida

^x Las letras mayúsculas corresponden a la comparación de cepa y fungicida en forma independiente.

TABLE 1. Mycelial growth in mm of *Rosellinia necatrix* strains from Tenancingo, State of Mexico, subjected to different fungicides, at 18 days after planting.

Fungicides	Strains				Fungicide
	T1GRJ	T2GRJ	T3GRJ	T4GRJ	
	mycelial growth in mm				
No fungicide	80.00 a ^{zy}	76.75 a	79.15 a	50.42 b	71.58 A ^{zx}
Quintozene	25.31 c	25.3 c	22.05 c	7.00 d	19.91 B
Benomyl	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Fluazinam	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Thiophanate methyl	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Strain	25.262 A ^{zx}	24.61 A	24.44 A	15.68 B	

^zValues with the same letter are equal according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

^y Lowercase letters correspond to the comparison of the interaction of the strain factors by fungicide.

^x Uppercase letters correspond to the comparison of strain and fungicide independently.

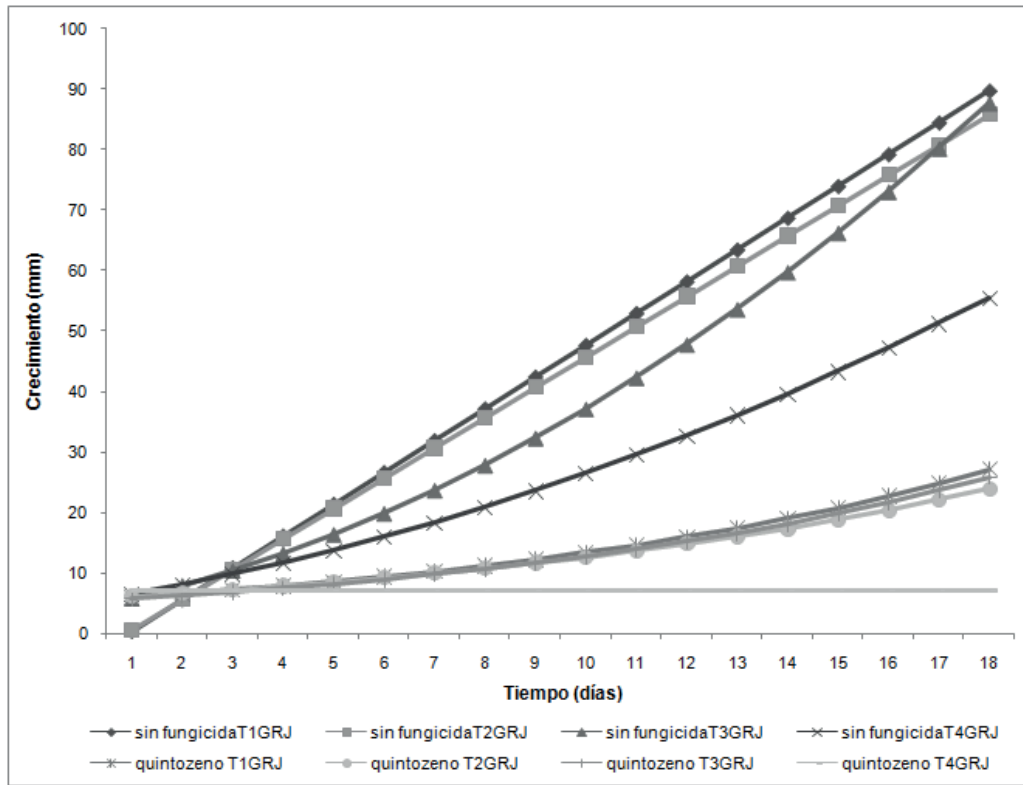


FIGURA 2. Crecimiento micelial en mm de cepas de *Rosellinia necatrix* colectadas en Tenancingo sin fungicida y con quintozeno.

