



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

INSTITUTO DE HORTICULTURA

**ETIOLOGÍA DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN
'PERSA', FILOGENIA, PATOGENICIDAD Y CONTROL DE SU
AGENTE CAUSAL**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

PRESENTA:

MARCO ANTONIO BAUTISTA CRUZ

BAJO LA SUPERVISIÓN DE: Dr. GUSTAVO ALMAGUER VARGAS



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



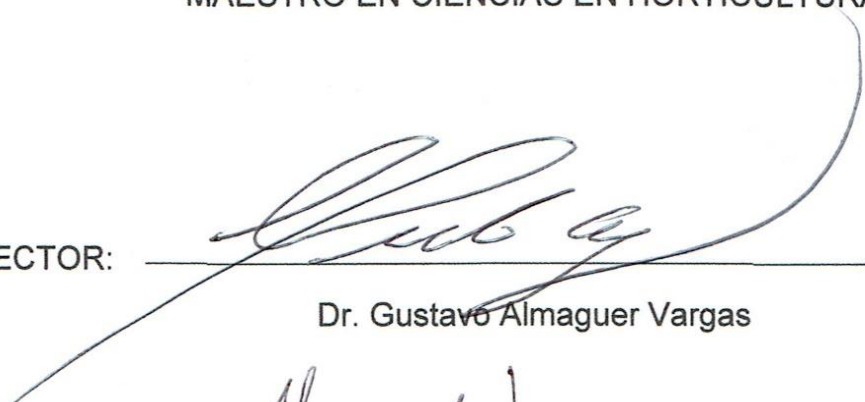
Chapingo, Texcoco, Edo. de México, junio de 2017

ETIOLOGÍA DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN 'PERSA', FILOGENIA, PATOGENICIDAD Y CONTROL DE SU AGENTE CAUSAL

Tesis que presenta **Marco Antonio Bautista Cruz**, bajo la supervisión del comité asesor que se indica, para ser aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

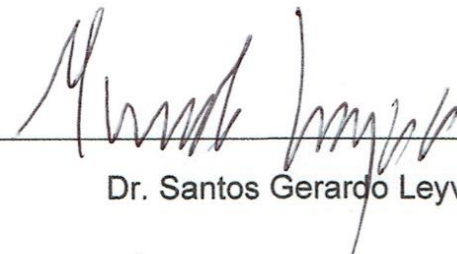
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



Dr. Gustavo Almaguer Vargas

CODIRECTOR:



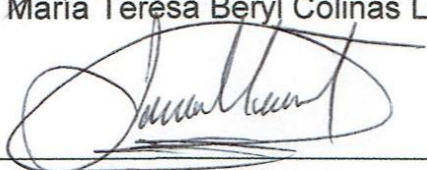
Dr. Santos Gerardo Leyva Mir

ASESOR:



Dra. María Teresa Beryl Colinas León

ASESOR:



Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos generales	2
1.2. Objetivos específicos	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Antecedentes del cultivo de limón en México	3
2.2. Principales enfermedades del limón 'Persa'	4
2.2.1. Antracnosis	4
2.2.2. Huanglongbing	5
2.2.3. Leprosis de los cítricos	5
2.2.4. Exocortis	6
2.2.5. Tristeza de los cítricos	6
2.2.6. Gomosis de los cítricos	7
2.2.7. Muerte descendente	8
2.3. Descripción de <i>Lasiodiplodia</i>	8
2.4. LITERATURA CITADA	10
3. FILOGENIA, DISTRIBUCIÓN Y PATOGENICIDAD DE ESPECIES DE <i>Lasiodiplodia</i> CAUSANTES DE LA MUERTE DESCENDENTE DE RAMAS DE LIMÓN PERSA EN VERACRUZ Y PUEBLA	13
3.1. INTRODUCCIÓN	14
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	15
3.2.1. Muestreo y aislamiento del patógeno	15
3.2.1.1. Aislamiento del patógeno	15
3.2.2. Extracción de ADNr, amplificación por PCR y secuenciación	17
3.2.3. Análisis filogenético	18

3.2.4.	Pruebas de patogenicidad.....	18
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
3.3.1.	Síntomas en campo y aislamiento del patógeno	19
3.3.2.	Distribución de las especies de <i>Lasiodiplodia</i>	21
3.3.3.	Análisis filogenético.....	23
3.3.4.	Prueba de patogenicidad	26
4.	EFFECTIVIDAD DE FUNGICIDAS EN EL CONTROL DE <i>Lasiodiplodia</i> spp., EN LIMÓN ´PERSA´ EN VERACRUZ	35
4.1.	INTRODUCCIÓN.....	36
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
4.2.1.	Localización del sitio experimental	37
4.2.2.	Diseño experimental.....	37
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
4.4.	CONCLUSIONES	44
4.5.	LITERATURA CITADA	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Localidad, municipio, fecha de colecta y tejido infectado de limón ‘Persa’ de los aislados de Botryosphaeriaceae en estudio para su caracterización patogénica y análisis de secuencia EF-1 α , ITS y β -Tubulina.....	16
Cuadro 2. Relación de los fungicidas químicos utilizados en el control de la muerte descendente del limón ‘Persa’.....	38
Cuadro 3. . Parámetros obtenidos para la caracterización de la epidemia en cada uno de los tratamientos evaluados en limón ‘Persa’.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de la Muerte descendente del limón ‘Persa’ observados en campo: muerte de ramas jóvenes (a), marchitez en follaje, (b , c y d) defoliación y muerte descendente y continua de ramas jóvenes y ramas maduras hasta el colapso del árbol, (e y f), necrosis en madera de rama, (g) anillamiento del tallo principal, (h , i) escurrimientos de goma y rajaduras en corteza, (j) pudrición del pedúnculo y fruto, (k , l) necrosis en cortes de poda.	20
Figura 2. Colonias de Lasiodiplodia. a <i>L. brasiliensis</i> , b <i>L. pseudotheobromae</i> , c <i>L. citrícola</i> , d <i>L. jatrofiphicola</i> , e <i>L. subglobosa</i> , f <i>L. theobromae</i>	21
Figura 3. Distribución de Lasiodiplodia por especie y por Municipio en la región de estudio.	23
Figura 4. Árbol de parsimonia máxima generado a partir del análisis de secuencias del conjunto combinado de datos ITS, TEF1- α y β -tub, obtenidos de las secuencias de las especies de Lasiodiplodia, causantes de la muerte descendente en cítricos, Veracruz, México.	25
Figura 5. Síntomas producidos por Lasiodiplodia inoculada en limón ‘Persa’. a .- Lesiones y escurrimiento de goma. b .- Rajaduras en la corteza. c .- Lesión externa. d .- Lesión interna.	27
Figura 6. Longitud media de la lesión externa (mm) de la prueba de patogenicidad con aislados de Lasiodiplodia en árboles de limón ‘Persa’. Las letras diferentes por arriba de las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) (Prueba de Fisher).	28
Figura 7. Curva de progreso de la muerte descendente del limón ‘Persa’, en función de los diferentes tratamientos fungicidas aplicados.	42

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento proporcionado para realizar esta investigación.

A la Universidad Autónoma Chapingo y al Instituto de Horticultura por todos los conocimientos que me brindaron para mi formación profesional.

Al Dr. Gustavo Almaguer Vargas y al Dr. Gerardo Leyva Mir por su decidido apoyo, para desarrollar esta investigación.

Al Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza, a la Dra. Leticia Robles Yerena, al Dr. Moisés Camacho Tapia por su dedicación, paciencia y sus valiosos consejos que me guiaron para desarrollar este trabajo.

A la Dra. Ma. Teresa B. Colinas León por sus valiosas contribuciones para la mejora del presente trabajo.

A mis amigos Gaby, Diego, Eddi, Deneb y Monse, con quienes compartí experiencias inmejorables.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

Dedicatoria

A mi esposa

Martha De Luna García, por amarme y contribuir de forma incondicional en la consecución de este logro. Por alentarme a seguir adelante en los momentos difíciles que nos tocó vivir juntos. Sin ti sería muy difícil conseguir mis metas.

A mi familia, principalmente a mis padres, por el ejemplo, apoyo y confianza que me han brindado.

DATOS BIOGRÁFICOS

Datos personales

Nombre	Marco Antonio Bautista Cruz
Fecha de nacimiento	Marzo 15 de 1974
Lugar de nacimiento	México, D. F.
CURP	BACM740315HVZTRROO
Cédula profesional	09288545

Desarrollo académico

Bachillerato	Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario núm. 168 Zacapoaxtla, Puebla.
Licenciatura	Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo.

ETIOLOGÍA DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL LIMÓN 'PERSA', FILOGENIA, PATOGENICIDAD Y CONTROL DE SU AGENTE CAUSAL

ETIOLOGY OF PERSIAN LIME DIEBACK, PHYLOGENY, PATHOGENITY AND CONTROL OF ITS CAUSATIVE AGENT

Marco Antonio **Bautista Cruz** ¹ y Gustavo **Almaguer Vargas** ²

RESÚMEN

El presente estudio consistió en identificar mediante técnicas moleculares, al agente causal de la muerte descendente del limón 'Persa', evaluar su patogenicidad y virulencia en árboles de limón 'Persa', y su control en campo con fungicidas químicos y biológicos. En agosto de 2015, de 12 huertos comerciales de los Municipios de Martínez de la Torre, Tlapacoyan y Papantla del Estado de Veracruz y de Acateno y Hueytamalco del Estado de Puebla, se recolectaron 120 muestras de árboles con síntomas de muerte descendente y a partir de ellas, se obtuvieron 32 aislados fúngicos que se identificaron utilizando análisis filogenéticos basados en la secuencia parcial de los genes de factor de elongación 1- α (TEF1- α), y beta tubulina (β -tub), así como la región del espaciador transcrito interno (ITS). Se identificaron siete especies: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. theobromae*, *L. citrícola*, *L. brasiliensis*, *L. jattophicola* y *L. sterculiae*, las cuales se inocularon en árboles de limón 'Persa' y todas mostraron ser patogénicas. Se evaluó en campo la efectividad de tiofanato de metilo (1 g L⁻¹), tiabendazole (2.5 g L⁻¹), clorotalonil (3 g L⁻¹), mancozeb (4 g L⁻¹), *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma viridae* (20 mL L⁻¹) y un testigo sin aplicación, para el control de *Lasiodiplodia* después de la poda. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar. La unidad experimental se constituyó de dos árboles con tres repeticiones. La unidad de muestreo fueron dos ramas podadas de cada punto cardinal del árbol, dentro de cada unidad experimental. Tiofanato de metilo presentó mayor efectividad en el control de *Lasiodiplodia*, seguido de tiabendazol y *Trichoderma spp.*

Palabras clave: Citrus latifolia Tan., Lasiodiplodia, control en campo

Tesista: Marco Antonio Bautista Cruz

Director: Gustavo Almaguer Vargas

ABSTRACT

This study consisted of identifying the causative agent of dieback in Persian lime, with the use of molecular techniques, and evaluating its pathogenicity and virulence in Persian lime trees, and its control in the field with chemical and biological fungicides. In August of 2015, 120 samples with symptoms of dieback were collected from 12 commercial orchards in the municipalities of Martinez De La Torre, Tlapacoyan, and Papantla in the state of Veracruz, and in those of Acateno and Hueytamalco in the state of Puebla. From these samples, 32 fungal isolates were obtained and identified using phylogenetic analysis based on partial sequencing of the genes elongation factor 1- α (TEF1- α), beta-tubulin (β -tub) and the internal transcribed spacer (ITS). Seven species were identified: *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. theobromae*, *L. citrícola*, *L. brasiliensis*, *L. jattophicola* and *L. sterculiae*, which were inoculated into Persian lime trees and all were shown to be pathogenic. A field test was carried out, evaluating the effectiveness of thiophanate-methyl (1 g L⁻¹), tiabendazole (2.5 g L⁻¹), chlorothalonil (3 g L⁻¹), mancozeb (4 g L⁻¹), *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma viridae* (20 mL L⁻¹) and an experimental control for the control of *Lasiodiplodia* after pruning. A complete randomized block design was used and the experimental unit consisted of two trees with three replications. The sampling units consisted of two pruned shoots of every cardinal direction in every tree. Thiophanate-methyl presented the greatest effectiveness in the control of *Lasiodiplodia*, followed by tiabendazole and *Trichoderma spp.*

Keywords: Citrus latifolia Tan., Lasiodiplodia, field management.

1. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el cultivo de limas y limones es de gran importancia, por su aporte de ácido cítrico, aceites esenciales y otros subproductos. La India ocupa el primer lugar en producción, seguida por México y China con una superficie cosechada de 255,200.00, 151,765.00 y 87,000.00 ha respectivamente (FAO, 2013).

México es el país líder en la exportación de este producto, aportando cerca de la cuarta parte de la producción nacional, aproximadamente 525, 482 ton, a Estados Unidos principalmente lo que representa un 90 % de las exportaciones totales por este concepto. De las cuales poco más del 85 % de estas exportaciones corresponde a limón persa. El consumo anual per cápita de limón en México oscila en 13.9 kg. Los principales estados productores de limón 'Persa' son Veracruz, Michoacán, Oaxaca, Tabasco y Puebla. (SIAP, 2017).

Las condiciones cálido-húmedas que prevalecen en la región limonera de Martínez de la Torre, Tlapacoyan, Papantla, Acateno y Hueytamalco, favorecen la incidencia de enfermedades fungosas como la gomosis de los cítricos. Esta enfermedad es la causa principal de la decadencia y muerte de árboles de limón 'Persa'. En varias regiones del mundo y en la región citrícola de Veracruz y Tabasco, se ha atribuido a diversas especies de *Phytophthora* (Acosta *et al.*, 2014), en casos específicos a especies de *Fusarium* (Silva *et al.*, 2016). Algunos estudios, relacionaron a hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* como agentes causales de la gomosis (muerte descendente) en varios cultivos tropicales incluidos los cítricos. Sin embargo, en México no existen reportes que relacionen directamente a estos hongos afectando a limón 'Persa'.

Los tratamientos utilizados para el control de la gomosis consisten en la aplicación de fungicidas como Fosetil-Al y Metalaxil, pero el control no ha sido efectivo y la enfermedad se incrementa. Por esta razón el presente estudio tuvo como objetivo identificar al agente causal de esta enfermedad en la región limonera de los Municipios de Martínez de la Torre, Tlapacoyan y Papantla en el Estado de Veracruz y de Acateno y Hueytamalco en el Estado de Puebla,

mediante análisis de secuencias del ADNr. Así también, evaluar la eficiencia de productos fungicidas químicos y biológicos para su control.

1.1. Objetivos generales

Identificar al agente causal de la muerte descendente del limón 'Persa' en la zona limonera Martínez-Tlapacoyan-Papantla, Hueytamalco-Acateno, mediante aislamientos, pruebas de patogenicidad y análisis de secuencias del ADNr.

Evaluar la efectividad de productos químicos y biológicos para el control del agente causal de la enfermedad en el limón 'Persa'.

