



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS
IN VITRO DEL AGENTE CAUSAL DE LA
MUERTE DESCENDENTE DE *Ficus benjamina*
L. EN EL ORIENTE DEL ESTADO DE
MORELOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
DESARROLLO RURAL**

P R E S E N T A:

MARICELA MARTÍNEZ LÓPEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ**

Cuernavaca, Morelos, octubre de 2019



IDENFITICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS *IN VITRO* DEL AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE DESCENDENTE DE *Ficus benjamina* L. EN EL ORIENTE DEL ESTADO DE MORELOS

Tesis realizada por la **Ing. Maricela Martínez López** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

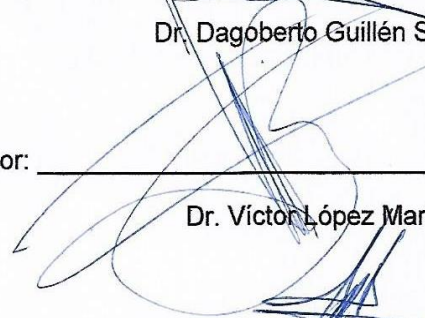
MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL

COMITÉ REVISOR

Director de tesis:


Dr. Dagoberto Guillén Sánchez

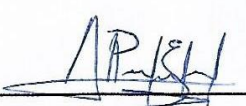
Revisor:


Dr. Víctor López Martínez

Revisor:


Dr. Jrán Alia Tejacal

Revisor:


Dr. Porfirio López Juárez

Revisor:


Dr. Daniel Bárcenas Santana

Cuernavaca, Morelos, octubre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo y financiamiento al presente trabajo de Investigación.

A la Universidad Autónoma de Morelos por permitirme realizar mis estudios de maestría y en especial al posgrado en ciencias agropecuarias por todo el apoyo brindado para culminar la presente investigación.

A mi comité revisor: Dr. Víctor López Martínez, Dr. Iran Alia Tejacal, Dr. Porfirio López Juárez, Dr. Daniel Bárcenas Santana, por sus valiosas aportaciones al presente trabajo de investigación.

Al Dr. Dagoberto Guillen Sánchez, con aprecio, por su amistad, planeación y dirección del presente trabajo de investigación.

A mis hermanos, Anabel Martínez López y Alberto Martínez López, por siempre motivarme a cumplir todas mis metas y por todo su amor.

A mi gran amiga de toda la vida, Ma. Guadalupe Carrera Ángel, por tu apoyo incondicional, por tu amistad, por tus palabras de aliento, no lo hubiera hecho sin ti, ¡este logro también es tuyo!

A mis compañeros y amigos, Isaac, Lore, Álvaro, Mairel, Lety, Nayivi, por todos los buenos momentos compartidos, los guardo en el corazón.

DEDICATORIA

Para Uriel, Gael y Sergio, con amor.

Ustedes son mi inspiración para ser mejor persona cada día.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. HIPÓTESIS.....	4
4. REVISION DE LITERATURA.....	5
4.1 Importancia del género <i>Ficus</i>	5
4.2 La familia <i>Botryosphaeriaceae</i>	5
4.2.1 Especies importantes del género <i>Botryosphaeria</i>	6
4.3 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> asociado a muerte descendente.....	7
4.3.1 Características morfológicas.....	8
4.3.2 Rango de hospederos.....	8
4.3.3 Distribución geográfica.....	11
4.3.4 Epidemiología.....	11
4.4 Manejo de la enfermedad.....	11
5. MATERIALES Y METODOS.....	13
5.1 Localización.....	13
5.2 Actividades de campo.....	14
5.3 Variables evaluadas.....	14
5.3.1 Índice de Severidad de daño (ISD).....	14
5.3.2 Coloración.....	15
5.3.3 Contenido relativo de clorofila.....	15
5.3.4 Porcentaje de árboles plagados y enfermos.....	15
5.4 Colecta de muestras.....	16
5.5 Obtención de aislados.....	16
5.6 Pruebas de patogenicidad.....	17
5.6.1 Inoculo.....	17

5.6.2	Inoculación.....	17
5.6.3	Reaislamiento	17
5.7	Identificación morfológica	18
5.8	Identificación molecular	18
5.8.1	Extracción de ADN.....	18
5.8.2	Amplificación del gen ribosomal 18S mediante PCR.....	19
5.8.3	Análisis filogenético del gen 18S.....	20
5.8.4	Amplificación del gen del factor de elongación de la traducción 1-alfa	20
5.8.5	Análisis filogenético del gen de elongación 1-alfa	21
5.9	Evaluación de fungicidas <i>in vitro</i>	21
5.9.1	Aislados	21
5.9.2	Fungicidas	21
5.9.3	Preparación de medio de cultivo con fungicida	23
5.9.4	Análisis de datos.....	23
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
6.1	Descripción de síntomas de ramas colectadas.....	24
6.2	Índice de severidad de daño.	25
6.3	Coloración.....	26
6.4	Correlación de contenido relativo de clorofila con índice de severidad de daño	27
6.5	Porcentaje de árboles plagados y enfermos.....	28
6.6	Pruebas de patogenicidad.....	28
6.7	Descripción morfológica	30
6.8	Morfología de estructuras reproductivas de <i>L. theobromae</i>	31
6.9	Identificación molecular	31
6.9.1	Análisis filogenético del gen 18S.....	31
6.9.2	Análisis filogenético del gen endógeno del factor de elongación de la traducción 1-alfa.....	32
6.10	Evaluación de fungicidas <i>in vitro</i>	34
7.	CONCLUSIONES	38
8.	LITERATURA CITADA.....	39