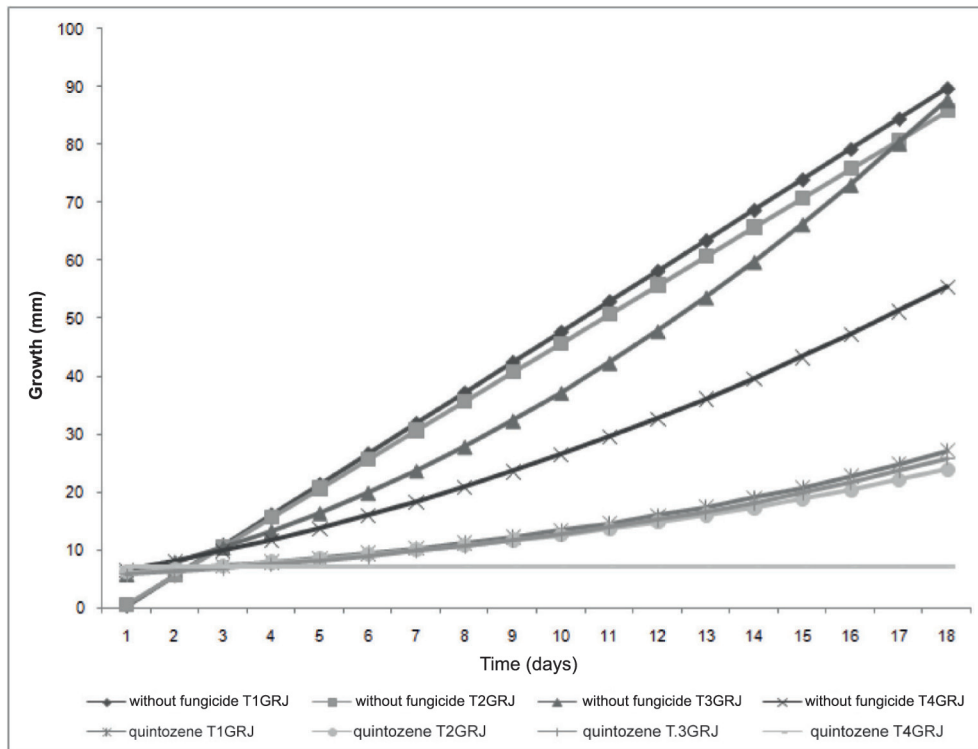


FIGURE 2. Mycelial growth in mm of *Rosellinia necatrix* strains collected in Tenancingo without fungicide and with quintozeno.

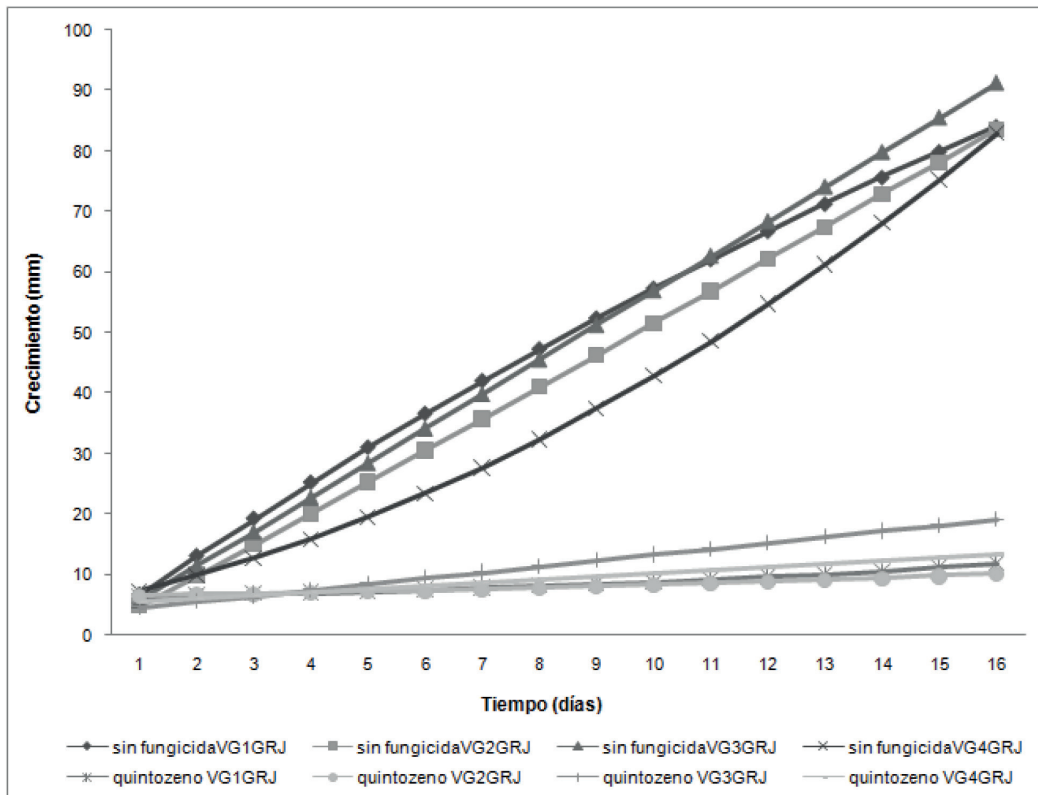


FIGURA 3. Crecimiento micelial en mm de cepas de *Rosellinia necatrix* colectadas en Villa Guerrero sin fungicida y con quintozeno.