1.2. Objetivos específicos

Colectar muestras de tejido afectado en árboles de limón 'Persa' de doce huertos de la región limonera de Martínez-Tlapacoyan-Papantla, Hueytamalco-Acateno, para aislar e identificar al agente causal de la muerte descendente.

Evaluar la patogenicidad y virulencia de los aislados obtenidos, en arboles de limón persa.

Identificar mediante técnicas moleculares, las especies fúngicas presentes del agente causal de la muerte descendente de limón 'Persa'.

Evaluación en campo del control químico y biológico de la muerte descendente del limón 'Persa'.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes del cultivo de limón en México

En México se cultivan dos variedades de limas ácidas de interés comercial conocidas comúnmente como limones, la lima 'Tahití' o 'Persa' (*Citrus latifolia* Tan.) y la lima 'Key' o 'Mexicana' (*Citrus aurantifolia* L.). Los frutos de estas variedades se diferencian por la presencia de semillas en limón mexicano, por su composición química (menos ácida y con mayor contenido de vitamina C en lima 'Persa') y por su tamaño, que en el caso del 'Persa' es de mayor tamaño y con ausencia de semillas. Los árboles se diferencian en limón 'Persa' por ser de mayor tamaño, con hojas más grandes y oscuras y con menor cantidad de espinas en ramas (Schwentesius y Gómez, 2005).

El cultivo del limón con fines comerciales en México se inició en 1911 en el estado de Michoacán y en 1925 en Colima, con el cultivar limón 'Mexicano'. Para 1927 la superficie cosechada era de 3,135 ha⁻¹. El cultivo creció a una tasa del 3.5 % hasta 1938, y a partir de ese año hasta 1950 la tasa de crecimiento se incrementó al doble, debido a que en Europa se afectaron las regiones productoras. De 1950 a 1960 la tasa de crecimiento del cultivo se estancó en 3 %. Después de 1970 la política institucional fomentó el desarrollo del cultivo otorgando crédito barato, impulsando sociedades colectivas, programas de investigación y extensionismo y demás estrategias como parte del fenómeno de hortoculturización de la agricultura mexicana. Esto se reflejó en el incremento de la superficie cultivada que pasó de 22 698 ha⁻¹ en 1970 a 48 286 ha⁻¹ en 1971 manteniendo una tasa de crecimiento del 9.7 % (ASERCA, 1996). El limón Mexicano se cultiva principalmente en la zona costera del pacífico, en los estados de Michoacán, Colima, Oaxaca, Guerrero y Jalisco y ocupa una superficie cultivada de aproximadamente 97,988.73 ha⁻¹ (SIAP, 2016).

El cultivo de limón 'Persa' en México inició en Martínez De La Torre, Veracruz, y fue promovido por la empresa refresquera Coca Cola en la década de los 70, con la finalidad de proveerse de ácido cítrico para elaborar sus refrescos. Sin

embargo, el producto obtenido no tuvo la calidad demandada por parte de la empresa refresquera (mucho jugo y poco aceite) y la empresa abandonó el proyecto. Los productores comenzaron a introducir el limón al mercado estadounidense por la ruta del valle de Texas. En 1982 EEUU cerró la frontera a la importación de limón 'Mexicano' procedente de Colima y Michoacán argumentando problemas con "la bacteriosis de los cítricos", el limón 'Persa' encontró mayores perspectivas y se consolidó al destruirse la producción de limón de la Florida por una helada a fines de 1989 y al ser arrasada por el huracán Andrew en agosto de 1992. Este cultivo ha resultado ser una alternativa real para muchos productores y comerciantes de la región costera del golfo de México, porque su mercado tanto externo como interno, se encuentra en expansión. El limón 'Persa' se cultiva en la zona costera del Golfo de México en los estados de Veracruz, Tabasco, Yucatán, Puebla y parte de Oaxaca (Schwentenius y Gómez, 2005).

2.2. Principales enfermedades del limón 'Persa'

2.2.1. Antracnosis

La antracnosis de los cítricos es una enfermedad importante porque está directamente correlacionada con la producción, a mayor incidencia menor producción, existen reportes que atribuyen a esta enfermedad una disminución de la producción de hasta 76 %. La antracnosis es causada por el hongo *Colletotrichum acutatum*, se caracteriza por causar daño a hojas nuevas, frutos inmaduros y botones florales. Cuando afecta los botones florales, estos se tornan color salmón y son abortados. Previo a la caída, los frutos pequeños toman una coloración amarilla en la base y al desprenderse queda adherido a la rama el disco basal, cáliz y pedúnculo que en la región de Martínez De la Torre es conocida como "tachuela". Si el fruto es infectado en etapa tardía, desarrollan lesiones grandes con hundimientos, se convierten en frutos deformes y de tamaño reducido. Esta enfermedad se ve favorecida cuando las floraciones coinciden con la temporada de lluvias. (Barquero *et al.*, 2012; Ruiz *et al.*, 2014).

2.2.2. Huanglongbing

Entre los factores limitantes para el cultivo de limón persa a nivel mundial, están las enfermedades como el Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter*) o dragón amarillo que ha causado daños importantes en Taiwán, Sudáfrica, África, Asia, EEUU y recientemente en México donde ha causado estragos en la citricultura de la región costera del Pacífico (Mora *et al*, 2013; Robles *et al*, 2013).

Esta enfermedad afecta los tejidos del floema limitando el traslado de fotoasimilados en el árbol. Algunos síntomas característicos en cítricos son aparición de brotes amarillos con aspecto moteado, el rendimiento se ve disminuido considerablemente por frutos pequeños, deformes y con poca coloración que se desprenden prematuramente del árbol. Los árboles afectados presentan defoliación y se observan con escaso follaje (Robles *et al*, 2013).

2.2.3. Leprosis de los cítricos

Esta es una enfermedad destructiva de tipo viral, ocasiona daños considerables en cosechas de cítricos y su agente causal es el Citrus leprosis virus (CiLV). Fue descrita por primera vez en 1923 en EEUU, hoy se encuentra en América del Sur y se propaga por varios países de Centroamérica. En 2004 se detectó en Chiapas en plantas de traspatio y para 2006 se detectó en huertos comerciales de Tabasco, en ambos casos se decretó cuarentena y se eliminaron más de 100 000 árboles. Sin embargo, se detectó en Las Choapas, Veracruz en 2010. Afecta varias especies cítricos de los cuales el naranjo es el más susceptible. El virus causa infecciones y lesiones locales no sistémicas en plantas susceptibles, en ramas jóvenes hojas y frutos aparecen anillos cloróticos si el árbol se encuentra en producción, presenta daños corticales en tronco, ramas y frutos. En las ramas más jóvenes, hojas y frutos aparecen anillos cloróticos, en ocasiones con una necrosis central, que se convierten en canchales con presencia de goma. Los frutos afectados presentan lesiones con formas irregulares lisas y amarillas, que se tornan oscuras a cuando el fruto madura.

Los ácaros *Brevipalpus phoenicis*, *B. obovatus* y *B. californicus* son los vectores del virus cuando se alimentan de tejidos infectados (Peña *et al.*, 2004).

2.2.4. Exocortis

La exocortis de los cítricos es una enfermedad con presencia en la mayoría de las áreas citrícolas del mundo. Tiene como agente causal al Citrus exocortis viroide del género *Pospiviroid*. Esta enfermedad causa enanismo, rajaduras y descamación en la corteza del tronco, pocas veces tiene efecto letal, sin embargo, reduce los rendimientos. En limón puede observarse tejidos cloróticos. Esta enfermedad se transmite por injerto con yemas infectadas o en forma mecánica por herramientas contaminadas (Peña *et al.*, 2004).

2.2.5. Tristeza de los cítricos

La tristeza de los cítricos es una enfermedad de tipo viral originada en el sudeste asiático, y de ahí se ha distribuido en la mayoría de los países citrícolas. El agente causal es el Citrus tristeza virus (CTV), que es un virus de varilla flexible y está limitado al floema. Se manifiesta como un complejo de variantes del virus con diferente grado de severidad, por esta razón los síntomas son variados y van desde árboles asintomáticos hasta los que colapsan a consecuencia de la necrosis del floema en la línea de unión entre patrón e injerto, induciendo efecto de anillado, tomando el follaje un aspecto clorótico, marchito y con fructificación abundante y con la destrucción del sistema radical. Cuando el declinamiento es lento se observan acanaladuras en el tallo, protuberancias en forma de agujas relacionados con orificios pequeños en la corteza. Esta enfermedad se detectó por primera vez en México en 1982, en el estado Tamaulipas y para 1986 se reportó en Veracruz, como medida de contención se eliminaron las plantas enfermas, sin embargo, en 1992 se reportaron plantas positivas en vivero procediendo a su erradicación. Con fundamento en estos hechos, en agosto de 2001, se establece la Campaña contra el Virus Tristeza de los Cítricos (NOM-031-FITO-2000), donde puntualiza no utilizar el naranjo agrio (*C. aurantium*) como portainjerto, excepto en cultivares de limón mexicano y para 2002 se

establecieron los “Requisitos fitosanitarios para la producción y movilización de material propagativo de cítricos libre de virus tristeza y otros patógenos asociados a cítricos” (NOM-079-FITO 2002). En esta Norma se estipulan los requisitos para la certificación de Bancos de Germoplasma, Lotes Productores de Yemas, Huertas Productoras de Semilla y Viveros para la producción de plantas certificadas (SENASICA, 2011; Villegas y Mora, 2011).

2.2.6. Gomosis de los cítricos

La gomosis de los cítricos es una enfermedad que tiene como agente causal a varias especies del género *Phytophthora* (Álvarez, 2008). Acosta *et al.*, (2012), observaron que la gomosis provoca la pérdida de árboles de hasta un 5 % anual en la región de Huimanguillo, Tabasco. Comienza con la aparición de lesiones o rajaduras en el tallo que aumentan hasta rodear por completo la rama y destruir los tejidos floemáticos causando el colapso del árbol. Los árboles de limón Mexicano enfermos de gomosis reducen su rendimiento hasta en un 60 %, mientras que en aquellos arboles con daño ligero se reduce entre un 5 a 10 % (González *et al*, 2003).

El manejo integrado de esta enfermedad contemplaba el uso del portainjerto naranjo agrio que ofrecía alta resistencia a esta enfermedad, sin embargo, con la finalidad de prevenir el CTV, a finales de la década de los noventa, las plantaciones de cítricos se hacen utilizando portainjertos tolerantes a este virus y la mayoría de ellos son sensibles a la gomosis o pudrición del pie (Castillo *et al.*, 2004; Acosta *et al.*, 2012), con excepción de *Poncirus trifoliata*, *Citrange troyer* y *Citrange carrizo* que son tolerantes a esta enfermedad (Echemendia, 2003).

El salpique de las gotas de lluvia además de las prácticas agrícolas como la poda, favorecen la diseminación de este patógeno. Así mismo, debido a que *Phytophthora spp.* requiere de humedad en el suelo para germinar sus zoosporas, los suelos con mal drenaje favorecen el desarrollo de esta enfermedad (Perches y Galindo, 1967; Álvarez *et al.*, 2006).

Algunas prácticas que pueden ayudar a prevenir este problema son las siguientes: Injertar la variedad comercial a una altura mayor a 30 cm a partir del suelo; establecer drenajes adecuados; evitar prácticas que produzcan heridas a las plantas; realizar raspado de la goma y de los tejidos necrosados, y aplicar fungicidas como fosetil aluminio (Echemendia, 2003). Con la finalidad de reducir la pérdida de árboles, los productores de la región de Martínez De La Torre tienen la cultura “del replante” (Villegas y Mora, 2011).

2.2.7. Muerte descendente

La “muerte descendente” es una de las principales enfermedades en varios cultivos de importancia económica en las regiones del trópico y subtrópico. Varios estudios identificaron hongos de la familia Botryosphaeriaceae, como agentes causales y la reportan en mango, zapote mamey, aguacate, vid, guanábana, durazno, pera, manzana y en eucalipto (Vázquez *et al.*, 2009; Eskalen *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2016; Úrbez *et al.*, 2008; Delgado *et al.*, 2016). Cedeño & Palacios (1992) y Adesemoye *et al.*, (2014) encontraron que *Lasiodiplodia* causó esta enfermedad en cítricos de Venezuela y California respectivamente.

Los síntomas característicos de la muerte descendente en la mayoría de los frutales afectados son: rajadura de corteza, escurrimientos de goma, y cáncer o necrosis de tallo en árboles, muerte de ramas, anillamiento del tronco principal y muerte del árbol. Esta enfermedad se disemina rápidamente convirtiéndose en un serio problema fitosanitario en cualquier etapa del cultivo, desde el vivero hasta en huertos de cualquier edad (Cedeño y Palacios, 1992; Vázquez *et al.*, 2009; Adesemoye *et al.*, 2014).

2.3. Descripción de *Lasiodiplodia*

Lasiodiplodia theobromae es la especie tipo del género *Lasiodiplodia*, descrito por primera vez por Saccardo en 1980, pertenece a la División Ascomycota, al orden Botryosphaeriales y a la familia Botryosphaeriaceae. Es un hongo cosmopolita, catalogado como patógeno latente, se encuentra como endófito en

la planta, y cuando la planta se estresa o debilita, el hongo se convierte en patógeno. Este hongo presenta picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en conidios maduros, estas características han permitido describir morfológicamente cerca de 20 especies. Las descripciones más recientes de estas especies, aparte de la morfología, se basan en la secuenciación de las regiones espaciadoras intergénicas del rDNA (ITS) y factor de elongación 1 alfa (EF-1). Las colonias en medio de cultivo son moderadamente densas, con micelio aéreo, inicialmente blancas tornándose gris-olivo a los 7 días y con el tiempo adquieren un color negro. (Picos *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2016).

Este hongo ocasiona muerte descendente, cáncer, gomosis, tizón de la hoja, pudrición de raíz en plantas maderables y cultivos. La principal vía de entrada de *Lasiodiplodia* a los hospedantes es a través de heridas producidas por el manejo como poda, heridas provocadas por insectos o causas naturales. A nivel mundial se reporta en mango, aguacate, papaya, plátano, rambután, litchi, uva, guanábana, nuez de la India, cítricos, duraznos y longan entre otros. También se ha reportado afectando semillas en por lo menos 24 géneros de plantas, entre ellos cacahuete, calabaza, algodón, pino y maíz (Picos *et al.*, 2014; León y Mattos, 2016). En México se ha reportado desde 1976 afectando cacao, reportes posteriores a este lo mencionan afectando aguacate, papaya, árbol de caucho, caña de azúcar, durazno, mango, chirimoya, zapote mamey, vid, algodón, yuca, camote, barbasco, eucalipto y otros más (Picos *et al.*, 2014; Hernández *et al.*, 2016).