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Reportes en México de <i>L. theobromae</i> afectando distintos cultivos frutícolas y maderables según investigación realizada por Picos <i>et al.</i> (2014).....	10
Cuadro 2.	Escala usada para evaluar la severidad de la muerte descendente de árboles de <i>Ficus benjamina</i> en el oriente del estado de Morelos, propuesta por Salas <i>et al.</i> (2016) con una leve modificación en la descripción de los síntomas.....	14
Cuadro 3.	Escala de color diseñada con base a la escala CIELAB (L,C,H) en hojas de <i>Ficus benjamina</i>	15
Cuadro 4.	Condiciones de PCR utilizados para la amplificación del gen 18S.....	19
Cuadro 5.	Condiciones de PCR utilizados para la amplificación del gen de elongación 1-alfa (EF1- α).....	20
Cuadro 6.	Fungicidas evaluados <i>in vitro</i> para la inhibición de crecimiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> aislado de ramas de <i>Ficus benjamina</i> con síntomas de muerte descendente.....	22
Cuadro 7.	Parámetros de color presentados en hojas de árboles evaluados de <i>Ficus benjamina</i>	26
Cuadro 8.	Correlación estadística entre contenido relativo de clorofila e índice de severidad de daño.....	27
Cuadro 9.	Valores de la Inhibición del crecimiento micelial <i>In vitro</i> de <i>L. theobromae</i> en medio de cultivo PDA, mediante fungicidas que representan diferentes grupos químicos 72 hrs después de la siembra.....	35
Cuadro 10.	Valores de la Inhibición del crecimiento micelial <i>In vitro</i> de <i>L. theobromae</i> en medio de cultivo PDA, mediante fungicidas que representan diferentes grupos químicos 10 días después de la siembra.....	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación de sitios de muestreo para evaluar la incidencia y severidad de la muerte descendente de <i>Ficus benjamina</i>	13
Figura 2.	Síntomas de muerte descendente en arboles de <i>Ficus benjamina</i>	25
Figura 3.	Prueba de patogenicidad realizada en arboles de <i>Ficus Benjamina</i>	29
Figura 4.	Cultivo en medio PDA de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> aislado de ramas de <i>Ficus benjamina</i> con síntomas de muerte descendente.....	30
Figura 5.	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> . A. Conidios inmaduros (Amerosporas). B. Conidios maduros (Didimosporas). C. Parafisos hialinos, aseptados. Barra de escala = 10 μ m.....	31
Figura 6.	Análisis filogenético de la subunidad ribosomal 18S de diferentes cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	32
Figura 7.	Árbol filogenético de comparación evolutiva obtenido a partir del análisis de los genes 18S ribosomal y EF-1 alfa de diferentes cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>	33

RESUMEN

En marzo de 2011 se reportó en el estado de Morelos una enfermedad fulminante en árboles de *Ficus*. La severidad de esta enfermedad es alarmante ya que se presenta con alta incidencia y amenaza con extenderse a otras especies del género *Ficus*, por lo que representa un peligro para este y otros géneros. Bajo este panorama, se evaluaron 750 árboles de *Ficus benjamina* en el oriente del estado de Morelos. Las variables evaluadas fueron índice de severidad de daño, coloración, contenido relativo de clorofila, porcentaje de árboles plagados y enfermos. El 61 % de los árboles se encontraron aparentemente sanos y presentaron un follaje verde opaco y poco luminoso, además se presentó una correlación negativa baja pero significativa entre el contenido relativo de clorofila y la severidad, es decir que a mayor cantidad de clorofila menor la severidad. Se encontró un 99 % de árboles afectados por trips y el 38% de estos se encuentran además enfermos. Mediante caracterización morfológica y molecular se identificó al agente causal como *Lasiodiplodia theobromae*, siendo este el primer reporte en *Ficus benjamina* en México. Las pruebas de sensibilidad *in vitro* determinaron que la combinación preformulada de cyprodinil + fludioxinil, Mancozeb y Tebuconazole, en sus tres dosis, fueron los fungicidas más efectivos para reducir el crecimiento micelial con un 100% de eficacia hasta el día 3 cuando el testigo llenó la caja. Sin embargo, a los 10 días solo se mantuvo la mezcla de cyprodinil + fludioxinil y el Tebuconazole con 100% de eficacia.

Palabras clave: *Ficus benjamina*, *Lasiodiplodia theobromae*, *in vitro*, cyprodinil + fludioxinil, Tebuconazole

ABSTRACT

In March 2011, an annihilating disease was reported in Morelos state. The severity of this disease is alarming as it occurs with high incidence and threatens to spread to other species of the *Ficus* genus, so it represents a danger to this and other genera. Under this panorama, 750 *Ficus benjamina* trees in the eastern of Morelos state were evaluated. The variables evaluated were index of severity of damage, coloration, relative chlorophyll content, percentage of diseased and plagued trees. 61% of trees apparently were healthy and they had an opaque and low light green foliage, in addition there was a low but significant negative correlation between the relative chlorophyll content and the severity, that is, the higher amount of chlorophyll, the severity is lower. 99% of trees were affected by thrips and 38% of them were also sick. Through the morphological and molecular characterization the causal agent was identified as *Lasiodiplodia theobromae*, being this the first report in *Ficus benjamina* in México. *In vitro* sensitivity tests showed that the mix of cyprodinil + fludioxinil, Mancozeb and Tebuconazole were the most effective fungicides to reduce mycelial growth with 100% efficacy after 3 days when the untreated check filled the Petri-dish. However, 10 days after application, only the mix of cyprodinil + fludioxinil and Tebuconazole maintained 100% efficacy.