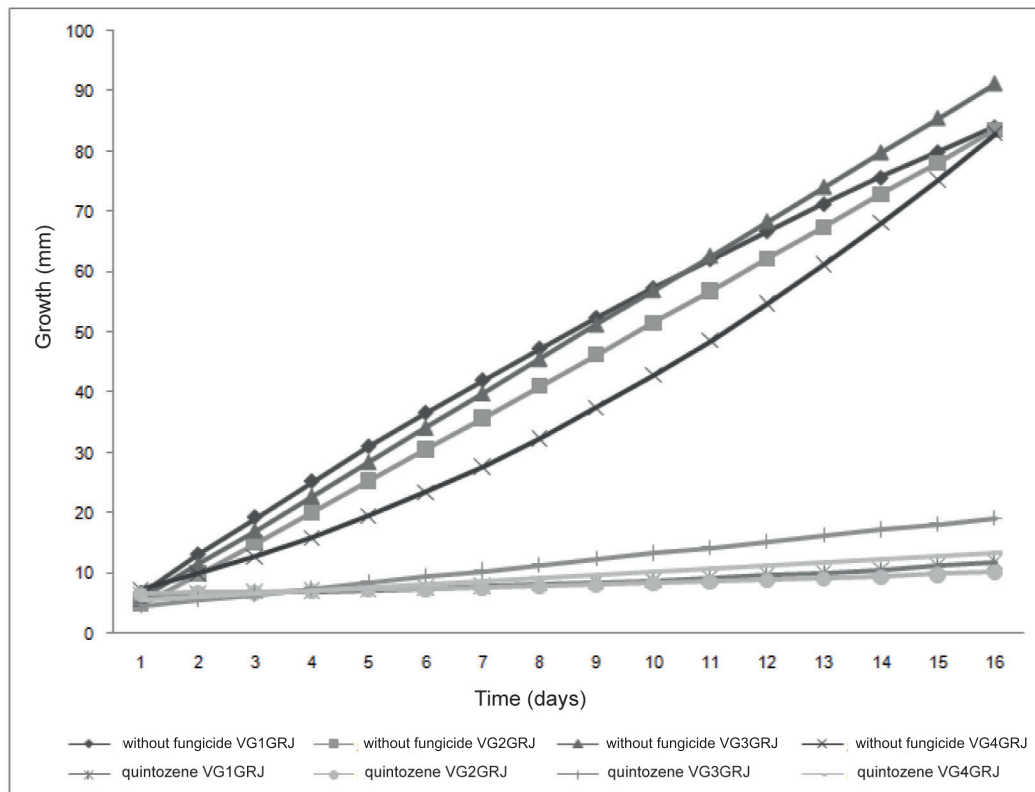


FIGURE 3. Mycelial growth in mm of *Rosellinia necatrix* strains collected in Villa Guerrero without fungicide and with quintozeno.

CUADRO 2. Crecimiento micelial en mm de cepas de *Rosellinia necatrix* de Villa Guerrero, Estado de México, sometidas a diferentes fungicidas, a 13 días de sembradas.

Fungicidas	Cepas				Fungicida
	VG1GRJ	VG2GRJ	VG3GRJ	VG4GRJ	
	crecimiento micelial en mm				
Sin fungicida	73.26 a ^{zy}	70.76 ab	74.81 a	62.3 b	70.28 A ^{zx}
Quintozeno	10.61 cd	9.40 cd	16.72 c	12.16 cd	12.22 B
Benomilo	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Fluazinam	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Tiofonato metilico	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Cepa	20.974 AB ^{zx}	20.232 AB	22.506 A	19.092B	

^aValores con la misma letra son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

^y Letras minúsculas corresponden a la comparación de la interacción de los factores cepa por fungicida

^x Las letras mayúsculas corresponden a la comparación de cepa y fungicida en forma independiente.

TABLE 2. Mycelial growth in mm of *Rosellinia necatrix* strains from Villa Guerrero, State of Mexico, subjected to different fungicides, at 13 days after planting.

Fungicides	Strains				Fungicide
	VG1GRJ	VG2GRJ	VG3GRJ	VG4GRJ	
	mycelial growth in mm				
No fungicide	73.26 a ^{zy}	70.76 ab	74.81 a	62.3 b	70.28 A ^{zx}
Quintozene	10.61 cd	9.40 cd	16.72 c	12.16 cd	12.22 B
Benomyl	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Fluazinam	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Thiophanate methyl	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 d	7.00 C
Strain	20.974 AB ^{zx}	20.232 AB	22.506 A	19.092B	

^aValues with the same letter are equal according to Tukey's test at $P \leq 0.05$.

^y Lowercase letters correspond to the comparison of the interaction of the strain factors by fungicide.

^x Uppercase letters correspond to the comparison of strain and fungicide independently.