2.4. LITERATURA CITADA

- Acosta-Pérez, J. A., Ortiz-Gacía, C. F., Zaldívar-Cruz, J. M., Rodríguez-Cuevas, M., Bautista-Muñoz C. C. y Castillo-Aguilar C. de la Cruz. (2012). Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la región citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 28(3), 245-258.
- Adesemoye, A. O., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Twizeyimana, M., Lynch, S. C., & Eskalen, A. (2013). Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease*, 98(1), 55-61.
- Álvarez, B. L. A. (2008). Estudios de etiología, epidemiología y control de un nuevo síndrome de lesiones en tronco y ramas principales de cítricos asociado a *Phytophthora*. *Tesis Doctoral*, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- ASERCA, 1996. El limón persa y el limón mexicano: la complementariedad del mercado. *Revista Claridades Agropecuarias* 30.
- Barquero-Quiróz, M.; Peres, N. A. y L. F. Arauz. 2012. Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense* 37(1). 23-38.
- Castillo, M. J. A., Villanueva-Jiménez, J. A., & Ortega, A. L. D. (2004). Capacitación de productores en investigación-acción: Estudio de caso del control biológico del minador de la hoja de los cítricos (*Phyllocnistis citrella* Stainton) en agroecosistemas de Veracruz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 4,15-20.
- Cedeño, L. Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causa de lesiones y gomosis en cítricos.--p. 10-13 (No. HEM). En: Fitopatología Venezolana.--Vol. 5, no. 1 (1992).
- Delgado C., L.; Mondino H., P. & Alanis F., S. 2016. *Botryosphaeriaceae* species associated with stem canker, die-back and fruit rot on apple in Uruguay. *Plant Pathology* 146. 637–655.
- Echemendia M., Y. 2003. *Phytophthora*: Características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales. Medidas de control. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Consultado en 10-01-2015. En <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>
- Eskalen, A.; Faber, B. & Bianchi, M. 2013. Spore Trapping and Pathogenicity of Fungi in the *Botryosphaeriaceae* and *Diaporthaceae* Associated with Avocado Branch Canker in California. *Plant Disease*. 97. 329-332.
- FAO. (2013). Área cosechada de limas y limones por país. FAO. Consultado en Abril 10 de 2017. [En: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/anuario-estadistico/es/#.WOpopljhC00>].

- González-Estrada, A., Medina, U. V. M., Robles, G. M., Martínez, P. R., & Wood, S. (2003). Impacto económico del control de la gomosis del limonero Mexicano con los portainjertos del INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias. Chapingo, México.
- Hernández F., L. M.; Gómez J., R. y Urías L., M. A. 2016. Insectos barrenadores de ramas en guanábana y su relación con secamiento descendente. *Entomología mexicana*. 3. 330-336.
- León Ttacca, B. y Mattos C., L. 2016. Hongos Fitopatógenos asociados a semillas de palto (*Persea Americana* mill.). *Rev. Investig. Altoandin.* (18) 4. 423 – 430.
- Mora-Aguilera, G., Robles-García, P., López-Arroyo, J. I., Velázquez, M. J., Flores-Sánchez, J., Acevedo-Sánchez, G.,..., & González-Gómez, R. (2013). Situación actual y perspectivas del manejo del HLB de los cítricos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(S), 6-12.
- Peña, I.; Pérez, M.; Batista, L.; Velázquez, K. y M. Alonso. 2004. Principales enfermedades virales y afines de los cítricos. *In*: Fondo fiduciario Pérez Guerrero; Editor. Acta del Curso Taller sobre producción de material de propagación certificado de cítricos. Cuba.
- Perches E., S y Galindo A., J. 1967. Supervivencia del *Phytophthora infestans* (MONT) de Bary, causante del tizón tardío de la papa y jitomate. *Agrociencia* 1(2). 92-98.
- Picos M., P. A.; García E., R. S.; León F., J.; Sañudo B., A. y Allende M., R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33(1). 54- 74.
- Robles-González, M. M.; Velázquez-Monreal, J. J.; Manzanilla-Ramírez, M. A.; Orozco-Santos, M.; Medina-Urrutia, V. M.; López-Arroyo, J. I. y R. Flores-Virgen. 2013. Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón Mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el Estado de Colima, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 19(1) 15-31.
- Ruiz, A.; Parra, C. C.; da Graca, J. V.; Salas, B.; Malik, N. S. A.; & M. Kunta. 2014. Caracterización Molecular y de Ensayos de Patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*, Agente Causal de la Antracnosis del Limón en Texas. *Revista Mexicana De Fitopatología* (23)1. 52-61.
- Schwentesius R. R. y Gómez C., M. A. 2005. Limón Persa. Tendencias en el mercado mexicano. Ed. CIESTAAM/UACH y Banco Mundial, México, D. F. 158 pág.
- SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. (Consultado en Mayo 12 de 2017. En

http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do).

- Silva-Martínez, K. L., Raúl Allende-Molar, R., Vázquez-Luna, D., González-Cárdenas, J. C., & Murguía-González, J. (2016). Antagonismo in vitro de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium sp.* agente causal de gomosis en cítricos. *Agroproductividad*, 9(6).
- Úrbez-Torres, J. R.; Leavitt, G. M.; Guerrero, J. C.; Guevara, J., & Gubler, W. D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasioidiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92(4). 519-529.
- Vázquez L., A.; Mora A., J. A.; Cárdenas S., E. y Téliz O., D. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43. 717-728.
- Villegas-Monter, A. y A. Mora-Aguilera. 2011. Avances de la fruticultura en México. *Rev. Bras. Frutic. Jabotica-SP. (E)* 179-186.

3. FILOGENIA, DISTRIBUCIÓN Y PATOGENICIDAD DE ESPECIES DE *Lasiodiplodia* CAUSANTES DE LA MUERTE DESCENDENTE DE RAMAS DE LIMÓN PERSA EN VERACRUZ Y PUEBLA

PHYLOGENY, DISTRIBUTION AND PATHOGENICITY OF *Lasiodiplodia* SPECIES THAT CAUSE DIEBACK OF PERSIAN LIME SHOOTS IN VERACRUZ AND PUEBLA

Marco Antonio **Bautista Cruz**¹ y Gustavo **Almaguer Vargas**²

Resúmen

En la región limonera de los Municipios de Martínez de la Torre, Tlapacoyan y Papantla del Estado de Veracruz, así como en Acateno y Hueytamalco del Estado de Puebla, México, la muerte descendente del limón 'Persa' (*Citrus latifolia* Tan.) es una enfermedad de etiología desconocida que disminuye la producción y longevidad de la plantación. En agosto de 2015, se observaron lesiones necróticas en corteza y madera de ramas que mostraban escurrimientos de goma, rajaduras en corteza, anillamiento de tallo en árboles de doce huertos comerciales. Con la finalidad de identificar el agente causal de esta enfermedad, se recolectaron muestras de 10 árboles por huerto. A partir estas muestras se tomaron segmentos de tejido sintomático (5 mm), los cuales se sembraron en medio papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron por 7 días. Se obtuvieron en total 60 aislados (5 por cada huerto), de los cuales 32 aislados se identificaron utilizando análisis filogenéticos basados en parte de los genes de factor de traducción 1- α (TEF1- α) y beta tubulina (β -tub2). Se realizó un análisis de secuencias usando el método de inferencia bayesiana. Los resultados permitieron identificar siete especies de *Lasiodiplodia* (*L. pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. theobromae*, *L. citrícola*, *L. brasiliensis*, *L. jattophicola* y *L. sterculiae*). Los 32 aislados identificados se inocularon mediante colocación de discos miceliales en ramas de árboles de limón 'Persa' bajo condiciones de invernadero. Todos los aislados de *Lasiodiplodia* fueron patogénicos al inducir lesiones necróticas, rajaduras en corteza y exudación de goma. Sin embargo, las especies *L. pseudotheobromae*, *L. subglobosa* y *L. jattophicola* fueron las más virulentas.

Palabras clave: *Citrus latifolia*, *Lasiodiplodia* spp., análisis de secuencias, patogenicidad.

ABSTRACT

In the lime-producing region of the municipalities of Martínez de la Torre, Tlapacoyan and Papantla in the state of Veracruz, as well as in Acateno and Hueytamalco in the state of Puebla, Mexico, the dieback of Persian lime (*Citrus latifolia* Tan.) is a disease of unknown etiology that decreases the production and longevity of plantations. In August of 2015, the presence of necrotic lesions on the bark and wood of shoots that had exuded gum, as well as slashes and ringing of the trunk was detected on trees in twelve commercial orchards. With the aim of identifying the causative agent of this disease, ten samples were collected from every orchard. From these samples, segments of symptomatic tissue were excised (5mm lesions) and sown into sterile PDA growth media, then incubated for seven days. In total, 60 isolates were obtained (5 per orchard) of which 32 were identified using phylogenetic analysis based in part on the genes elongation factor 1- α (TEF1- α), and beta-tubulin (β -tub). Sequence analysis was carried out using the Bayesian inference method. The results allowed for the identification of seven species of *Lasiodiplodia* (*L. pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. theobromae*, *L. citrícola*, *L. brasiliensis*, *L. jattophicola* and *L. sterculiae*). The 32 identified isolates were inoculated by placing mycelial plugs on shoots of Persian lime under greenhouse conditions. All the isolates of *Lasiodiplodia* tested positive on pathogenicity assays, producing necrotic lesions, cracking on the bark and gum exudation. However, three species, *L. pseudotheobromae*, *L. subglobosa* and *L. jattophicola*, proved to be the most virulent.

Keywords: *Citrus latifolia*, *Lasiodiplodia* spp., sequence analysis, pathogenicity.

Tesista: Marco Antonio Bautista Cruz

Director: Gustavo Almaguer Vargas

3.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de limón 'Persa' (*Citrus latifolia* Tan.) es de gran importancia en el mundo, México ocupa el segundo lugar en superficie cosechada, después de la India. Sin embargo, México es el primer exportador de este producto, generando importantes divisas a los estados con mayor producción como Veracruz, Tabasco, Oaxaca y Puebla (SIAP, 2016).

Entre los factores limitantes para este cultivo, se destacan las enfermedades, como la gomosis o "muerte descendente", cuyos síntomas son caracterizados por la muerte continua de ramas, con presencia de áreas necrosadas, lesiones con escurrimiento de goma y agrietamiento vertical en ramas primarias (Cedeño y Palacios, 1992; González *et al*, 2003; Al-Sadi *et al*, 2014).

En varias regiones del mundo y en la región citrícola de Veracruz y Tabasco, las lesiones con gomosis en tallos de cítricos, se han atribuido a diversas especies de *Phytophthora* (García *et al.*, 2004, 2011; Acosta *et al.*, 2014), en casos específicos a especies de *Fusarium* (Silva *et al.*, 2016). Algunos estudios, relacionaron a hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* como agentes causales de la muerte descendente de varios cultivos tropicales incluidos los cítricos (Cedeño y Palacios, 1992; Damn *et al.*, 2007; Ferrer *et al.*, 2012; Picos *et al.*, 2014;). Sin embargo, en México no existen reportes que relacionen a hongos de *Botryosphaeriaceae* directamente a limón 'Persa'. El control de la gomosis, basado en la aplicación de fosetil-Al y metalaxil, ha sido ineficaz y la enfermedad se disemina cada vez más ocasionando importantes pérdidas. Por esta razón el presente estudio tuvo como objetivo identificar al agente causal de la gomosis en la región limonera de los estado de Veracruz y Puebla, mediante análisis de secuencias de ADNr y pruebas de patogenicidad.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Muestreo y aislamiento del patógeno

En septiembre de 2015, se recolectaron muestras de limón 'Persa' con síntomas de necrosis en ramas, canchros, agrietamiento en corteza, exudación de goma y muerte de ramillas en 12 huertos comerciales distribuidos en los municipios de Martínez de La Torre, Tlapacoyan y Papantla en el estado de Veracruz, así como en San José Acateno y Hueytamalco en el estado de Puebla, México (Cuadro 1).

En los huertos muestreados se inspeccionaron los árboles en forma visual y se calculó el porcentaje de incidencia de la muerte descendente del limón 'Persa'. Para calcular el porcentaje de incidencia se dividió el número de árboles con síntomas entre el número total de árboles muestreados multiplicado por cien (Hernández *et al.*, 2004). Las muestras obtenidas se conservaron en un termo a 5 °C para su traslado al Laboratorio de Micología Agrícola del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo.

3.2.1.1. Aislamiento del patógeno

Para la obtención de los aislados se retiró la corteza de las muestras obtenidas, se cortaron fragmentos de 5 x 5 mm a partir de la zona de avance entre el tejido necrótico y el tejido sano, se desinfectaron superficialmente con Hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por 30 s, se enjuagaron en agua destilada estéril por 30 s y se secaron con una toalla de papel absorbente estéril. Los fragmentos se sembraron en medio de cultivo V8 y papa-dextrosa-agar (PDA) con sulfato de estreptomicina y se incubaron a 25 °C por 7 días. La frecuencia de aislamiento se calculó contando las colonias de hongos desarrolladas a partir del tejido vegetal sembrado en el medio PDA por caja Petri, expresada como número de colonias totales de cada hongo entre el número de tejidos vegetales totales multiplicados por cien. Para la purificación de los aislados fúngicos, las colonias se transfirieron a medio de cultivo agua-agar y se incubaron a 25 °C por dos días. Se obtuvieron aislados monohifales, de los cuales, usando un microscopio

estereoscópico se ubicó una punta de hifa, se cortó con una aguja estéril y se transfirió a cajas Petri con medio PDA fresco.

Cuadro 1. Localidad, municipio, fecha de colecta y tejido infectado de limón ‘Persa’ de los aislados de Botryosphaeriaceae en estudio para su caracterización patogénica y análisis de secuencia EF-1 α , ITS y β -Tubulina.

<i>Código de aislado</i>	<i>Rancho</i>	<i>Localidad</i>	<i>Municipio</i>	<i>Estado</i>	<i>Tejido infectado</i>
MT4	1	Insurgente	Acateno	Puebla	Tallo y rama
MT7	2	Tierra nueva	Acateno	Puebla	Tallo y rama
MT8					
MT10					
MT12	3	Tierra nueva	Acateno	Puebla	Tallo y rama
MT13	4	Dos Ríos	Hueytamalco	Puebla	Tallo y rama
MT15					
MT16					
MT20					
MT21	5	Dos Ríos	Hueytamalco	Puebla	Tallo y rama
MT22	6	Dos Ríos	Hueytamalco	Puebla	Tallo y rama
MT23					
MT24					
MT26					
MT27					
MT 29	7	Insurgente	Papantla	Veracruz	Tallo y rama
MT30	8	Insurgente	Papantla	Veracruz	Tallo y rama
MT32					
MT33					
MT34					
MT35	9	20 de Nov.	Papantla	Veracruz	Tallo y rama
MT36					
MT38					
MT39					
MT41	10	Ixtacuaco	Tlapacoyan	Veracruz	Tallo y rama
MT42	11	B&S	Martínez	Veracruz	Tallo y rama
MT43					
MT45					
MT46					
MT47	12	Paso largo	Martínez	Veracruz	Tallo y rama
MT49					
MT50					

3.2.2. Extracción de ADNr, amplificación por PCR y secuenciación

Se extrajo micelio a partir de colonias fúngicas de siete días de crecimiento en PDA. De cada aislado se raspó micelio aéreo de la superficie con una espátula y se maceró en un mortero estéril con nitrógeno líquido. El macerado se depositó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL con 500 µL de buffer de extracción, y se sometió a 45 °C durante 30 min. Se agregaron 30 µL de CTAB al 10 % y 70 µL de cloruro de sodio 5 M y se colocó a 65 °C por 30 min. Se añadieron 50 µL de acetato de potasio 5 M y se incubó a -20 °C por 5 minutos, al término de la incubación se mezcló con 700 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y centrifugó a 13 000 x g durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL y se le agregaron 640 µL de isopropanol frío. Durante 10 min se incubó la muestra a -20 °C y después se centrifugó a 13 000 x g durante 10 min para obtener el pellet. El sobrenadante se desechó y se añadieron 500 µL de etanol al 70% para lavar el pellet a 13 000 x g durante 5 min. El etanol se desechó, se dejó secar el pellet durante 20 min y después se agregaron 40µL de agua destilada libre de ADNasa para resuspender el ADN.