Keywords: *Ficus benjamina*, *Lasiodiplodia theobromae*, *in vitro*, cyprodinil + fludioxinil, Tebuconazole

1. INTRODUCCIÓN

Los árboles urbanos presentan beneficios ambientales sociales y económicos los cuales constituyen el hábitat de un gran número de poblaciones de aves y otros animales que encuentran refugio dentro del entorno urbano, particularmente aquéllos que habitaban el ecosistema original antes de extenderse la mancha urbana. También ayudan a reducir la contaminación del ruido a través de su absorción, su desviación, su reflexión y su refracción (ISA, 2011). Así mismo reduce la contaminación mediante la captura del dióxido de carbono y la exhalación de oxígeno de sus tejidos, principalmente por las hojas cuando realizan la fotosíntesis, los árboles contribuyen a reducir la concentración de CO₂ y otros gases nitrosos y sulfurosos, por eso se les llama “sumideros de carbono”. También las hojas y tallos atrapan gran cantidad de polvos y substancias volátiles actuando como filtros de aire, por eso a los árboles también se les ha denominado “pulmones verdes” (Rivas, 2001). Otros beneficios son la reducción de la erosión del suelo, la compactación del suelo mejora la calidad del agua, regulan la temperatura y la humedad, amortiguan la contaminación atmosférica y el ruido, entre otros, que contribuyen a la salud y calidad de vida de las personas y en ocasiones por su relación con el paisaje arquitectónico (Rivas, 2001).

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (1975) menciona que las áreas arboladas reducen el escurrimiento desde un 5 hasta 35%. Un árbol maduro puede interceptar 1000 L de agua de lluvia por año, reduciendo el escurrimiento y abasteciendo de agua limpia al subsuelo (Rivas, 2001). Debido a su capacidad para retener el suelo y facilitar la absorción del agua de lluvia, los bosques urbanos, humedales y/o parques también funcionan como un componente del sistema de control de inundaciones. Al mismo tiempo, su papel significativo en la captación de agua de lluvia y su infiltración al subsuelo, propicia la recarga de los mantos acuíferos, favoreciendo con ello las reservas de agua para las ciudades.

En el ámbito social se han identificado efectos benéficos para reducir gran cantidad de enfermedades físicas y emocionales: el verde del paisaje reduce el estrés en las personas, introduciendo calma y tranquilidad, haciéndolas más productivas y felices. Se ha demostrado una recuperación más pronta en los pacientes de los hospitales que

cuentan con vistas a las áreas verdes arboladas. También los niños con déficit de atención presentan un mejor comportamiento en ambientes arbolados (Rivas, 2001). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda tener una extensión de 9 a 12 m² de áreas verdes por habitante en los centros urbanos, para garantizar una buena calidad de vida (ISA, 2011).

El arbolado que crece en áreas urbanas y suburbanas, generalmente bajo condiciones de estrés físico y fisiológico, la finalidad es lograr y mantener los beneficios ambientales y sociales que ofrecen las arboledas vitales, longevas y seguras, previniendo y /o atenuando los riesgos e inconvenientes potenciales que el arbolado pueda generar. En general, el árbol urbano presenta un bajo promedio de vida que en muchos casos no excede 25 años, lo anterior, como resultado de la interacción de diversos factores, entre los que destacan: edad, genética de la especie, compactación del suelo, superficies impermeables (pavimentos y concreto), altas temperaturas y contaminación atmosférica; espacio vital restringido y la falta de buenas prácticas de manejo. El impacto negativo de estos agentes promueve la presencia de árboles enfermos, también reduce su salud y estética, afectando además su arquitectura y estructura, tornando al árbol en elemento de riesgo para los usuarios de las áreas verdes (Saavedra *et al.*, 2016).

Los cuidados sanitarios del arbolado se realizan a partir de un buen diagnóstico del problema por parte de un profesional. Generalmente, los primeros síntomas de deterioro del árbol se expresan en la apariencia de sus copas. Las copas densamente foliadas están asociadas con árboles vigorosos, mientras que las pequeñas y de follaje disperso podrían encontrarse en un estado de declinamiento (Shomaker *et al.*, 2007); por lo tanto, a través de la evaluación se determina su estado de salud actual (Saavedra *et al.*, 2016).