Cepa de Coatepec Harinas

Cuatro días después de la siembra, *R. necatrix* presentó crecimiento micelial en el tratamiento con el fungicida quintozeno (7.37 mm); para este mismo día el hongo tuvo un crecimiento de 25.19 mm en el tratamiento sin fungicida (Figura 4), mientras que en los tratamientos con tiofanato metílico, fluazinam y benomilo el crecimiento fue nulo, siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0.05$); para el día 16 el tratamiento con benomilo comenzó a presentar crecimiento micelial. Al final del experimento *R. necatrix* cepa CH1GRJ tratada con los fungicidas tiofanato metílico y benomilo no presentó crecimiento micelial (Cuadro 3).

for this same day, the fungus had a growth of 25.19 mm in the treatment without fungicide (Figure 4), whereas there was no growth in the treatments with thiophanate methyl, fluazinam and benomyl, these differences being statistically significant ($P \leq 0.05$); for day 16, the treatment with benomyl began to show mycelial growth. At the end of the experiment, *R. necatrix* strain CH1GRJ treated with the fungicides thiophanate methyl and benomyl showed no mycelial growth (Table 3).

DISCUSSION

In greenhouse rose crops in the Villa Guerrero region of the State of Mexico, damage caused by *R. necatrix* was found to be frequent and severe; the rose plants attacked

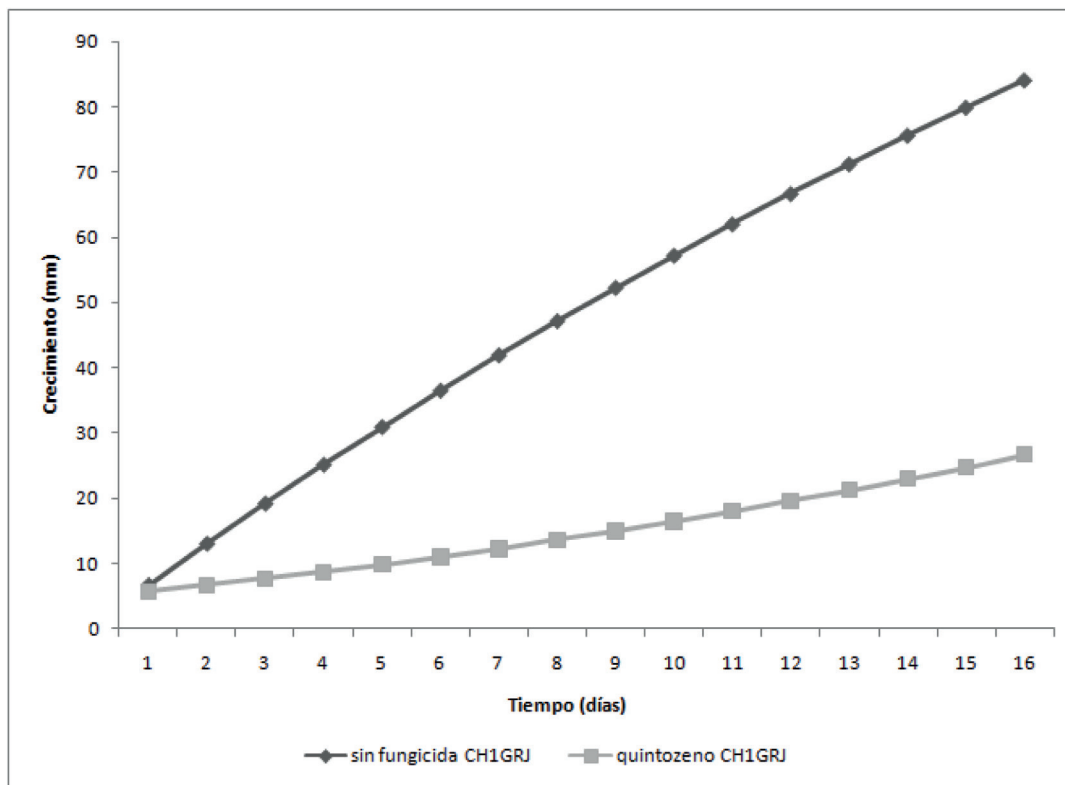


FIGURA 4. Crecimiento micelial en mm de la cepa de *Rosellinia necatrix* colectada en Coatepec Harinas sin fungicida y con quintozeno.