Por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se amplificó la región completa del espacio transcrito interno (ITS), así como una porción de los genes de factor de elongación de traducción 1 α (EF1- α) y β -tubulina (Btub2) para cada uno de los 36 aislados. Para la PCR se utilizaron los primers ITS 5 (5' GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G 3'), ITS 4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') (White *et al.*, 1990). EF1-688F (5' CGGTCACCTTGATCTACAAGTGC 3') EF1-1251R (5' CCTCGAACTCACCAGTACCG 3') (Glass y Donaldson, 1995), Bt2a (GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC) Bt2b (ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC) (Alves *et al.*, 2008).

La mezcla de reacción se preparó a un volumen final de 50 µL, buffer de PCR 1x, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.8 µM de cada primer, 1U DNA polimerasa Promega® y 100 ng de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador BIORAD® (EE.UU.), con una desnaturalización inicial de 94 °C 2 min, 35 ciclos de 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min; y una extensión final de 72 °C por 10 min.

Para el caso de los primers EF1-728/EF1-986R y Bt2a/Bt2b la temperatura de alineamiento fue 54 y 58 °C respectivamente. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en agarosa al 1 % con buffer de corrida TBE 0.5 X con el uso de 5 µL del producto de PCR, 3 µL de marcador molecular, 3 µL de marcador de corrida, para la electroforesis se dejó correr por 90 min a 90 volts. El gel se analizó en un transiluminador GelDoc-It™ 300 UVP (Inglaterra). Los productos de PCR obtenidos se enviaron a secuenciar a la empresa MacroGen (Corea).

3.2.3. Análisis filogenético

Para este proceso se generó la región consenso de las secuencias obtenidas usando el programa Pregap4. Se comprobaron los alineamientos realizados con el programa MEGA5 y se ajustó manualmente donde fue necesario. Para realizar los análisis filogenéticos, se obtuvieron las secuencias tipo de las especies de *Lasiodiplodia* disponibles en la base de datos de GenBank. Para el análisis de Máxima Parsimonia se utilizó el programa PAUP v. 4.0b10 y para el análisis bayesiano MrBayes v.3.0b4. El análisis de máxima parsimonia se realizó utilizando la opción de búsqueda heurística con 1000 taxones al azar. Se registró la longitud de árbol (TL), índice de consistencia (CI), índice de retención (RI), y el índice de homoplasia (HI) para todos los análisis.

3.2.4. Pruebas de patogenicidad

De un vivero localizado en Insurgente Socialista, Papantla, Veracruz se obtuvieron árboles de limón ‘Persa’ de 1.5 años de edad cultivados en maceta, los cuales fueron trasladados al invernadero de Virología Agrícola, de la Universidad Autónoma Chapingo para realizar las pruebas de patogenicidad. Los inóculos consistieron en colonias fúngicas cultivadas en medio PDA por 5 días, de cada uno de los 32 aislados. La inoculación implicó realizar cortes de 5 mm de longitud en el tallo de la rama, la cual fue la unidad experimental. Posteriormente se colocó un disco micelial y se envolvió con parafilm para evitar su deshidratación. El diseño experimental fue completamente al azar con tres

repeticiones. Se mantuvo constante la humedad relativa al 80 % con un humidificador durante 72 hrs. La evaluación de la inoculación, se realizó 30 días después de la inoculación (ddi), se consideró la dimensión (largo de la lesión) al exterior de la lesión y se realizaron cortes longitudinales separando la corteza de la parte afectada para evaluar la dimensión interna. Los datos obtenidos se analizaron con el programa Minitab versión 17.2.1. Se realizó el análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Fisher en el nivel de significancia del 5 %.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Síntomas en campo y aislamiento del patógeno

Durante los muestreos realizados en la zona de estudio se observaron árboles de limón 'Persa' con síntomas característicos de muerte descendente, como marchitez de follaje y muerte de ramas en forma continua y descendente, rajadura de corteza con puntos oscuros o grisáceos, escurrimientos de goma, necrosis de tallo en ramas primarias y secundarias, anillamiento del tronco principal y muerte del árbol (Figura 1). Al retirar la corteza de algunas ramas donde se observó necrosis, se apreció exudación de goma y donde la goma estaba seca se observó una coloración gris-oscuro. Así mismo, se presentó pudrición del pedúnculo de frutos en huertos donde los productores mantuvieron la cosecha en el árbol. En los huertos muestreados se observó el 93.2 % de incidencia de la enfermedad.

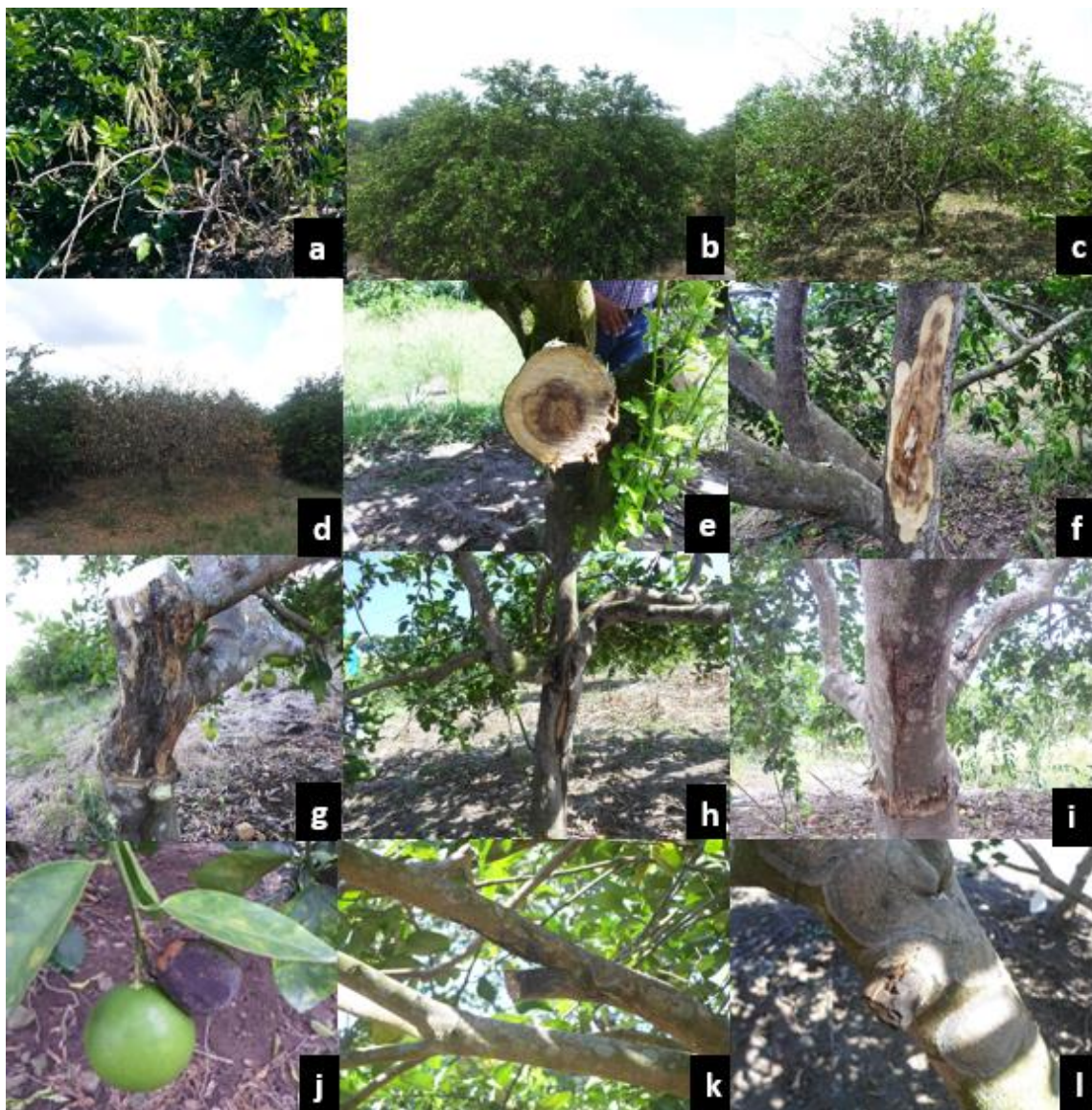


Figura 1. Síntomas de la Muerte descendente del limón 'Persa' observados en campo: muerte de ramas jóvenes (**a**), marchitez en follaje, (**b**, **c** y **d**) defoliación y muerte descendente y continua de ramas jóvenes y ramas maduras hasta el colapso del árbol, (**e** y **f**), necrosis en madera de rama, (**g**) anillamiento del tallo principal, (**h**, **i**) escurrimientos de goma y rajaduras en corteza, (**j**) pudrición del pedúnculo y fruto, (**k**, **l**) necrosis en cortes de poda.

Los 32 aislados obtenidos a partir del tejido vegetal con muerte descendente en cítricos, presentaron características similares (Figura 2) a especies de *Botryosphaeriaceae* (Sutton, 1980; Phillips, 2006).

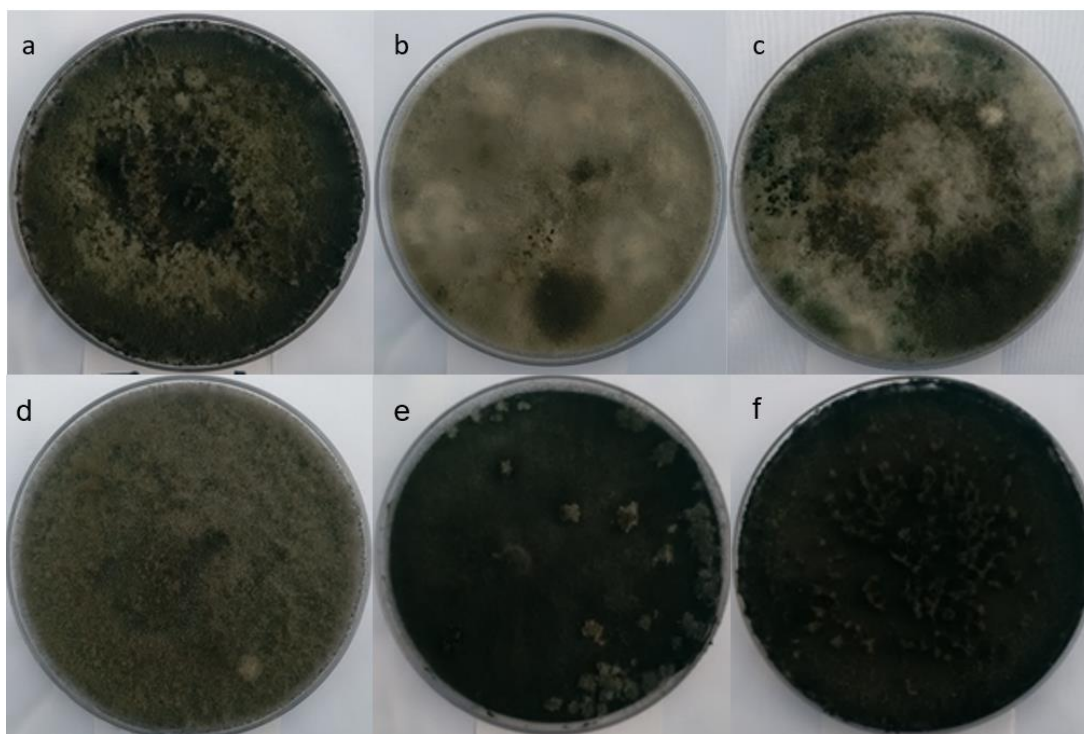


Figura 2. Colonias de *Lasiodiplodia*. **a** *L. brasiliensis*, **b** *L. pseudotheobromae*, **c** *L. citrícola*, **d** *L. jatrophiicola*, **e** *L. subglobosa*, **f** *L. theobromae*.

Abdollahzadeh *et al.*, (2010), reportaron la presencia de *L. citrícola* en corteza de cítricos de Irán, mientras que Chen *et al.*, (2013) la reportan causando muerte descendente, similares a los aquí descritos, en árboles de durazno en California. En varios estudios encontraron a especies de *Lasiodiplodia* causando gomosis y muerte descendente en cítricos (Assuah *et al.*, 1999; Adesemoye *et al.*, 2014; Al-Sadi *et al.*, 2013, 2014; Dwiastuti *et al.*, 2016).

3.3.2. Distribución de las especies de *Lasiodiplodia*

En este estudio *Lasiodiplodia pseudotheobromae* fue la especie predominantemente aislada de los huertos de limón 'Persa' (42.42 %), seguida de *L. theobromae* (28.13 %), *L. brasiliensis* (12.50%), *L. subglobosa* (6.25%), *L. citrícola* (3.13%), *L. sterculiae* (3.13%) y *L. jatrophiicola* (3.13%) (Figura 3). La distribución de las especies de *Lasiodiplodia* difirió en los huertos por municipio. *L. pseudotheobromae* se encontró en todos los municipios. En Acateno, Puebla no se presentó *L. theobromae*. Sin embargo, fue el único municipio donde se

encontró *L. citricola*. En Hueytamalco, Puebla predominó *L. brasiliensis*, y se encontró a *L. sterculiae*. Mientras que *L. jatrophiicola* solo se registró en Papantla, Veracruz.

En estudios relacionados a la muerte descendente, gomosis y cancro en ramas de cítricos de California, Adesemoye *et al.*, (2014) encontraron mayor diversidad de especies de Botryosphaeriaceae y solo el 10 % correspondió a *Lasiodiplodia* sp. En contraste, en estudios similares (Cedeño y Palacios, 1992; Assuah *et al.*, 1999; Al-Sadi *et al.*, 2013; Al-Sadi *et al.*, 2014; Dwiastuti *et al.*, 2016) en cítricos de Venezuela, Ghana, Omán e Indonesia, reportaron de forma consistente la presencia de *L. theobromae*. Correia *et al.*, (2016), al estudiar la muerte descendente de la vid en Brasil, reportaron ocho especies de *Lasiodiplodia* (*L. brasiliensis*, *L. crasispora*, *L. egyptiacae*, *L. euphorbicola*, *L. homozganensis*, *L. jatrophiicola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*), distribuidas en viñedos del valle de San Francisco, donde la especie predominante fue *L. theobromae*, seguida de *L. jatrophiicola*.