En la zona conurbada los laureles (*Ficus retusa*) se han utilizado de ornato y sombra urbana tal es el caso en Cuernavaca Morelos y otros estados de la república mexicana (Salazar, 2017). Piedra *et al.* (2006) reporta en base a la literatura florística del estado de Morelos 8 especies de *Ficus* nativas y 9 cultivadas, en estas últimas se encuentran: *Ficus benghalensis* L., *Ficus benjamina* L., *Ficus carica* L., *Ficus elástica* Roxb, *Ficus lyrata* Warb., *Ficus pandurata* Hance., *Ficus religiosa* L., *Ficus retusa* L. y

Ficus pumila L. En México, *Ficus benjamina* L. se usa principalmente como ornamental y ha sido ampliamente aceptado debido a su bajo costo de producción, crecimiento rápido y follaje denso y lustroso (Alanís-Flores, 2005). Al igual que muchas especies vegetales, el crecimiento y desarrollo de *F. benjamina* es afectado por varios hongos fitopatógenos, donde predominan los ascomicetos y sus anamorfos (Fernández *et al.*, 2017). En marzo de 2011 se reportó en el estado de Morelos una enfermedad aniquilante y que ha matado cientos de árboles de gran talla, siendo Jiutepec el municipio más afectado. Esta enfermedad se llama “Muerte fulminante del Laurel”. En el 2007, esta enfermedad se reportó en Tehuacán, Puebla en donde se realizaron aislamientos en laboratorio de hojas, ramas, tallos y raíces de árboles con diferentes grados de daño, y se aislaron a: *Phytophthora* sp., *Ganoderma* sp., *Verticillium* sp., *Fusarium* spp. y *Phellinus* spp., éste último reportado por primera vez para el estado de Morelos (Salazar, 2017).

La severidad de esta enfermedad es alarmante ya que se presenta con alta incidencia en arboles conocidos como Ficus, laurel de la India y tabachines. También esta enfermedad se ha encontrado en el árbol del hule, en amate blanco y amenaza con extenderse a otras especies del género *Ficus*. Dada la importancia de tener arbolado en zonas urbanas es trascendente que este se encuentre en buen estado, por ello la sanidad forestal involucra la determinación de los principales factores de daño biótico que están afectando a los árboles. En las recomendaciones de manejo forestal se da particular atención a este aspecto, mediante el registro y estudio de cualquier tipo de enfermedad y plaga visible en el árbol (FAO, 2008). En Morelos es poco o nulo el mantenimiento a los árboles urbanos y más pobre es aún el control biológico pues no existen tratamientos para combatir plagas a excepción de la poda y/o derribo para control del muérdago.

Los brotes de plagas pueden contribuir directa o indirectamente a pérdidas económicas y medioambientales o peor aún a contribuir a desgajes de ramas que pueden caer sobre pasos peatonales y vehiculares. Los insectos y las enfermedades pueden tener efectos negativos sobre el crecimiento y la supervivencia de los árboles, el rendimiento y la calidad de la madera y por tanto en la resistencia a la estabilidad del mismo convirtiéndolo en un árbol de riesgo, y afectando el hábitat de la fauna y los valores recreativos, estéticos y culturales. La contaminación constituye también una amenaza

para la salud y la vitalidad de los árboles (FAO, 2008). Bajo este panorama se plantea el presente estudio en donde se muestrearon árboles de *F. benjamina* L. por ser la especie más predominante en Cuautla y Ayala, Morelos.

2. OBJETIVOS

- Determinar la incidencia y severidad de la muerte descendente de árboles de *Ficus benjamina* en los municipios de Cuautla y Ayala del estado de Morelos.
- Identificar morfológica y molecularmente el agente causal de la muerte descendente de árboles de *Ficus benjamina* en el oriente del estado de Morelos.
- Evaluar la efectividad *in vitro* de fungicidas para el control del agente causal de la muerte descendente de árboles de *Ficus benjamina*.

3. HIPÓTESIS

1. La muerte descendente de árboles de *Ficus benjamina* se presenta, con incidencias mayores al 50 % en el oriente del estado de Morelos.
2. El agente causal de la muerte descendente de árboles de *Ficus benjamina* corresponde a un hongo fitopatógeno.
3. El hongo causal de la muerte descendente de árboles de *Ficus* es susceptible al menos a dos fungicidas preventivos (contacto) y a dos curativos (sistémicos).

4. REVISION DE LITERATURA

4.1 Importancia del género *Ficus*

El género *Ficus*, comúnmente conocida como "Higo", se considera una especie clave en los bosques tropicales, ya que desempeña un papel fundamental en el ecosistema, debido a sus frutos que son consumidos por insectos, aves y animales durante todo el año. Es uno de los géneros más grandes en las angiospermas (Berg and Corner, 2005). La concentración principal de la especie se encuentra en la región asiático-australiana con aproximadamente 500 especies, lo que representa aproximadamente el 66% de las especies del mundo (Chaudhary *et al.*, 2012). Este género agrupa numerosas especies diferentes entre sí; además, es originario de regiones tropicales y subtropicales (Serrato *et al.*, 2004). Muchas especies de *Ficus* son comunes en regiones biogeográficas diferentes y se considera uno de los géneros más diversos respecto de sus hábitats y formas de vida (Chaudhary *et al.*, 2012). Hay más de 750 especies del género *Ficus* distribuidas en todo el mundo, por lo que se le considera el género con mayor número de representantes arbóreos del mundo y México representa prácticamente su límite más septentrional en el continente americano. En México hay un total de 21 especies de *Ficus*, incluidas seis especies (28.6%) que son endémicas de este país. Se incluyen cinco especies en el subgénero *Pharmacosycea* y 16 especies están documentadas en el subgénero *Urostigma* (Carauta y Díaz, 2002; Serrato *et al.*, 2004).