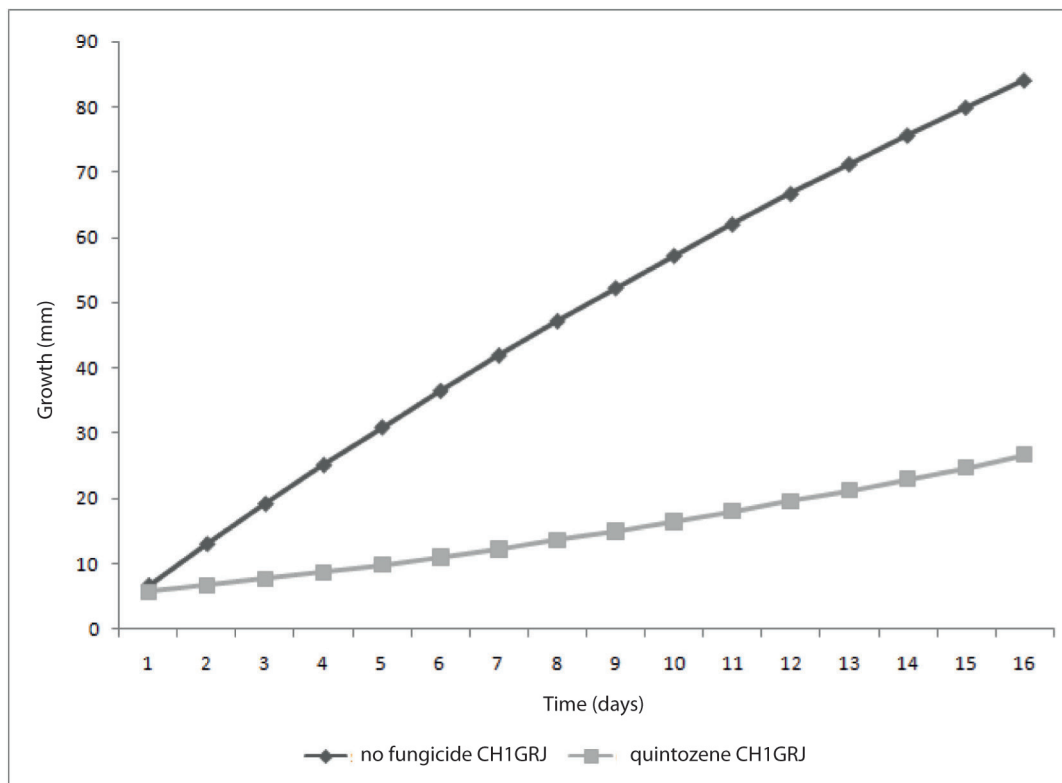


FIGURE 4. Mycelial growth in mm of the *Rosellinia necatrix* strain collected in Coatepec Harinas without fungicide and with quintozene.

CUADRO 3. Crecimiento micelial en mm de cepa de *Rosellinia necatrix* de Coatepec Harinas, Estado de México, sometida a diferentes fungicidas, en 4, 13 y 16 días después de la siembra.

Fungicidas	Crecimiento micelial de la cepa CH1GRJ		
	Día 4	Día 13	Día 16
Sin fungicida	25.19 a ^z	71.55 a	78.07 a
Quintozeno	7.37 b	21.27 b	25.96 b
Benomilo	7.00 b	7.00 c	8.46 c
Fluazinam	7.00 b	7.00 c	7.00 c
Tiofonato metilico	7.00 b	7.00 c	7.00 c

^zValores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

TABLE 3. Mycelial growth in mm of *Rosellinia necatrix* from Coatepec Harinas, State of Mexico, subjected to different fungicides, at 4, 13 and 16 days after planting.

Fungicides	Mycelial growth of the strain CH1GRJ		
	Day 4	Day 13	Day 16
No fungicide	25.19 a ^z	71.55 a	78.07 a
Quintozene	7.37 b	21.27 b	25.96 b
Benomyl	7.00 b	7.00 c	8.46 c
Fluazinam	7.00 b	7.00 c	7.00 c
Thiophanate methyl	7.00 b	7.00 c	7.00 c

^zValores con la misma letra dentro de cada columna son iguales de acuerdo con la prueba de Tukey a una $P \leq 0.05$.

DISCUSIÓN

En los cultivos de rosa bajo invernadero de la región de Villa Guerrero, Estado de México, se encontró que son frecuentes y severos los daños producidos por *R. necatrix*; las plantas de rosa atacadas presentan marchitez, escaso y pequeño follaje, el cual permanece adherido a las ramas por algún tiempo aun en plantas muertas, lo cual coincide con lo mencionado por Romero-Cova (1993). Simons (1997) menciona que el hongo se presenta en manchones y que en la parte subterránea se observan cordones miceliales de color blanco, los cuales conforme envejecen se tornan de color negro; esto fue observado en las plantas muestreadas, sobre todo donde el ataque de *R. necatrix* era severo.

El diámetro de micelio proveniente de raíces enfermas de rosa midió 4.1 μ y los hinchamientos piriformes en promedio 8.7 μ , mientras que bajo condiciones de

exhibit wilting as well as scarce and small foliage, which remains attached to the branches for some time even in dead plants, as has been reported by Romero-Cova (1993). Simons (1997) notes that the fungus occurs in patches and that underground there are white mycelial cords, which turn black as they age; this was observed in the sampled plants, especially where the *R. necatrix* attack was severe.