Para nuestro conocimiento, este es el primer reporte de *Lasiodiplodia* causando muerte descendente en limón 'Persa' en México.

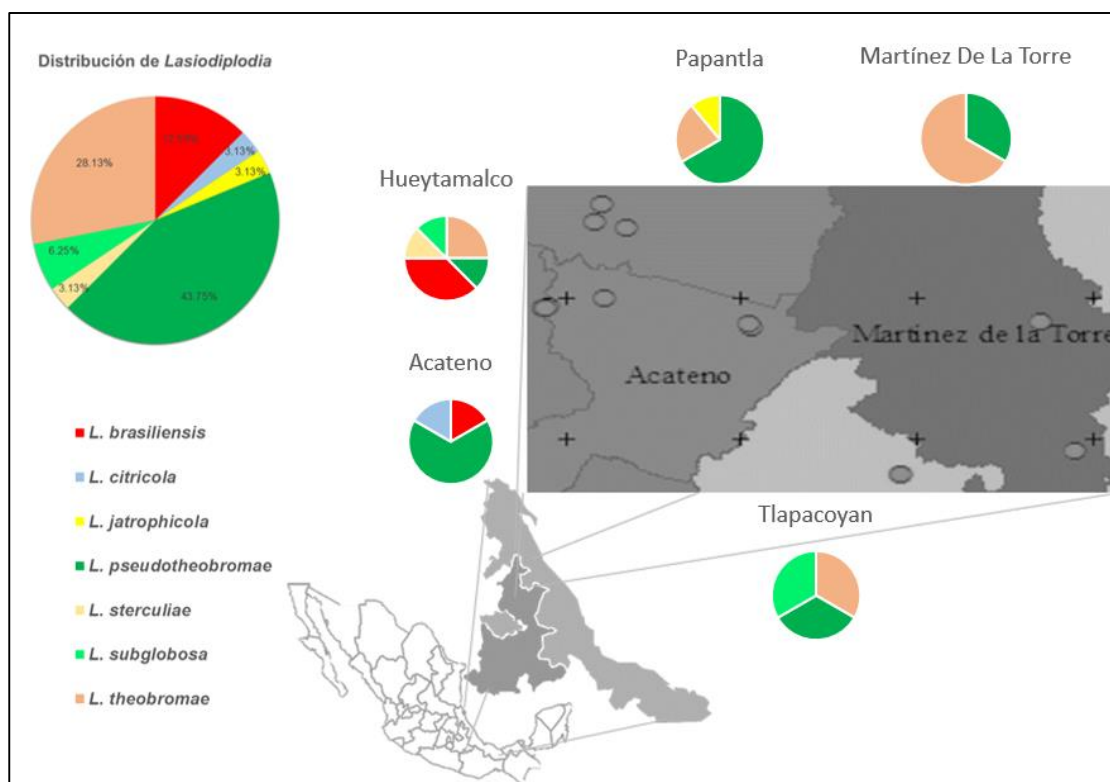


Figura 3. Distribución de especies de *Lasiodiplodia* en huertos de limón 'Persa' en Veracruz y Puebla.

3.3.3. Análisis filogenético

Para el análisis de parsimonia máxima de taxones (EF + ITS) se infirió la historia evolutiva utilizando el método de Máxima Parsimonia. Se tomó el árbol 1 de los 3 árboles más parsimoniosos (longitud = 196). El índice de consistencia fue de 0,612717, el índice de retención fue 0,880783, y el índice compuesto fue de 0,579699 para todos los sitios informativos de parsimonia. El árbol de Máxima Parsimonia se obtuvo utilizando el algoritmo Tree Bisection Regrafting (TBR) con el nivel de búsqueda 1. Los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones). El árbol seleccionado se dibujó a escala, con longitudes de rama calculadas utilizando el método de vía promedio y están en las unidades del número de cambios en toda la secuencia. El análisis involucró 99 secuencias de nucleótidos. Hubo un total de 645 posiciones en el conjunto de datos final. El conjunto de datos combinados dio como resultado 35 clados bien soportados correspondientes a especies de *Lasiodiplodia*.

previamente identificadas (Figura 4). Cuatro aislados se agruparon en el clado que contiene a *L. brasiliensis*, el segundo grupo de nueve aislados se agruparon con *L. theobromae*, catorce aislados agrupados con *L. pseudotheobromae*, dos aislados agrupados con *L. subglobosa* y un aislado correspondió en cada uno de los clados de *L. sterculiae*, *L. jatrophiicola* y *L. citrícola*.

Estos resultados permitieron identificar siete especies de *Lasiodiplodia* como agentes causales de la muerte descendente del limón 'Persa' en huertos comerciales de Veracruz y Puebla.

El análisis filogenético usando secuencias concatenadas ITS, Tef1- α β -tubulina permitieron identificar plenamente los clados de *Lasiodiplodia* a los que correspondieron cada uno de los aislados de este estudio. Esto concuerda con lo obtenido por Úrbez *et al.*, (2008), quienes ocuparon la misma combinación de genes y les permitió ubicar los clados de *Lasiodiplodia* y diferenciarlos de otras especies a identificar patógenos en vid. Así mismo, Marques *et al.* (2013) realizaron análisis moleculares utilizando secuencias ITS y TEF1- α y lograron identificar seis especies de *Lasiodiplodia*, incluidas *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae* en cultivos de mango en Brasil.

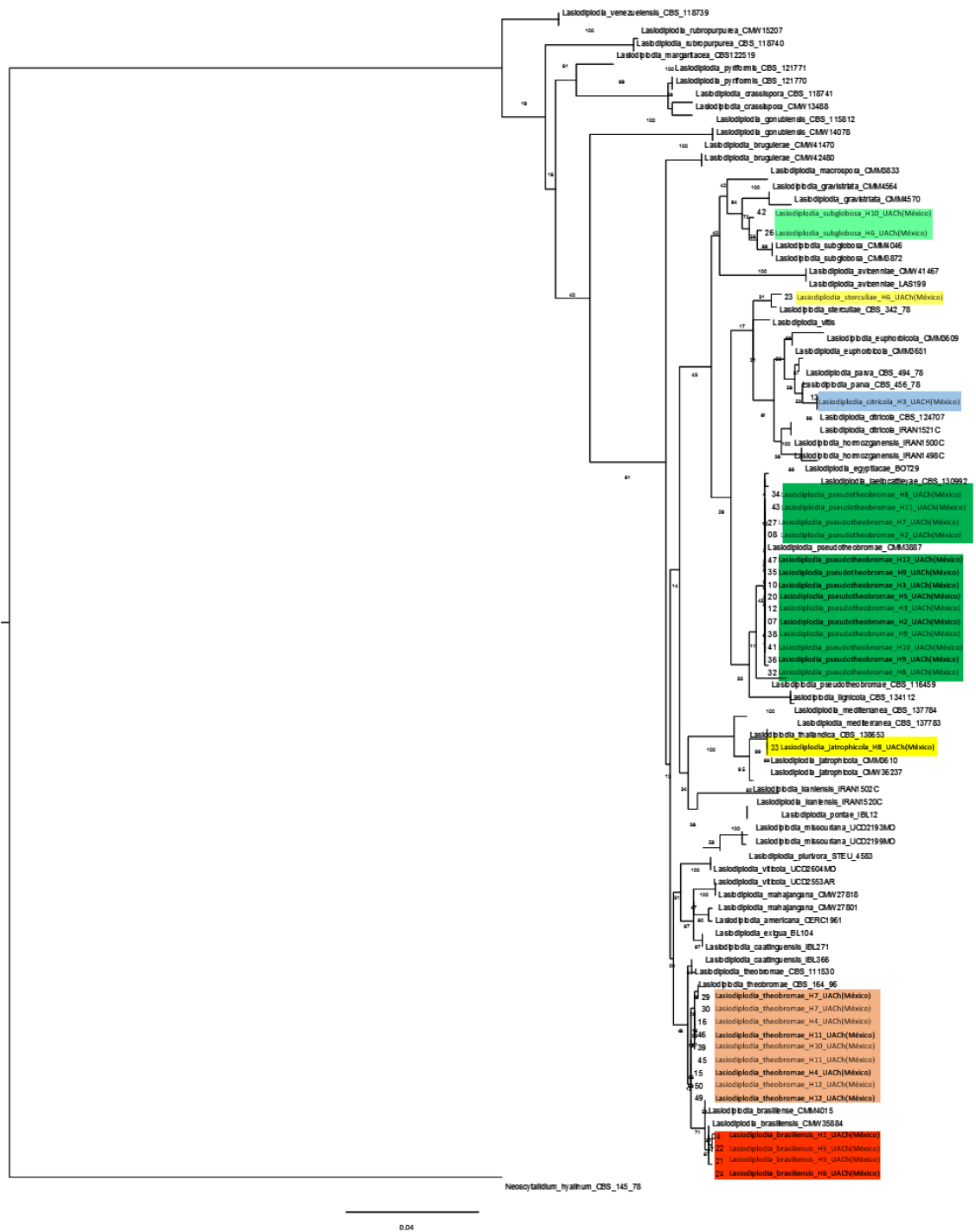


Figura 4. Árbol de máxima parsimonia obtenido de la combinación de datos de secuencias ITS, β -tub2 y TEF1- α . Los valores de soporte $\geq 50\%$ de 1000 repeticiones se muestran en los nudos.

3.3.4. Prueba de patogenicidad

A partir de la segunda semana después de realizada la inoculación, se observaron escurrimientos de goma y desarrollo de lesiones necróticas alrededor de las áreas inoculadas en los árboles de limón 'Persa'. Al retirar el Parafilm, se observó abundante escurrimiento de goma y necrosis en corteza. Se inocularon los aislados de *Lasiodiplodia*; A, B, C, D, E y F., todas las especies causaron escurrimientos de goma y necrosis en corteza y madera, pero las especies A y B además de lo anterior ocasionaron también rajaduras en la corteza (Figura 5). Los árboles testigo permanecieron asintomáticos. Cuatro semanas después de la inoculación, se midió la longitud de las lesiones en la parte exterior de la corteza y se retiró la corteza en la parte afectada para medir las lesiones internas, observando que la infección avanzó más en la madera que en la corteza. Esto demostró que los escurrimientos de goma y lesiones necróticas fueron producto de la interacción patógeno-hospedante. Todos los aislados de *Lasiodiplodia* inoculados en esta prueba produjeron lesiones significativas ($p < 0.05$) en comparación con el testigo de acuerdo con la prueba de comparación de medias de Fisher (Figura 6). Los aislados de *L. subglobosa*, *L. jatrophiicola* y *L. pseudotheobromae* fueron los más virulentos, además de ocasionar escurrimiento de goma, necrosis en corteza y madera, ocasionaron rajaduras longitudinales en la corteza de las ramas donde se inocularon. Los aislados de *L. theobromae*, *L. sterculiae*, *L. brasiliensis* y *L. citrícola* causaron escurrimientos de goma, así como necrosis en madera y corteza.

Las pruebas de patogenicidad permitieron confirmar que al menos seis especies de *Lasiodiplodia* son los agentes causales de la muerte descendente del limón 'Persa' en la región limonera de los municipios de Martínez de la Torre, Tlapacoyan, Papantla, Hueytamalco y San José Acateno.

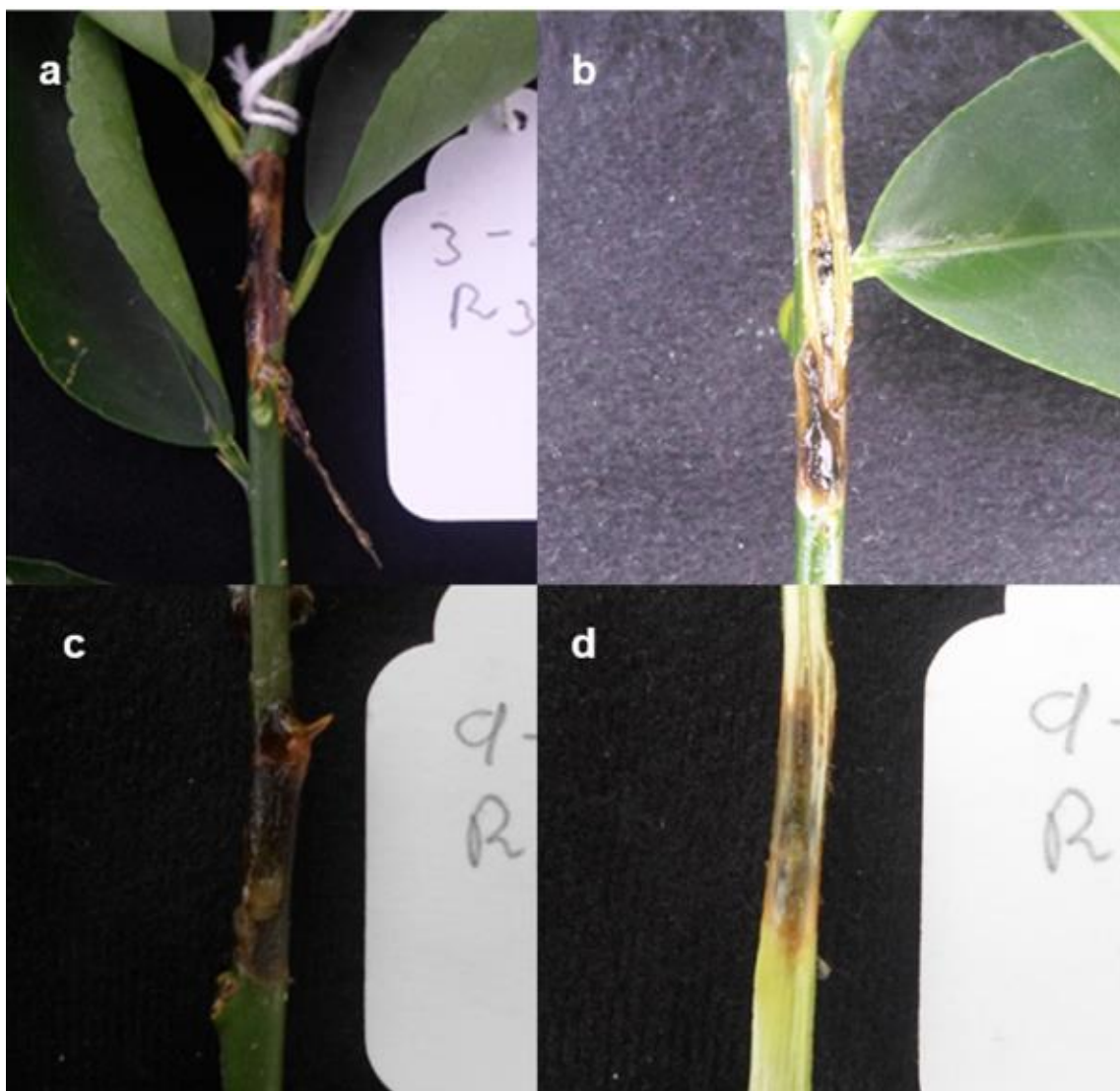


Figura 5. Síntomas producidos por *Lasiodiplodia* inoculada en limón ‘Persa’. **a.-** Lesiones y escurrimiento de goma. **b.-** Rajaduras en la corteza. **c.-** Lesión externa. **d.-** Lesión interna.