Piedra *et al.* (2006) reportan que en el estado de Morelos prosperan ocho especies nativas de *Ficus*, las cuales se ubican en dos subgéneros: *Pharmacosycea* (*Ficus insípida* Willd. y *F. máxima* Mill.) y *Urostigma* (*F. cotinifolia* Kunth, *F. glyxicarpa* (Miq.) *F. pertusa* L., *F. petiolaris* Kunth, *F. trigonata* L. y *Ficus sp.*). De acuerdo con Serrato *et al.* (2004) *F. glyxicarpa* y *F. petiolaris* son endémicas del territorio mexicano.

4.2 La familia *Botryosphaeriaceae*

Botryosphaeriaceae es una familia rica en especies con una distribución cosmopolita, encontrándose en un amplio rango de monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, específicamente sobre ramas leñosas, hojas herbáceas, tallos de gramíneas, yemas y en talos de líquenes, comportándose como saprofitos, parásitos y

endofíticos, además de que pueden causar enfermedades como cancrrosis, gomosis, muerte regresiva o descendente (Denman *et al.*, 2000). Esta familia, única en el orden *Botryosphaeriales*, clase Dothideomycetes, incluye más de 1500 taxones, considerando teleomorfos y anamorfos (Schoch *et al.*, 2006). Los miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* fueron descritos por primera vez en 1820 como especies de *Sphaeria* (Fries), posteriormente en 1863 fue introducido el género *Botryosphaeria* Ces. & De Not. (Cesati y De Notaris, 1863), rectificado por Saccardo (1877) (Crous *et al.*, 2006; Schoch *et al.*, 2006).

En los últimos años, debido principalmente a la disponibilidad de herramientas moleculares, basadas en el DNA recombinante, ha surgido una taxonomía más sólida para este grupo de hongos. Hasta hace una década, la posición del género en la clasificación más alta de los ascomicetes no había sido resuelta (Denman *et al.*, 2000), pero de acuerdo con los estudios filogenéticos de Schoch *et al.* (2006), quien señaló que la posición de la familia *Botryosphaeriaceae* en la clase Dothideomycetes ha sido enigmática, la situó dentro de *Botryosphaeriales*, un orden nuevo e independiente de los órdenes *Pleosporales* y *Dothideales*. De esta manera en la clasificación actual se reconoce al género *Botryosphaeria* como miembro de la familia *Botryosphaeriaceae* y en el orden *Botryosphaeriales*.

4.2.1 Especies importantes del género *Botryosphaeria*

Botryosphaeria es un género rico en especies con una distribución cosmopolita, comúnmente asociado con la muerte y los canchros de plantas leñosas (Crous *et al.*, 2006). Hasta el año 2000 el género *Botryosphaeria* agrupaba 143 especies (Denman *et al.*, 2000). Sin embargo, Crous *et al.* (2006) demostraron que dicho género comprende varios linajes filogenéticos diferentes, correlacionados con las características morfológicas de sus anamorfos, por lo que actualmente *Botryosphaeria* es considerado un género relativamente pequeño consistiendo solo de dos especies: *B. dothidea* y *B. corticis* (Demaree & M.S. Wilcox) Arx & E. Müll., esta última confinada a *Vaccinium spp.* (Alves *et al.*, 2008).

Más de 20 anamorfos han sido relacionados con *Botryosphaeria*; entre los más comunes se encuentran: *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia*, *Macrophomina*, *Neufusicoccum*, *Neoscytalidium*, *Pseudofusicoccum* y *Sphaeropsis* (Denman *et al.*, 2000; Crous *et al.*, 2006; Alves *et al.*, 2008). Con base a los estudios de Denman *et al.* (2000) estos anamorfos se dividieron en dos grupos: conidios hialinos con paredes delgadas (tipo-*Fusicoccum*) y conidios gruesos con paredes gruesas (tipo-*Diplodia*).

4.3 *Lasiodiplodia theobromae* asociado a muerte descendente

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. (*Botryodiplodia theobromae* Pat.) se clasifica dentro de los Ascomicetos en el orden *Botryosphaeriales* y en la familia *Botryosphaeriaceae* (Schoch *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2013); presenta un estado sexual (teleomorfo), poco común, *Botryosphaeria rhodina*. Sin embargo, no existen descripciones recientes de su estado sexual, por lo cual se ha reportado que éste se encuentra perdido (Phillips *et al.*, 2008).

Lasiodiplodia theobromae y *Phomopsis* sp. (Diaporthales: Diaporthaceae) son los agentes causales más frecuentes del secado de ramas y troncos, el marchitamiento y la subsiguiente abscisión de hojas que afectan a las especies de *Ficus* (Oliveira *et al.*, 2010). *Ficus carica* L. en la ciudad de Fortaleza, estado de Ceará y *F. microcarpa* en el estado de Minas Gerais, Brasil, mostraron síntomas de muerte progresiva, *Lasiodiplodia theobromae* fue el agente causal de la enfermedad (De Medeiros *et al.*, 2013).

Cardoso *et al.* (2002) reportaron una enfermedad llamada muerte descendente de rama negra afectando gravemente hasta un 30 % de huertos de Anacardo (*Anacardium occidentale*) causado por *Lasiodiplodia theobromae* en los estados de Ceará y Piauí, Brasil.