The diameter of mycelium from diseased rose roots measured 4.1 μ and the pyriform swellings averaged 8.7 μ , whereas under laboratory conditions they measured 2.6 μ and 5.2 μ , respectively; these results differ from those described by Makambila (1978) cited in Pérez-Jiménez (2006) and Khan (1959), who reported 13 μ for the pyriform swellings, four or six times more than the hyphae.

López-Herrera and Zea-Bonilla (2007), after evaluating in Spain the *in vitro* effects of the active ingredients benomyl, carbendazin, fluazinam and thiophanate methyl on *R. necatrix* obtained from avocado roots, found that

laboratorio midieron 2.6 μ y 5.2 μ , respectivamente; estos resultados difieren de lo descrito por Makambila (1978) citado en Pérez-Jiménez (2006) y Khan (1959), quienes reportan 13 μ para los hinchamientos piriformes, cuatro o seis veces más que las hifas.

López-Herrera y Zea-Bonilla (2007), tras evaluar en España los efectos *in vitro* de los ingredientes activos benomilo, carbendazim, fluazinam y tiofanato metílico sobre *R. necatrix* proveniente de raíces de aguacate, encontraron que a dosis mayores o iguales a 0.5 g·L⁻¹ los fungicidas inhiben por completo el crecimiento del hongo, mientras que a la dosis de 0.1 g·L⁻¹ los fungicidas son menos efectivos. Lo anterior coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que con benomilo y tiofanato metílico a dosis de 0.6 g·L⁻¹ las cepas no presentaron crecimiento micelial. Ambos fungicidas, pertenecientes al grupo de los bencimidazoles, tienen acción sistémica y por tanto un sitio de acción específico, lo cual contribuye a su actividad altamente selectiva, factor que a su vez conlleva a riesgos de resistencia. Por su lado, fluazinam, a la dosis de 0.5 g·L⁻¹, inhibió el crecimiento de *Rosellinia necatrix* en las cepas de Villa Guerrero y Tenancingo; este último fungicida de contacto actúa inhibiendo la respiración al afectar la fosforilación oxidativa (Latin, 2011).

Los datos obtenidos en este estudio indicaron que ocho de las nueve cepas evaluadas de *R. necatrix* no presentaron sensibilidad a quintozeno, a pesar de ser un fungicida de contacto con diferentes sitios de acción, entre los cuales se reportan: degradación de lípidos en membrana celular, destrucción mitocondrial y destrucción de enzimas involucradas en síntesis de pared celular (Latin, 2011). Estos resultados sugieren que quintozeno ha perdido actividad letal para este hongo y en el cultivo en estudio. Sin embargo, existen evidencias de la efectividad que tiene en el control de algunos otros hongos fitopatógenos como *Sclerotinia minor* Jagger, al reducir la formación de inóculo (Brenneman *et al.*, 1987); resultados similares son reportados con *Sclerotium rolfisii* Sacc. al señalar que este fungicida inhibe la formación de esclerocios por más de tres meses (Olivos y Mont, 1993; Rondón *et al.*, 1995); años más tarde, Shim *et al.* (1998) reportan la existencia de cepas de *S. rolfisii* tolerantes al mismo. Un estudio realizado con quintozeno a dosis de 3.64, 6.81 y 11.36 kg·ha⁻¹ para el control de *Rizoctonia solani* Kuhn en cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), reporta que a medida que aumentó la dosis, la incidencia y severidad de la enfermedad disminuyó, pero a dosis de 11.36 kg·ha⁻¹ el fungicida ocasionó fitotoxicidad (Pichardo, 1990).

CONCLUSIONES

La pudrición blanca de raíz en *Rosa* sp. se encontró asociada al hongo fitopatógeno *Rosellinia necatrix* Prill. (*Dematophora necatrix* (Hart.) Berl.), el cual fue identificado

at doses greater than or equal to 0.5 g·L⁻¹ the fungicides completely inhibit fungal growth, while at a dose of 0.1 g·L⁻¹ the fungicides are less effective. This coincides with the results obtained in this research, since with benomyl and thiophanate methyl at a dose of 0.6 g·L⁻¹ the strains showed no mycelial growth. Both fungicides, belonging to the benzimidazole group, have systemic action and therefore a site-specific action, which contributes to their highly-selective activity, a factor which in turn leads to risks of resistance. On the other hand, fluazinam, at the dose of 0.5 g·L⁻¹, inhibited *Rosellinia necatrix* growth in the Villa Guerrero and Tenancingo strains; this contact fungicide inhibits respiration by affecting oxidative phosphorylation (Latin, 2011).