Resultados similares fueron reportados por Cedeño y Palacios (1992), quienes al inocular aislados de *L. theobromae*, observaron gomosis y lesiones en cítricos de Venezuela. Por su parte Al-Sadi *et al.*, (2013); Al-Sadi *et al.*, (2014), reportaron los mismos síntomas cuando inocularon *L. theobromae* en plantas de cítricos en Omán, Emiratos Árabes Unidos. Sakalidis *et al* (2011), encontraron resultados similares al inocular especies de *Lasiodiplodia* en tallos de mango. Recientemente Rodríguez *et al.*, (2014 y 2017), reportaron que *L. theobromae*

causó defoliación, escurrimiento de goma, necrosis en corteza y madera, así como muerte descendente en mango en Perú.

En México, Úrbez *et al.* (2008) reportaron que especies de *Lasiodiplodia* producen síntomas de muerte descendente en viñedos.

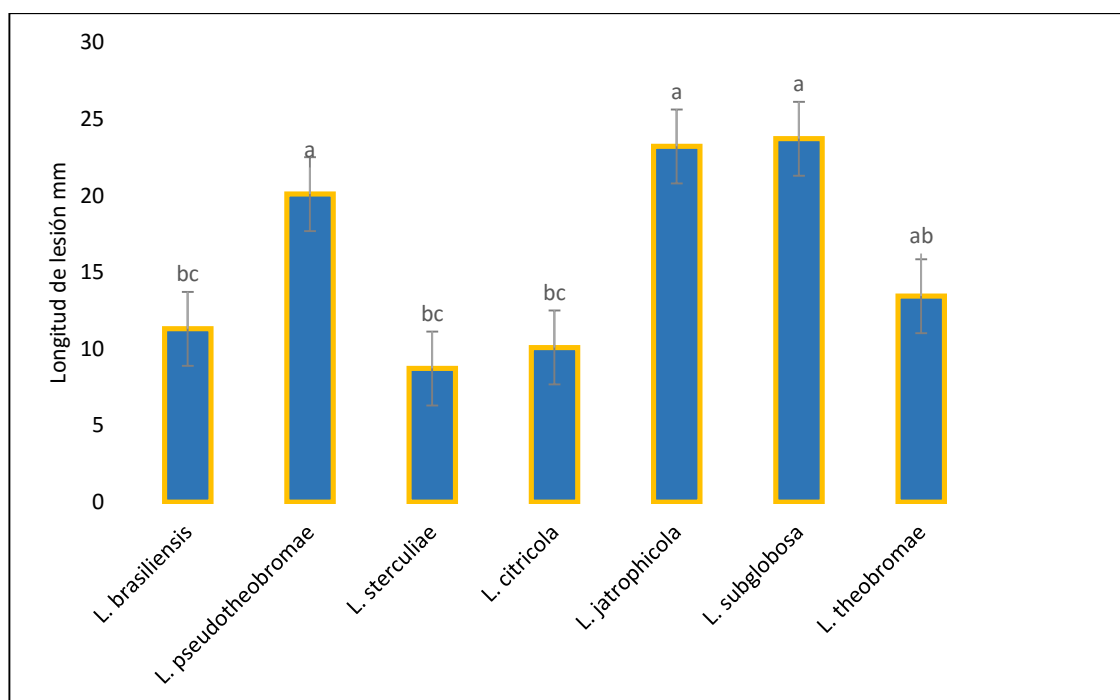


Figura 6. Longitud media de la lesión externa (mm) de la prueba de patogenicidad con aislados de *Lasiodiplodia* en árboles de limón ‘Persa’. Las letras diferentes por arriba de las barras indican diferencias significativas ($p < 0.05$) (Prueba de Fisher).

Todas las especies de *Lasiodiplodia* que se inocularon en este estudio fueron patogénicas. Sin embargo, *L. pseudotheobromae*, *L. jatrofiphicola* y *L. subglobosa* fueron las especies que mostraron mayor virulencia (Figura 6). Estos resultados coincidieron con los que Sakalidis *et al.* (2011), obtuvieron al inocular tallos y frutos de mango, donde *L. pseudotheobromae* fue la especie más virulenta. Sin embargo, difieren de lo que reportaron Ismail *et al.*, (2012) y Marques *et al* (2013), quienes describieron mayor patogenicidad de *L. theobromae* en comparación a

L. pseudotheobromae en frutos de mango. También Correia *et al* (2016), observaron mayor virulencia de *L. brasiliensis* comparada con *L. theobromae* en plantas de vid en Brasil. Por su parte, Xu *et al.*, (2015) encontraron alta virulencia de aislados de *L. theobromae* inoculados en plantas de arándanos en China. En el caso de *L. jatrophiicola*, esta especie ha sido reportada afectando *Caryota mitis* L. en China (Zhu *et al.*, 2015). Poletto *et al.*, (2016), reportaron a *L. subglobosa* causando lesiones similares a las descritas en este estudio, en árboles de nuez (*C. illinoensis*) en Brasil. *Lasiodiplodia sterculiae* fue registrado únicamente afectando a *Sterculia oblonga* en Alemania (Yang *et al.*, 2017). Es importante mencionar que no encontramos reporte alguno que relacione a *L. pseudotheobromae*, *L. jatrophiicola*, *L. sterculiae*, *L. subglobosa* y *L. brasiliensis* con enfermedades de cítricos a nivel mundial.

La alta incidencia de la enfermedad y la patogenicidad de las especies de *Lasiodiplodia* indican que son económicamente importantes para el cultivo de limón 'Persa', porque tienen el potencial de reducir el rendimiento, la longevidad del árbol y pueden causar el colapso del huerto. Por lo tanto, es necesario desarrollar estrategias de manejo que controlen estos patógenos.

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de *Lasiodiplodia* causando muerte descendente en limón 'Persa' en México.

3.4. CONCLUSIÓN

Los resultados combinados del análisis de secuencias ITS, β -tub2 y EF1- α , así como el de las pruebas de patogenicidad, confirmaron que *L. pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. theobromae*, *L. citrícola*, *L. sterculiae*, *L. brasiliensis* y *L. jattophicola*, son los agentes causales de la muerte descendente del limón 'Persa' en la región limonera de los Municipios de Martínez de la Torre, Tlapacoyan, Papantla, Hueytamalco y San José Acateno.

El 93.25 % de incidencia de la enfermedad y la patogenicidad de las especies de *Lasiodiplodia* indicaron que son económicamente importantes para el cultivo de limón 'Persa', porque tienen el potencial de reducir el rendimiento, la longevidad del árbol y pueden causar el colapso del huerto.

Las siete especies de *Lasiodiplodia* (*L. pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. theobromae*, *L. citrícola*, *L. brasiliensis*, *L. jattophicola* y *Lasiodiplodia* sp.), fueron patogénicas. Las especies *L. subglobosa*, *L. jatrofiphicola* y *L. pseudotheobromae* fueron más virulentas, además de causar gomosis, ocasionaron rajaduras longitudinales en la corteza de las ramas en las plantas inoculadas.

3.5. LITERATURA CITADA

- Acosta-Pérez, J. A., Ortiz-Gacía, C. F., Zaldívar-Cruz, J. M., Rodríguez-Cuevas, M., Bautista-Muñoz C. C. y Castillo-Aguilar C. de la Cruz. (2012). Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la región citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 28(3), 245-258.
- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R., & Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25(1), 1-10.
- Adesemoye, A. O., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Twizeyimana, M., Lynch, S. C., & Eskalen, A. (2013). Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease*, 98(1), 55-61.
- Al-Sadi, A. M.; Al-Ghaithi, A. G.; Al-Fahdi, N., & Al-Yahyai, R. (2014). Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of Citrus in Oman. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(2). 371-376.
- Al-Sadi, A. M., Al-Wehaibi, A. N., Al-Shariqi, R. M., Al-Hammadi, M. S., Al-Hosni, I. A., Al-Mahmooli, I. H., & Al-Ghaithi, A. G. (2013). Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, Citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease*, 97(10), 1363-1369.
- Anónimo. (2013). Área cosechada de limas y limones por país. FAO. Consultado en Abril 10 de 2017. [En: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/anuario-estadistico/es/#.WOpopljhC00>].
- Akgul, D. S., Savas, N. G., & Eskalen, A. (2014). First report of wood canker caused by *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata*, *Neofusicoccum parvum*, and *Lasiodiplodia theobromae* on grapevine in Turkey. *Plant Disease*, 98(4).
- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A. Phillips, A.J.L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13.
- Assuah, M. K., Oduro, K. A., & Ofuso-Budu, K. G. (1999). *Diplodia natalensis* Pole Evans, the causal agent of citrus gummosis disease in Ghana. *Ghana Journal of Agricultural Science*, 32(1), 11-18.
- Cedeño, L. Identificación de Botryodiplodia theobromae como la causa de lesiones y gomosis en cítricos.--p. 10-13 (No. HEM). En: Fitopatología Venezolana.--Vol. 5, no. 1 (1992).
- Chen, S. F., Morgan, D. P., Hasey, J. K., & Michailides, T. J. (2013). First report of *Lasiodiplodia citricola* associated with stem canker of peach in California, USA. *Journal of Plant Pathology*, 95(3).

- Correia, K. C.; Silva, M. A.; Morais, M. A.; Armengol, J.; Phillips, A. J. L.; Câmara, M. P. S. & Michereff, S. J. (2016). Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant pathology*, 65(1), 92-103.
- Damm, U., Crous, P. W., & Fourie, P. H. (2007). *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* species in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia*, 99(5), 664-680.
- Dugan, F. M., Lupien, S. L., Osuagwu, A. N., Uyoh, E. A., Okpako, E., & Kisha, T. (2016). New records of *Lasiodiplodia theobromae* in seeds of *Tetrapleura tetraptera* from Nigeria and fruit of *Cocos nucifera* from Mexico. *Journal of Phytopathology*, 164(1), 65-68.
- Dwiastuti, M. E. (2016). Biodiversity Of Citrus Stem Rot Disease (*Botryodiplodia theobromae* Pat.) In East Java. *Research Report*, (2).
- Ferrer-Gonzalez, J., Cabrera-Cabrera, R. I., Mokarzel-Falcon, L. y Herrera-Batista, N. (2012). Evaluación in vitro del efecto de fungicidas químicos sobre los Hongos fitopatógenos *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., *Fomitiporia maxonii* Murrill. y *Fusarium* sp. Link. Aislados de plantas de Cítricos. *CitriFrut* 29 (2). 8-11.
- García, A., Rodríguez, K., Puente, A., Valero, L., & Rodríguez, G. (2011). Evaluación de alternativas para disminuir fitopatógenos del suelo en áreas de replantación de cítricos. *Centro Agrícola*, 38(4), 5-7.
- García, P. A., Aranguren, M., Luzbet, R., & Ríos M. (2004). Empleo de *Trichoderma* sp. para el control de lesiones causadas por *Phytophthora* sp. en troncos y ramas en arboles de Pomelo Ruby Red. *Centro Agrícola*, 31(3-4), 102-103.
- Glass, N. L., Donaldson, G.C. 1995. Development of primer sets designed for PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1323-1330.
- González-Estrada, A., Medina, U. V. M., Robles, G. M., Martínez, P. R., & Wood, S. (2003). Impacto económico del control de la gomosis del limonero Mexicano con los portainjertos del INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias. Chapingo, México.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology*, 2(1), 43-56.
- Hernández-Castro, E., & Jiménez, R. M. V. (2004). Efecto de la Erradicación de Plantas Enfermas por el PRSV-P en un Sistema de Manejo Integrado del Papayo (*Carica papaya* L.) en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 382-388.
- Ismail, A. M., Cirvilleri, G., Polizzi, G., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Lombard, L. (2012). *Lasiodiplodia* species associated with dieback disease

- of mango (*Mangifera indica*) in Egypt. *Australasian Plant Pathology*, 41(6), 649-660.
- Khanzada, M. A.; Lodhi, A. M., & Shahzad, S. (2005). Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. *Pakistan Journal of Botany*, 37(4), 1023.
- Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Marques, M. W., Lima, N. B., de Morais, M. A., Barbosa, M. A. G., Souza, B. O., Michereff, S. J., Michereff, S. J., Philips, A. J. L. & Câmara, M. P. (2013). Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*, 61(1), 181-193.
- McDonald, V., & Eskalen, A. (2011). *Botryosphaeriaceae* species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Disease*, 95(11), 1465-1473.
- Paolinelli-Alfonso, M., Villalobos-Escobedo, J. M., Rolshausen, P., Herrera-Estrella, A., Galindo-Sánchez, C., López-Hernández, J. F., & Hernández-Martínez, R. (2016). Global transcriptional analysis suggests *Lasiodiplodia theobromae* pathogenicity factors involved in modulation of grapevine defensive response. *BMC genomics*, 17(1), 615.
- Picos M., P. A.; García E., R. S.; León F., J.; Sañudo B., A. y Allende M., R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33(1). 54- 74.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Correia, A., & Luque, J. (2006). The *Botryosphaeria* site. [http://www.crem.fct.unl.pt/botryosphaeria_site]. Consultado en Mayo 04 de 2017.
- Poletto, T., Maciel, C. G., Muniz, M., Blume, E., Poletto, I., & Brioso, P. (2016). First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. *Plant Disease*, 100(5), 1016-1017.
- Rodríguez-Gálvez, E., Maldonado, E., & Alves, A. (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European journal of plant pathology*, 141(3), 477-489.
- Rodríguez-Gálvez, E., Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P. W., & Alves, A. (2017). Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology*, 121(4), 452-465.
- Sakalidis, M. L.; Ray, J. D.; Lanoiselet, V.; Hardy, G. E. S. & Burgess, T. I. (2011). Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 130(3), 379-391.
- SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). México. (Consultado en Mayo 12 de 2017. En

http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/ResumenProducto.do).