Las especies de *Botryosphaeriaceae*, como *Lasiodiplodia hormozganensis*, *Lasiodiplodia iraniensis* y *Lasiodiplodia egyptiaca* también se han asociado con la muerte descendente del mango en Irán, Australia y Egipto. *Lasiodiplodia theobromae*, sin embargo, se ha descrito como el agente causal en la destrucción de huertos de mangos a los pocos días o semanas de infección en India, Estados Unidos, Pakistán, Brasil, Omán y Corea (Saeed *et al.*, 2017).

4.3.1 Características morfológicas

L. theobromae produce micelio veloso aéreo inicialmente de color gris, tornándose gris olivo a los 7 días y con el tiempo adquiere un color negro. Las temperaturas de crecimiento son 15 °C como mínima, óptima de 28 °C y máxima de 40 °C (Slippers *et al.*, 2004; Alves *et al.*, 2008).

El ascocarpo es de color café oscuro a negro, agregado, con pared gruesa de color café oscuro y hialino en capas internas, de 250-400 µm de diámetro. El asca es bitunicada, estipitada, con 8 esporas, de 90-120 µm de longitud. Las ascosporas son biseriadas, hialinas, aseptadas de 30-35 x 11-14 µm. El conidiomata es estromático, simple o agregado, inmerso en el hospedero y una vez maduro emerge de éste, de color café oscuro, unilocular, de pared gruesa o delgada de color marrón, con frecuencia setoso, de hasta 5 mm de ancho, ostiolo central, único, papilado. Parafisos hialinos, cilíndricos, tabicados, ocasionalmente ramificados con los extremos redondeado hasta 55 µm de largo y 3-4 µm de ancho (Phillips *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2008).

Los conidios son subovoides a elipsoidales, con ápices ampliamente redondeados, que se estrechan para trincar la base, más ancha a mediados del tercio superior, de paredes gruesas, con contenido granular, en un principio hialino y aseptados, convirtiéndose a café oscuro una vez maduros, con 1 septo, presentan depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuestos longitudinalmente dando una apariencia estriada con medidas de 21-31 x 13-15 µm y una proporción de 1.9 largo/ancho (Phillips *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2008).

4.3.2 Rango de hospedantes

Es un hongo plurívoro y se ha asociado con aproximadamente 500 hospederos (Punithalingam, 1980). Este patógeno de plantas, aparentemente no especializado, causa numerosas enfermedades, entre las que se incluyen la muerte descendente, pudrición de raíz, pudrición de frutos, manchas foliares y escoba de bruja, entre muchas otras (Punithalingam, 1980). Menos frecuentemente se ha asociado con queratomicosis y phaeohyphomycosis en humanos (Punithalingam, 1976; Rebell y Forster, 1976; Summerbell *et al.*, 2004).

Este hongo es cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos, incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, especialmente de los trópicos y subtrópicos. Es un hongo pleomórfico y ubicuo, por lo cual ha tenido más de un sinónimo (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). *L. theobromae* es saprófito, pero se le considera un patógeno latente, encontrándose como endófito en tejidos sanos de la planta, convirtiéndose en patógeno cuando el hospedero está debilitado o estresado (Rubini *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2005).

Sus huéspedes son principalmente plantas leñosas incluyendo frutas y cultivos arbóreos tales como mango (Sangchote, 1991), durazno (Britton *et al.*, 1990), aguacate (Darvas y Kotze 1987). Por su parte Mohali *et al.* (2005) reportan como huéspedes a *Pinus caribaea*, *Eucalyptus urophylla* y *Acacia mangium*. En Venezuela, *L. theobromae* causa el tizón y la muerte de *Pinus caribaea* var. *hondurensis*, *P. oocarpa*, *Azadirachta indica*, *Citrus aurantiifolia*, *C. sinensis* y *Passiflora edulis* y también es un agente importante de la tinción azul en la madera (Cedeño and Palacios-Pru 1992; Mohali 1993; Cedeño *et al.* 1995, 1996; Mohali *et al.* 2002).

A nivel mundial existen registros de *L. theobromae* afectando cultivos frutales de mango (Jonhson *et al.*, 1992), aguacate (Pegg *et al.*, 2003), papaya (Queiroz *et al.*, 1997), plátano (Alves *et al.*, 2008), rambután (Sivakumar *et al.*, 1997), litchi (Liu *et al.*, 2005), uva (Van Niekerk *et al.*, 2004), guanábana (Lutchmeah, 1988), anacardo (Cardoso *et al.*, 2002), cítricos y duraznos (Damn *et al.*, 2007) entre otros, causando pérdidas económicas en las distintas etapas de la producción.

En México, *Lasiodiplodia theobromae* ha sido reportado causando distintas enfermedades en varios cultivos principalmente frutícolas (Cuadro 1). El reporte más antiguo encontrado de este patógeno es el realizado por Álvarez (1976) afectando el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*).

Cuadro 1. Reportes en México de *L. theobromae* afectando distintos cultivos frutícolas y maderables según investigación realizada por Picos *et al.* (2014).