Data from this study indicated that eight of the nine *R. necatrix* strains tested showed no sensitivity to quintozeno, despite being a contact fungicide with different sites of action, among which the following have been reported: degradation of lipids in cell membrane, mitochondrial destruction and destruction of enzymes involved in cell wall synthesis (Latin, 2011). These results suggest that quintozeno has lost lethal activity for this fungus and the crop under study. However, there is evidence of its effectiveness in the control of some other pathogenic fungi such as *Sclerotinia minor* Jagger, by reducing the formation of inoculum (Brenneman *et al.*, 1987). Similar results have been reported with *Sclerotium rolfisii* Sacc., indicating that this fungicide inhibits the formation of sclerotia for over three months (Olivos and Mont, 1993; Rondón *et al.*, 1995); a few years later, Shim *et al.* (1998) reported the existence of *S. rolfisii* strains tolerant to it. A study conducted with quintozeno at a dose of 3.64, 6.81 and 11.36 kg·ha⁻¹ for the control of *Rizoctonia solani* Kuhn in the cultivation of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) found that as the dose increased, the incidence and severity of the disease declined, but at a dose of 11.36 kg·ha⁻¹ the fungicide caused phytotoxicity (Pichardo, 1990).

CONCLUSIONS

White root rot disease in *Rosa* sp. was found associated with the phytopathogenic fungus *Rosellinia necatrix* Prill. (*Dematophora necatrix* (Hart.) Berl.), which was identified based on its morphological characteristics of pyriform mycelium and mycelial cords; nucleotide sequencing of the rDNA ITS1-ITS2 region of the strain confirmed the correct identification of the fungus. With respect to sensitivity, the strains T1GRJ, T2GRJ, T3GRJ, VG1GRJ, VG2GRJ, VG3GRJ, VG4GRJ and CH1GRJ showed mycelial growth with quintozeno, which can be translated into probable cases of resistance. Meanwhile, the strains T1GRJ, T2GRJ, T3GRJ and T4GRJ from Tenancingo, and the strains VG1GRJ, VG2GRJ, VG3GRJ and VG4GRJ from Villa Guerrero, were sensitive to benomyl, fluazinam and thiophanate methyl, so these fungicides can be considered useful for the control of

considerando sus características morfológicas de micelio piriforme y cordones miceliales; la secuenciación nucleotídica de la región ITS1-ITS2 del rADN de la cepa confirmó la correcta identificación del hongo. Respecto a la sensibilidad, de las cepas T1GRJ, T2GRJ, T3GRJ, VG1GRJ, VG2GRJ, VG3GRJ, VG4GRJ y CH1GRJ presentaron crecimiento micelial con quitozeno, lo que se puede traducir en probables casos de resistencia. En tanto, las cepas T1GRJ, T2GRJ, T3GRJ y T4GRJ, de Tenancingo, y las cepas VG1GRJ, VG2GRJ, VG3GRJ, VG4GRJ, de Villa Guerrero, fueron sensibles a benomilo, fluazinam y tiofanato metílico, por lo que se considera que estos fungicidas pueden ser útiles para el control de *Rosellinia necatrix*. En el caso de la cepa CH1GRJ, de Coatepec Harinas, fue sensible a benomilo y tiofanato metílico, no así con fluazinam, por lo que en esta región sólo se consideran útiles para el control de la enfermedad benomilo y tiofanato metílico.