- Silva-Martínez, K. L., Raúl Allende-Molar, R., Vázquez-Luna, D., González-Cárdenas, J. C., & Murguía-González, J. (2016). Antagonismo in vitro de *Trichoderma asperellum* contra *Fusarium* sp. agente causal de gomosis en cítricos. *Agroproductividad*, 9(6).
- Sutton, B. C. (1980). The Coelomycetes. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute.
- Úrbez-Torres, J. R.; Leavitt, G. M.; Guerrero, J. C.; Guevara, J., & Gubler, W. D. (2008). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. *Plant Disease*, 92(4). 519-529.
- Van der Linde, J. A., Six, D. L., Wingfield, M. J., & Roux, J. (2011). *Lasiodiplodia* species associated with dying Euphorbia ingens in South Africa. *Southern Forests: a Journal of Forest Science*, 73(3-4), 165-173.
- Xu, C., Zhang, H., Zhou, Z., Hu, T., Wang, S., Wang, Y., & Cao, K. (2015). Identification and distribution of *Botryosphaeriaceae* species associated with blueberry stem blight in China. *European journal of plant pathology*, 143(4), 737-752.
- Yang, T., Groenewald, J. Z., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L., & Crous, P. W. (2017). Families, genera, and species of *Botryosphaeriales*. *Fungal Biology*, 121(4), 322-346.
- White, T.J., Bruns T., Lee S. and Taylor J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds). Academic Press, New York, USA: 315–322.
- Wright, A. F. & Harmon, P. F. (2010). Identification of species in the *Botryosphaeriaceae* family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida. *Plant Disease*, 94(8), 966-971.
- Zhao, W.; Gottwald, T.; Bai, J.; McCollum, G.; Irey, M.; Plotto, A. & Baldwin, E. (2016). Correlation of *Diplodia* (*Lasiodiplodia theobromae*) infection, huanglongbing, ethylene production, fruit removal force and pre-harvest fruit drop. *Scientia Horticulturae* 212. 162–170.
- Zhu, H., Qin, W. Q., Liu, L., & Yan, W. (2015). First report of leaf spot of clustering fishtail palm (*Caryota mitis*) caused by *Lasiodiplodia jatrophiicola* in China. *Plant Disease*, 99(7).

4. EFECTIVIDAD DE FUNGICIDAS EN EL CONTROL DE *Lasiodiplodia* spp., EN LIMÓN 'PERSA' EN VERACRUZ

EFFECTIVENESS OF FUNGICIDES IN THE CONTROL OF *Lasiodiplodia* spp., ON PERSIAN LIME IN VERACRUZ

Marco Antonio Bautista Cruz¹ y Gustavo Almaguer Vargas²

Resumen

Los hongos del género *Lasiodiplodia* causan la muerte descendente del limón 'Persa' en los estados de Veracruz y Puebla. Debido a que es un cultivo de mediana densidad, la intensidad en las podas incrementa la susceptibilidad a esta enfermedad, lo que disminuye la productividad hasta un 60 % y la pérdida anual de árboles puede llegar a 35 %. Por esta razón, se evaluó en campo la efectividad del control químico y biológico, después de la poda, para disminuir la enfermedad causada por *Lasiodiplodia* spp. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar, dos ramas podadas de cada punto cardinal del árbol constituyeron la unidad de muestreo dentro de la unidad experimental. La unidad experimental se constituyó de dos árboles con tres repeticiones. Se aplicaron cinco tratamientos: tiofanato de metilo (1 g L⁻¹), tiabendazole (2.5 g L⁻¹), clorotalonil (3 g L⁻¹) y mancozeb (4 g L⁻¹), *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma viridae* (20 mL L⁻¹) y un testigo sin aplicación. Se realizaron dos aspersiones dirigidas a tronco, ramas y follaje hasta punto de goteo. Se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad cada 7 días después de la primera aplicación. Tiofanato de metilo tuvo mayor efectividad en el control de la enfermedad, seguido de tiabendazol y *Trichoderma*. Los resultados obtenidos serán útiles para diseñar estrategias de manejo de la muerte descendente del limón 'Persa' en huertos de cítricos en México.

Palabras clave: muerte descendente, control químico y biológico, poda.

ABSTRACT

Fungi in the genus *Lasiodiplodia* cause dieback of Persian lime in the states of Veracruz and Puebla. Due to its nature as a medium density crop, the intensity of pruning increases the susceptibility to this disease, which can decrease production up to 60 % and cause an annual tree loss of up to 35 %. For this reason, a field trial was conducted where the effectiveness of biological and chemical fungicides, after pruning, in reducing the disease caused by *Lasiodiplodia* spp. was evaluated. A complete randomized blocks design was set in place; two shoots pruned from the cardinal points of every tree constituted the sampling unit within the experimental units, which in turn were made up of two trees, each one with three replications. Five treatments were applied: thiophanate-methyl (1 g L⁻¹), tiabendazole (2.5 g L⁻¹), chlorothalonil (3 g L⁻¹), mancozeb (4 g L⁻¹), *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma viridae* (20 mL L⁻¹) and a control. Two sprayings were carried out, each one directed at the trunk, branches and foliage until fully drenched. Incidence and severity of the disease were both evaluated seven days after the first spraying. Thiophanate-methyl proved the most effective in disease control, followed by Tiabendazole and *Trichoderma*. The results of this study may prove useful for the design of Persian lime dieback management strategies in citric orchards in Mexico.

Keywords: Dieback, chemical and biological control, pruning

Tesista: Marco Antonio Bautista Cruz

Director: Gustavo Almaguer Vargas

4.1. INTRODUCCIÓN

Los hongos del género *Lasiodiplodia* son fitopatógenos inespecíficos, pueden sobrevivir como endófitos y como saprófitos bajo condiciones de estrés abiótico. Se desarrollan en regiones subtropicales y tropicales donde afectan a más de 1100 hospederos leñosos, donde causan enfermedades como la muerte descendente, gomosis y pudrición del pedúnculo (McDonald *et al.*, 2011; Al-Sadi *et al.*, 2013; Mbaye *et al.*, 2016; Coutinho *et al.*, 2017).

En huertos de limón ‘Persa’ de la región Martínez de la Torre, Tlapacoyan y Papantla del Estado de Veracruz y de Acateno y Hueytamalco del Estado de Puebla, *Lasiodiplodia* causa muerte descendente (gomosis), caracterizada por necrosis de corteza y madera, chancros en tallos. En condiciones prolongadas de estrés abiótico causa muerte de ramas secundarias y cancro en el tallo principal provocando el colapso del árbol. Disminuye la productividad hasta un 60 % y la pérdida anual de árboles puede llegar hasta un 35 %. En algunas investigaciones se menciona a *Phytophthora spp.* como el agente causal de la gomosis de los cítricos, y como medidas de control, recomiendan la aplicación de fungicidas como fosetil-Al y metalaxil (Farih *et al.*, 1981; Jadeja *et al.*, 2000; Raina, 2012; Acosta *et al.*, 2014),. Sin embargo, los resultados de aplicar estos fungicidas para controlar la gomosis del limón ‘Persa’ en la región de estudio, no han sido satisfactorios. Algunos estudios (Khanzada *et al.*, 2005; Shahbaz *et al.*, 2009; Naqvi *et al.*, 2015) reportaron la efectividad de fungicidas como Tiofanato de metilo en el control de la muerte regresiva de huertos de mango provocada por *Lasiodiplodia*. Otros estudios, reportaron la efectividad de *Trichodermas* en el control de enfermedades fungosas en cítricos (García *et al.*, 2011; El-Mohamedy *et al.*, 2012).

Sakadilis *et al.* (2011), reportaron que el principal punto de acceso de este hongo a los árboles de mango, es a través de las heridas de poda, daños causados por insectos, ramas quebradas por el viento o por exceso de carga de fruta. En el cultivo de limón ‘Persa’ se realizan podas intensas como parte del manejo del cultivo, esto favorece la incidencia de gomosis, por lo que es necesario proteger

a los árboles inmediatamente después de realizar la poda. Por esta razón, el objetivo de esta investigación fue evaluar en campo la efectividad de productos químicos y biológicos, después de realizar la poda, para el control del agente causal de la muerte descendente en el limón 'Persa'.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Localización del sitio experimental

El estudio se realizó de junio a septiembre de 2016, en un huerto comercial de limón 'Persa' (*Citrus latifolia* Tan), ubicado en el ejido Insurgente Socialista, del Municipio de Papantla, Estado de Veracruz, México, a una altitud de 77 msnm. Esta microrregión cuenta con un clima Aw₂, una precipitación media anual de 1518 mm y una temperatura media de 24.1 °C.

El huerto de limón 'Persa' tiene como portainjerto a *Citrus volkameriana*, se plantó en 2008, a una distancia de 5 x 5 m con una densidad de 400 árboles ha⁻¹. Este huerto tiene historial de muerte descendente y en los árboles se observaron severos síntomas de la enfermedad.

4.2.2. Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar y se emplearon seis tratamientos. La unidad experimental consistió en dos árboles, de cada tratamiento se tuvieron tres repeticiones. De cada punto cardinal del árbol se podaron dos ramas con un diámetro promedio de 3.5 cm, dejando tocones de una longitud aproximada de 20 cm (unidad de muestreo). Inmediatamente después de podar se etiquetó cada tocón y se asperjó totalmente al árbol (tronco, ramas y follaje) hasta punto de goteo, con el fungicida que correspondió. Se realizaron dos aplicaciones del producto fungicida con un intervalo de 20 días entre aplicaciones. Las aspersiones se realizaron con una aspersora motorizada SR 420 de la marca Sthil ®.

Los tratamientos a evaluar fueron: tiofanato de metilo (1 g L⁻¹ de producto comercial) y tiabendazole (2.5 g L⁻¹ de producto comercial) como fungicidas de

tipo sistémico, clorotalonil (3 g L⁻¹ de producto comercial) y mancozeb (4 g L⁻¹ de producto comercial) como fungicidas de contacto (Cuadro 2), y un fungicida biológico a base de *Trichoderma harzianum* + *Trichoderma viridae* a una concentración de 8 x 10⁸ conidios por ml (20 ml.L⁻¹ de producto comercial) además de un testigo sin aplicación. Dentro del modo de acción de *Trichodermas* se menciona la competencia por el sustrato, micoparasitismo, antibiosis, desactivación de enzimas del patógeno y resistencia inducida (Harman et al., 2004; Schuster & Schmoll, 2010).

Cuadro 2. Relación de los fungicidas químicos utilizados en el control de la muerte descendente del limón ‘Persa’.

Grupo químico	Ingrediente activo	Modo de acción	I.A. (%)	Formulación
Tiofanato (MBC)	Tiofanato de metilo	Sistémico	70 %	Gránulos dispersables en agua
Benzimidazoles	Tiabendazole	Sistémico	60 %	Gránulos dispersables en agua
Cloronitrilos	Clorotalonil	Contacto	75 %	Gránulos dispersables en agua
Ditiocarbamatos	Mancozeb	Contacto	80 %	Gránulos dispersables en agua

Las evaluaciones se realizaron cada siete días, a partir del día en que se realizó la primera aspersión, se midió la longitud de las lesiones en las ramas podadas (tocones), para caracterizar la severidad de la enfermedad. Con ayuda del paquete estadístico SAS versión 9.2 (SAS, 2008), se analizaron los modelos epidemiológicos (Exponencial, monomolecular, logístico y Gompertz), con la finalidad de tener una mayor descripción del desarrollo de la enfermedad a través del tiempo y se seleccionó el modelo con mejor ajuste de acuerdo al coeficiente de determinación (R²) más alto.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se observó que el avance de los síntomas de muerte descendente se contuvo gradualmente por el efecto de las aspersiones de fungicidas, sin embargo en los arboles no tratados este avance de la enfermedad continuó. De acuerdo a los datos obtenidos de la severidad en cada uno de los tratamientos, se encontró que el modelo que mejor describió el desarrollo de la enfermedad fue el modelo logístico ($y = 1 / (1 + ((1-y_0)/y_0) * \exp(-rL * t))$) (Cuadro 3).

A pesar de que la intensidad inicial de la enfermedad en todos los tratamientos fue variable, e incluso en el testigo fue menor, el efecto de los tratamientos se observó en la reducción de la tasa de incremento de la enfermedad rL . De acuerdo al cálculo del ABCPE, se encontró que el mejor tratamiento fue el tiofanato de metilo debido a que tiene menor área bajo la curva, lo cual también se reflejó en la reducción de la tasa de incremento rL , resultando de 0.04536 % de incremento de enfermedad por día, mientras que en el caso del testigo su tasa de incremento por día fue de 0.223954 %. Así mismo, los tratamientos de tiabendazol y *Trichoderma* fueron efectivos para el control de la muerte descendente, los cuales podrían considerarse como una alternativa en el control de la enfermedad.

Cuadro 3. . Parámetros obtenidos para la caracterización de la epidemia en cada uno de los tratamientos evaluados en limón 'Persa'.

Tratamiento	Y_0	rL	ABCPE
Tiofanato de metilo	0.03008	0.04536	514.90461
Tiabendazol	0.030541	0.049764	4380.19606
Trichoderma spp.	0.022177	0.078434	15374.4392
Mancozeb	0.00871	0.114338	59421.3886
Clorotalonil	0.00137	0.164006	37380.0589
Testigo	0.000757	0.223954	336936.28

Y_0 , intensidad inicial de la epidemia; rL , tasa de incremento de la epidemia; ABCPE, área bajo la curva del progreso de la enfermedad.

En estudios realizados por Arif *et al.*, (2014) y Masood *et al.*, (2014) en Pakistán para controlar la muerte descendente en el cultivo de mango, reportaron alta

efectividad utilizando el fungicida tiofanato de metilo en el control de esta enfermedad, de forma similar a los resultados aquí obtenidos. Sin embargo, difieren del modo de aplicación y número de aplicaciones, porque en los estudios sobre mango, el fungicida se inyectó tres veces al xilema y en este estudio se realizaron dos aspersiones. Por otra parte, Khanzada *et al.*, (2005) al tratar la misma enfermedad en mango encontraron que tiofanato de metilo tuvo menor efectividad comparado con carbendazim. Respecto a la efectividad de tiabendazol mostrada en este estudio coincide con lo reportado por Yan *et al.*, (2016) quienes estudiaron enfermedades fungosas de postcosecha en frutos de naranja valencia tardía ocasionados principalmente por *Guignardia citricarpa* y encontraron alta efectividad en los tratamientos a base de tiabendazol. Por otra parte, Vázquez *et al.*, (2010), lograron disminuir hasta un 62 % la incidencia de la muerte descendente en la fase de injertación en viveros de zapote mamey, al tratar varetas en inmersión con tiabendazol, mancozeb y clorotalonil. Sin embargo, reportaron que tiabendazol mostró mayor efectividad en el control de la enfermedad.

En estudios *in vitro* realizados por Shahbaz *et al.*, (2009) y Navqui *et al.*, (2015), han reportado alta efectividad de tiofanato de metilo en el control de *Lasiodiplodia*. De igual forma Syed *et al.*, (2014) indicaron alta efectividad de tiabendazol en el control *in vitro* de *Lasiodiplodia*, y regular efectividad en frutos de mango inoculados. Así mismo, Sultana y Ghaffar, (2010), reportaron alta efectividad de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* sobre *Lasiodiplodia*.