Hospedero	Enfermedad	Núm. de acceso NCBI	Referencia
<i>Anacardium occidentale</i>	Necrosis de frutos	NR	Canales, 2007
<i>Anona spp.</i>	Muerte descendente de ramas	NR	Hernández <i>et al.</i> , 2013
	Pudrición de fruto	NR	
<i>Carica papaya</i>	Pudrición de fruto	KC335157	Mosqueda <i>et al.</i> , 1996
		KC335158	
	Pudrición de pedúnculo	KC806060	Rojo, 2013
		KC806061	
		KC806062	
<i>Carya illinoensis</i>	Pudrición del fruto	NR	Alvidrez <i>et al.</i> , 2012
<i>Citrus aurantium L.</i>	Muerte de plantas	NR	Varela <i>et al.</i> , 2013
<i>Citrus aurantifolia</i>	Muerte de ramas	NR	Varela <i>et al.</i> , 2013
<i>Citrus sinensis</i>	Pudrición de la base del pedúnculo	NR	Varela <i>et al.</i> , 2013
<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>	Manchado de cáliz	NR	Martínez, 2010
<i>Mangifera indica</i>	Cáncer de troncos y ramas	NR	Canales, 1998
	Muerte descendente	NR	Becerra, 1995
	Pudrición del pedúnculo	JQ619648	Mosqueda <i>et al.</i> , 1996
		JQ619649	Tucuch <i>et al.</i> , 2005
		JQ619650	Sandoval <i>et al.</i> , 2013
		JQ619651	
<i>Nephelium lappaceum L.</i>	Pudrición de frutos	FJ478102.1	Hernández, 2010
<i>Persea americana</i>	Pudrición del pedúnculo	NR	Ochoa <i>et al.</i> , 2007
<i>Pinus pseudostrobus</i>	Cáncer de tallo	NR	Mohali <i>et al.</i> , 2005
<i>Pinus sp.</i>	Cáncer de tallo	AY236952	Slippers <i>et al.</i> , 2004
<i>Pouteria sapota</i>	Muerte descendente	NR	Bautista <i>et al.</i> , 2002
	Pudrición de frutos	JQ245975	Gómez <i>et al.</i> , 2009
		NR	Vázquez <i>et al.</i> , 2009
<i>Theobroma cacao</i>	Pudrición de la mazorca	NR	Álvarez, 1976
<i>Vitis vinifera</i>	Muerte descendente	EU012363	Úrbez <i>et al.</i> , 2008

NR= No reportado

Algunos reportes solo consideran características morfológicas y otros consideran además alguna caracterización molecular. Hasta la fecha no se encuentran reportes de *Lasiodiplodia theobromae* afectando a *Ficus benajamina*.

4.3.3 Distribución geográfica

La especie tipo del género *Lasiodiplodia*, *L. theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., está ampliamente distribuida a nivel mundial, pero es más común en los trópicos y subtrópicos (Punithalingam, 1980).

4.3.4 Epidemiología

La principal vía de entrada de *L. theobromae* a los hospederos es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos o causas naturales (Ploetz, 2003).

El hongo sobrevive sobre tejidos muertos en el árbol o suelo (Pegg *et al.*, 2003) y especialmente en frutos momificados (Ploetz, 2003). La incidencia de *L. theobromae* está influenciada por temperaturas mayores a 30° C, al estrés hídrico y bajos niveles de nutrición de la planta (Khanzada *et al.*, 2005).

Johnson *et al.* (1993) mencionaron que las esporas pueden germinar y penetrar en el tejido del hospedante a través de heridas, permaneciendo como endófitos en las ramas de árboles de mango. Otros autores también reportaron que la infección también puede ocurrir mediante semillas, estomas o lenticelas (Brown y Hendrix, 1981; Smith *et al.*, 1996). Posteriormente las hifas colonizan las partes florales desarrollándose endofíticamente en tejido sano de tallos, ramas, raíces y hojas sin expresión de síntomas hacia el exterior. Esta fase latente puede ser interrumpida por algún tipo de estrés en el hospedante, tal como el estrés hídrico, causando que la fase patogénica del ciclo de vida sea disparada (Johnson *et al.*, 1992; Freire y Becerra, 2001).

En postcosecha, los frutos pueden ser infectados al colocarlos sobre el suelo después de cosechados o a través del contacto físico de un fruto sano con uno enfermo (Ventura *et al.*, 2004).

4.4 Manejo de la enfermedad

Debido a la ubicación interna y la diversidad de hongos que están involucrados, disminuye la oportunidad de controlar estos desordenes con fungicidas, y debido a que

la transmisión de estos patógenos ocurre a través del viento y salpicaduras de lluvia, las aplicaciones estratégicas de fungicidas preventivos de amplio espectro pueden ser efectivas en ciertas épocas del año (Peterson *et al.*, 1991). La poda de partes afectadas y el tratamiento de heridas, así como el manejo de factores de predisposición controlables como el estrés por sequía, pueden ser benéficos. Sin embargo, un mejor conocimiento de la epidemiología de la enfermedad podría ayudar en estos esfuerzos.

Canales (1998) sugiere, para el control del cáncer de tronco y ramas de mango, realizar una cirugía en los cánceres hasta eliminar el tejido dañado y aplicar Benlate[®], Tecto 60[®] o Derosal 50[®] en las heridas. También en caso de mango, para muerte descendente se recomienda podar las heridas y realizar aspersiones de fungicidas a base de cobre cada 15-20 días, también se puede aplicar los productos Captán, Maneb, Zineb y Benomyl, desde el inicio de la floración hasta un mes antes de la cosecha (Tucuch *et al.*, 2005). En marañón se recomiendan podas sanitarias y tratamiento preventivo con fungicidas a base de oxiclورو de cobre o azufre antes de iniciar la floración; durante la floración y formación del fruto se puede utilizar un fungicida sistémico a base de Fosetyl-al, Metalaxil-m o Triforine para reducir la incidencia de la necrosis en frutos (Canales, 2007).