LITERATURA CITADA

- AHRENS, U.; SEEMÜLLER, E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- BRENNEMAN, T. B.; PHIPPS, P. M.; STIPES, R. J. 1987. Control of *Sclerotinia blight* of peanut: sensitivity and resistance of *Sclerotinia minor* to vinclozolin, iprodione, dicloran, and PCNB. *Plant Disease* 71(1): 87-90.
- DEKKER, J. 1977. Resistance, pp. 176-197. *In: Systemic Fungicides*. MARSH, R. W. (ed.). Longman Group Limited. London.
- EDEL, V. 2000. Polymerase chain reaction in mycology: an Overview, pp. 1-19. *In: Applications of PCR in Mycology*. BRIDGE, P. D.; ARORA, D. K.; REDDY, C. A.; ELANDER, R. P. (eds.). CAB International. University Press, Cambridge. UK.
- FREEMAN, S.; SZTEJNBERG, A. 1992. *Rosellinia*, pp. 71-73. *In: Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic*. SINGLETON, L.; MIHAIL, D.; RUSH, M. (eds.). APS PRESS. St. Paul Minnesota. USA.
- FRESA, R. A. 1975. Podredumbre de las raíces de los frutales, pp. 237-342. *In: Fitopatología. Curso Moderno. Tomo II. Micosis*. SARASOLA, A. A.; ROCCA DE SARASOLA, A. M. (eds.). Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- GARCÍA, C. J.; GEORGE, A.; ARGYLE, T.; HOOPEN, M.; KRAUSS, U. 2005. ¿Existe la tolerancia genética del cacao (*Theobroma cacao*) a *Rosellinia bunodes* y *Rosellinia pepo*? *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica)* 75: 21-31.
- HOLLIDAY, P. 1995. *Fungus Diseases of Tropical Crops*. Courier Dover Publications. USA. 624 p.
- KHAN, A. H. 1959. Biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. *Biología Lahore* 5: 199-245.
- LATIN, R. 2011. *A Practical Guide to Turfgrass Fungicides*. APS PRESS. St. Paul, Minnesota U.S.A. 270 p.
- LÓPEZ-HERRERA, C. J.; ZEA-BONILLA, T. 2007. Effects of benomyl, carbendazim, fluazinam and thiophanate methyl on white root rot of avocado. *Crop Protection* 26(8): 1186-1192.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. 2004. *Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación. Madrid España. 1011 p.
- MENDOZA, Z. C. 2002. Fungicidas en ornamentales, pp. 119-147. *In: Manejo Fitosanitario de Ornamentales*. BAUTISTA, M. N.; ALVARADO, J.; CHAVARÍN, J. C.; SÁNCHEZ, H. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. México.
- OLIVOS, M. I.; MONT, R. 1993. Use of fungicides and *Trichoderma viride* for the control of *Sclerotium rolfsii*. *Fitopatología* 28: 16-20.
- PÉREZ-JIMÉNEZ, R. M. 2006. A review of the biology and pathogenicity of *Rosellinia necatrix*-cause of white root rot disease of fruit trees and other plants. *Journal of Phytopathology* 154: 257-266.
- PICHARDO, G. S. 1990. Evaluación de pentacloronitrobenzeno (PCNB) en el control de la pudrición radicular causada por *Rizoctonia solani* kuhn en frijol común (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomía Mesoamericana* 1: 55-61.
- ROMERO-COVA, S. 1993. *Hongos Fitopatógenos*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 347 p.
- RONDÓN, A.; FLORES, Y.; MUJICA, Y.; SOTO E. 1995. Control químico *in vitro* y en umbráculo del hongo causante de la pudrición blanca. *Revista de la Facultad de Medicina Universidad del Zulia Maracaibo* 12(1): 1-13.
- RUANO-ROSA, D.; SCHENA, L.; IPPOLITO, A.; LÓPEZ-HERREIRA, C. J. 2007. Comparison of conventional and molecular methods for the detection of *Rosellinia necatrix* in avocado orchards in southern Spain. *Plant Pathology* 56: 251-256.
- SEDAGRO. Producción Agrícola 2006. Disponible en Línea: <http://www.edomex.gob.mx/desarrolloagropecuario/docs/xls/CierreAgricola06.xls>. [Consultado: Septiembre 12 de 2008.]
- SHIM, M.Y.; STARR, J. L.; KELLER, N. P.; WOODARD, K. E.; LEE, T. A. 1998. Distribution of isolates of *Sclerotium rolfsii* tolerant to pentachloronitrobenzene in Texas peanut fields. *Plant Disease* 82: 103-106.
- SIMONS, S. A. 1997. Root and tuber crops, pp. 109-149. *In: Soilborne Diseases of Tropical Crops*. HILLOCKS, R. J.; WALLER, J. M. (eds.). Cab International. New York, USA.
- SMITH, I. M.; DUNEZ, J.; LELLIATT, R. A.; PHILLIPS, D. H.; ARCHER, S. A. 1992. *Manual de las Enfermedades de las Plantas*. Mundi-Prensa. España. 671 p.
- STEPHEN, F. A.; WARREN, G.; WEBB, M.; EUGENE, W. M.;

End of English Version

- LIPMAN, D. J. 1990. Basic local alignment search tool (BLAST). *Journal of Molecular Biology* 25(3): 403-410.
- STREETS, B. R. 1979. *The Diagnosis of plant diseases. A field and laboratory manual emphasizing the most practical methods for rapid identification.* University of Arizona Press. Tucson Arizona. USA. 245 p.
- TAMAYO, M. P. J. 2007. Enfermedades del aguacate. *Revista Politécnica* 4: 51-70.
- TERRAZAS, G. F. J. 2002. Apoyos a la floricultura por parte de dependencias gubernamentales, pp. 1-7. *In: Manejo Fitosanitario de Ornamentales.* BAUTISTA, M. N.; ALVARADO, J.; CHAVARÍN, J. C.; SÁNCHEZ, H. (eds.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. México.
- WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, pp. 315-322. *In: PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.* INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J.; WHITE, T. J. (eds.). Academic Press. San Diego, California, USA.