Por otro lado, respecto a la efectividad de *Trichoderma* algunos estudios en Egipto (El-Mohamedy *et al.*, 2012; El-Mohamedy *et al.*, 2013) reportaron igual efectividad de *Trichoderma harzianum* que la obtenida con el tiofanato de metilo, en el control de la pudrición de raíz del limón 'Persa' y tangerina (*Citrus reticulata*) causada por *Fusarium*. Al contrastar la diferencia en la efectividad de *Trichoderma* reportada por estos autores contra la obtenida en el presente estudio, puede atribuirse a la forma de aplicación, dado que ellos aplicaron composta inoculada con *T. harzianum* y aseguraron condiciones óptimas de

temperatura, pH, luz y nivel de oxígeno para su desarrollo y multiplicación (Harman *et al.*, 2004; Infante *et al.*, 2009; Schuster *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013) mientras que en el presente estudio solo se aplicó en forma de aspersión, sin controlar condiciones climáticas. De igual forma García *et al.*, (2011) reportaron que *T. harzianum* redujo la cantidad de propagulos de *Phytophthora* por encima de los fungicidas propamocarb + fosetil-Al y fosetil-Al, aplicado al suelo en plantación de cítricos de Cuba. Velázquez *et al.*, (2016) al evaluar la efectividad de *Trichodermas* para el control de *Rosellinia* sp. en Macadamia, reportaron que donde aplicaron *Trichoderma* solo tuvieron el 26% de incidencia de la enfermedad, mientras que el tratamiento con carbendazim tuvo solo el 7%, comparado con el testigo que tuvo el 53%. En estudios realizados *in vitro*, Bhadra *et al.*, (2014) reportaron alta efectividad de *Trichoderma viridae* en el control de *Lasiodiplodia theobromae*. La combinación de tratamientos a base de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae*, tiofanato de metilo y tiabendazol, como lo reportaron Sawant *et al.*, (1995), podría resultar favorable en el control de la muerte descendente del limón 'Persa'.

En nuestros resultados se observó que, hasta los 28 días después de la primera aspersión clorotalonil fue el que contuvo la enfermedad con mayor efectividad. Sin embargo, después de esta fecha perdió su efectividad (Figura 7). El fungicida mancozeb fue el menos efectivo en el control de esta enfermedad. En los tocones tratados con los fungicidas tiofanato de metilo, tiabendazol y *Trichoderma spp.*, se observaron rebrotes sanos y fuertes, en los demás tratamientos no hubo tal respuesta. En los árboles tratados con tiofanato de metilo se observó mayor cicatrización de esas lesiones seguido de tiabendazol, *Trichoderma spp.*, clorotalonil y mancozeb, en comparación con los árboles no tratados. Sin embargo, después de 45 días después de la primera aplicación (ddpa), algunas de las lesiones que ya estaban cicatrizando, comenzaron a presentar poco escurrimiento de goma. En los árboles no tratados, la enfermedad se incrementó con el transcurso del tiempo, hasta que algunos de los tocones colapsaron.

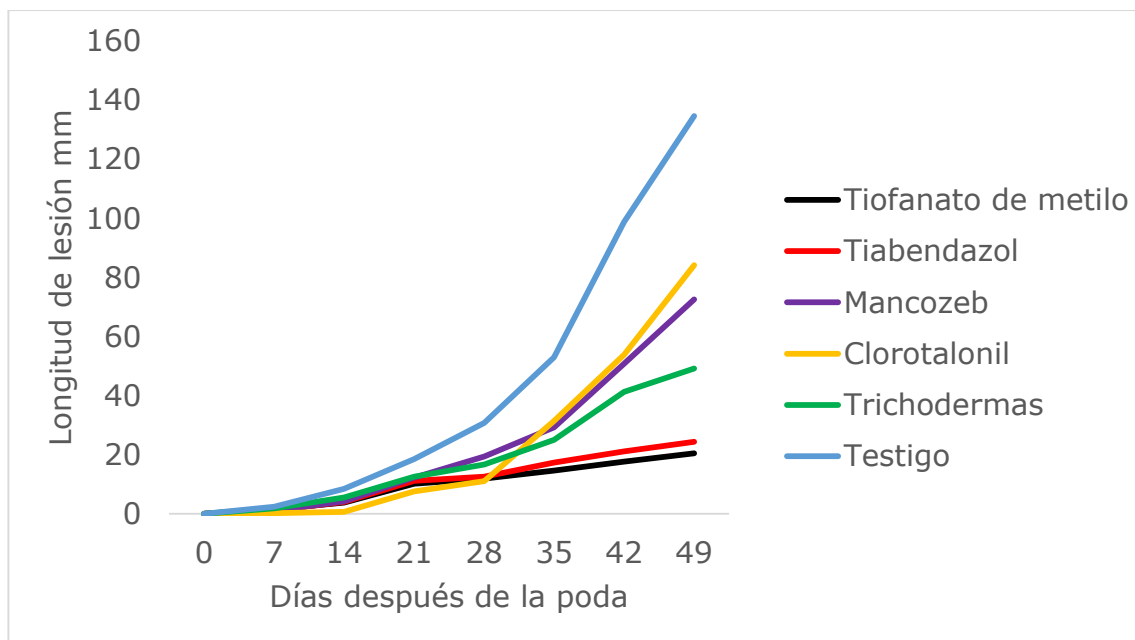


Figura 7. Progreso de la muerte descendente del limón 'Persa', en función de los diferentes tratamientos fungicidas aplicados.

En los estudios realizados en mango donde aplicaron tiofanato de metilo directo al xilema, 3 meses después de iniciado el tratamiento, redujo la defoliación en los árboles. Sin embargo, no consiguieron eliminar las lesiones con presencia de gomosis (Arif *et al.*, 2014; Masood *et al.*, 2014). Entre tanto, Khanzada *et al.*, (2005) al aplicar carbendazim, tiofanato de metilo y fosetil aluminio para el control de la muerte descendente del mango en Pakistán, encontraron efectividad aceptable de tiofanato de metilo en el control de esta enfermedad (solo superado por carbendazim), y además de eso, coincidentemente con este estudio, logró reducir la infección por hongos, suprimió la exudación de la goma, la muerte y el marchitamiento de ramas de mango, además de que se notó un aumento significativo en el crecimiento vegetativo de las plantas.

El cultivo de limón 'Persa' es de alta intensidad, de igual forma, la poda es una práctica intensiva por lo que se incrementa la susceptibilidad de los árboles a las infecciones fúngicas. Similar situación se observó en cultivos de aguacate de California y en cultivos de mango en Australia (McDonald *et al.*, 2011; Sakalidis *et al.*, 2011). Algunas prácticas como guardar cosecha en el árbol incrementan

la incidencia de *Lasiodiplodia* causando pudrición del pedúnculo. Los frutos momificados y los restos de poda que el productor deposita en el suelo sirven como fuente de inóculo.

Varios estudios señalaron a *Phytophthora* spp. como el agente causal de la gomosis de los cítricos, para su control han aplicado tratamientos a base de metalaxil y fosetil-Al (Farih *et al.*, 1981; Jadeja *et al.*, 2000 y Raina *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014). En la zona de estudio Martínez de la Torre, Tlapacoyan, Papantla, Acateno y Hueytamalco, se ha aplicado fosetil-Al y metalaxil para el control de la gomosis y no se han obtenido resultados favorables, la incidencia de gomosis en los huertos supera el 92.5 % y las pérdidas económicas se incrementan considerablemente. En la presente investigación, los tratamientos tiofanato de metilo, tiabendazole y *Trichoderma* spp, ofrecieron alternativas para el manejo de esta enfermedad, utilizándolo de forma convencional o de tipo orgánico.

4.4. CONCLUSIONES

Los fungicidas que tuvieron mejor efectividad en el control de la muerte descendente del limón 'Persa' en condiciones de campo, fueron tiofanato de metilo, tiabendazol y *Trichoderma* spp.

Dos aplicaciones de fungicida después de la poda fueron efectivas, pero no suficientes para el control de la muerte descendente del limón 'Persa'.

4.5. LITERATURA CITADA

- Acosta-Pérez, J. A., Ortiz-Gacía, C. F., Zaldívar-Cruz, J. M., Rodríguez-Cuevas, M., Bautista-Muñoz C. C. y Castillo-Aguilar C. de la Cruz. (2012). Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la región citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*, 28(3), 245-258.
- Arif, A. M., Hussain, N., Ahmad, I., Malik, M. T., & Bally, I. S. E. (2014, August). Management of mango decline using thiophanate methyl and plant activators through a macro infusion system. In XXIX International Horticultural Congress on Horticulture: Sustaining Lives, Livelihoods and Landscapes (IHC2014): 1105 (pp. 35-38).
- Adesemoye, A. O., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Twizeyimana, M., Lynch, S. C., & Eskalen, A. (2013). Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease*, 98(1), 55-61.
- Al-Sadi, A. M.; Al-Ghaithi, A. G.; Al-Fahdi, N., & Al-Yahyai, R. (2014). Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of Citrus in Oman. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(2). 371-376.
- Al-Sadi, A. M., Al-Wehaibi, A. N., Al-Shariqi, R. M., Al-Hammadi, M. S., Al-Hosni, I. A., Al-Mahmooli, I. H., & Al-Ghaithi, A. G. (2013). Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, Citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease*, 97(10), 1363-1369.
- Bhadra, M., Khair, A., Hossain, M. A., & Sikder, M. M. (2015). Efficacy of *Trichoderma* spp. and fungicides against *Lasiodiplodia theobromae*. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research*, 49(2), 125-130.
- Coutinho, I. B. L., Freire, F. C. O., Lima, C. S., Lima, J. S., Gonçalves, F. J. T., Machado, A. R.,...& Cardoso, J. E. (2017). Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathology*, 66(1), 90-104.
- El-Mohamedy, R. S. R., Morsey, A. A., Diab, M. M., Abd-El-Kareem, F., & Faraag, E. S. (2012). Management of dry root disease of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) through biocomposted agricultural wastes. *Journal of Agricultural Technology*, 8(3), 969-981.
- El-Mohamedy, R. S. R., Morsey, A. A., & Bakeer, A. R. T. (2013). Utilization of bio composted agricultural wastes in management of *Fusarium* dry root rot disease on lime (*Citrus aurantifolia* L.). *Journal of Agricultural Technology*, 9(5), 1227-1239.
- Farih, A., Menge, J. A., Tsao, P. H., & Ohr, H. D. (1981). Metalaxyl and efosite aluminium for control of *Phytophthora* gummosis and root rot on citrus. *Plant Diseases*, 65(8), 654-657.

- García, A., Rodríguez, K., Puente, A., Valero, L., & Rodríguez, G. (2011). Evaluación de alternativas para disminuir fitopatógenos del suelo en áreas de replantación de cítricos. *Centro Agrícola*, 38 (4), 5-7.
- García, P. A., Aranguren, M., Luzbet, R., & Ríos M. (2004). Empleo de *Trichoderma sp.* para el control de lesiones causadas por *Phytophthora sp.* en troncos y ramas en arboles de Pomelo Ruby Red. *Centro Agrícola*, 31(3-4), 102-103.
- Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de protección vegetal*, 24(1), 14-21.
- Jadeja, K. B., Mayani, N. G., Patel, V. A., & Ghodasara, M. T. (2000). Chemical control of canker and gummosis of citrus in Gujarat. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 30(1), 87-88.
- Khanzada, M. A.; Lodhi, A. M., & Shahzad, S. (2005). Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. *Pakistan Journal of Botany*, 37(4), 1023.
- Lashin, S. M., Arab, Y. A., & El-Deeb, H. M. (2016). Fig die-back disease in Egypt. *Pakistan Journal of Agriculture, Agricultural Engineering and Veterinary Sciences (Pakistan)*. 29 (2). 184-194.
- Mbaye, N., Manga, G. F. A., Diedhiou, P. M., & Samb, P. I. (2016). Tree Gummosis a Thread for Mango Production in Northern Senegal. *International Journal of Scientific Research in Science and Technology* (2)4. 17-22.
- McDonald, V., & Eskalen, A. (2011). *Botryosphaeriaceae* species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Disease*, 95(11), 1465-1473.
- Masood, A., Salman, M., & Saeed, S. (2014). Fungicide injection, an efficient management technique of mango sudden death disease in Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 26(2), 259-263.
- Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*, 28(1), 1-11.
- Naqvi, S. A. H., Latif, M. R., Khan, S. A., Malik, M. T., & Freed, S. (2015). Emerging resistance against different fungicides in *Lasiodiplodia theobromae*, the cause of mango dieback in Pakistan. *Archives of Biological Sciences*, 67(1), 241-249.
- Raina, R. (2012). Management of *Phytophthora* induced foot rot and gummosis of kinnow mandarin in low hills of Himachal Pradesh. *Journal of Plant Disease Sciences*, 7(1), 9-12.

- Sawanta, I. S., Sawanta, S. D., & Nanaya, K. A. (1995). Biological control of *Phytophthora* root-rot of coorg mandarin (*Citrus raticulata*) by *Trichoderma* species grown on coffee waste. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 65(11), 842-846.
- Sakalidis, M. L., Ray, J. D., Lanoiselet, V., Hardy, G. E. S., & Burgess, T. I. (2011). Pathogenic *Botryosphaeriaceae* associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. *European Journal of Plant Pathology*, 130(3), 379-391.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied microbiology and biotechnology*, 87(3), 787-799.
- Shahbaz, M., Iqbal, Z., Saleem, A., & Anjum, M. A. (2009). Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 41(1), 359-368.
- Slippers, B., Crous, P. W., Jami, F., Groenewald, J. Z., & Wingfield, M. J. (2017). Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward. *Fungal biology*, 121(4), 307.
- Sultana, N., & Ghaffar, A. (2010). Effect of fungicides and microbial antagonists in the control of *Lasiodiplodia theobromae*, the cause of seed rot, seedling and root infection of bottle gourd. *Pakistan Journal of Agricultural Research*, 23(1/2), 46-52.
- Syed, R. N., Mansha, N., Khaskheli, M. A., Khanzada, M. A., & Lodhi, A. M. (2014). Chemical control of stem end rot of mango caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 26(2), 201-206.
- Vázquez-López, A., Mota-Aguilera, J. A., Cradenas-Soriano, E. y Téliz-Ortiz, D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43: 717-728.
- Velázquez, S., Dejesús, A., & Grabowski Ocampos, C. J. (2016). Control biológico de *Rosellinia* sp. causante de la muerte súbita en macadamia (*Macadamia integrifolia*) con aislados de *Trichoderma* spp. *Investigación Agraria*, 18(2), 77-86.
- Yan, J., Dewdney, M. M., Roberts, P. D., & Ritenour, M. A. (2016). The Effects of Postharvest Hot Water and Fungicide Treatments on *Guignardia citricarpa* Growth and the Development of Citrus Black Spot Symptoms on 'Valencia' Orange Fruit. *HortScience*, 51(12), 1555-1560.

5. CONCLUSIONES GENERALES

Son siete especies del género *Lasiodiplodia* (*L. pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. theobromae*, *L. citrícola*, *L. brasiliensis*, *L. jattophicola* y *Lasiodiplodia sterculiae*), los agentes causales de la muerte descendente del limón 'Persa' en la región limonera de los Municipios de Martínez de la Torre, Tlapacoyan, Papantla, Hueytamalco y San José Acateno.

La incidencia de la enfermedad y la patogenicidad de las especies de *Lasiodiplodia* indican que son económicamente importantes para el cultivo de limón 'Persa', porque tienen el potencial de reducir el rendimiento, la longevidad del árbol y pueden causar el colapso del huerto.

El fungicida Tiofanato de metilo mostró eficiencia en el control de la muerte descendente del limón 'Persa', seguido de Tiabendazol y el fungicida biológico *Trichoderma spp.* Esta información es importante para el diseño del plan de manejo de la enfermedad.