Tovar *et al.* (2013) reportaron que la combinación de lavado y aplicación posterior de Tiabendazol redujo la incidencia de la enfermedad ocasionada por *L. theobromae* hasta un 81 % en injertos de zapote. Los fungicidas ciprodinil+fludioxinil, piraclostrobin+boscalid, procloraz, tebuconazol, iprodione fueron eficaces para inhibir el crecimiento micelial de *L. theobromae in vitro*.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 Localización

Para determinar la incidencia y severidad de la muerte fulminante de *Ficus benjamina*, Se evaluaron y georreferenciaron 750 árboles durante los meses de febrero a marzo de 2018 en la ciudad de Cuautla y en la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (EESuX) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (18°49' N de latitud y 99°01' O de longitud) que se ubica en el municipio de Ayala, Morelos (Figura 1). Los criterios para la elección de árboles fueron que tuvieran un diámetro de tallo normal superior a 10 cm y de 1 a 2 metros de altura y que estuvieran plantados en camellones o banquetas.

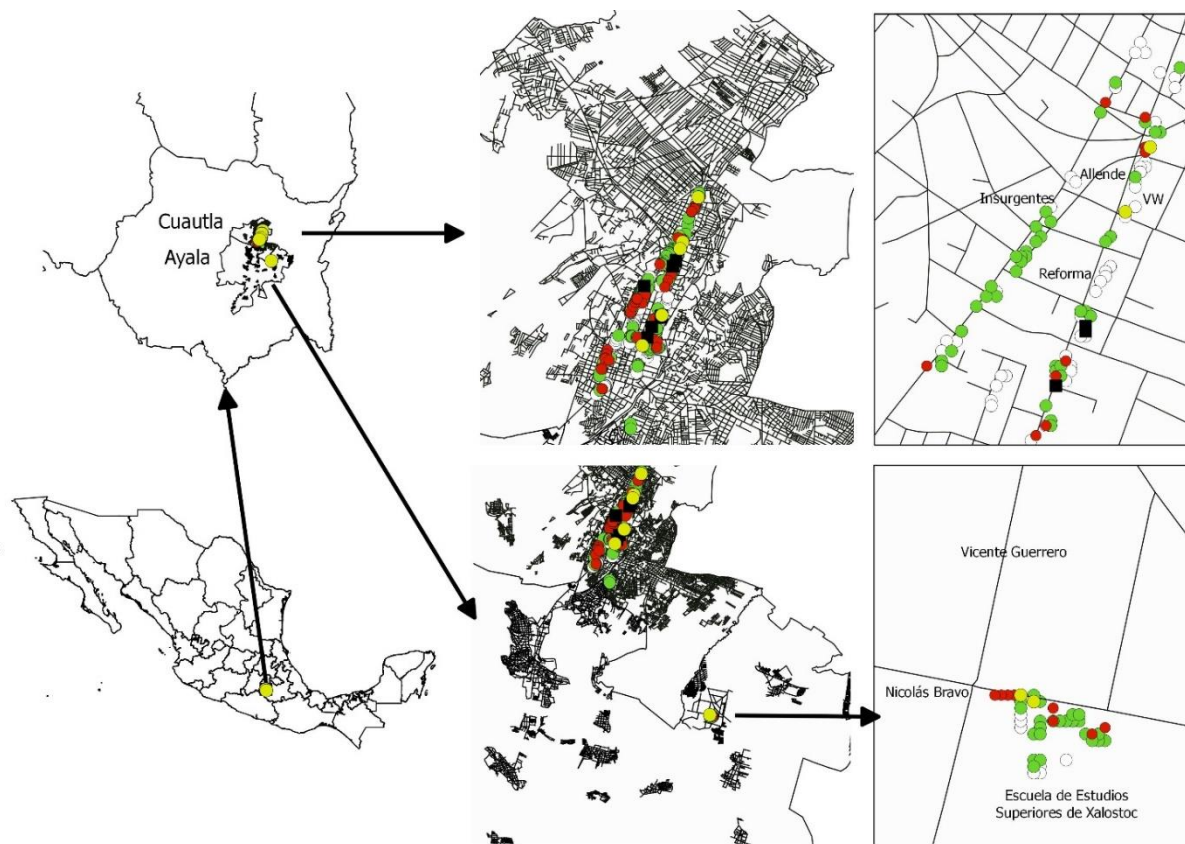


Figura 1. Ubicación de sitios de muestreo para evaluar la incidencia y severidad de la muerte descendente de *Ficus benjamina*.

5.2 Actividades de campo

Se realizó un recorrido preliminar en las principales avenidas del centro de Cuautla con ayuda de un mapa local proporcionado por la Secretaría de Turismo con la finalidad de identificar la especie de *Ficus* predominante y su frecuencia. Con esto se identificó a *Ficus benjamina* como la especie predominante y se determinó muestrear todos los árboles de la avenida Reforma, Avenida José María Morelos, Avenida Insurgentes, Avenida Tetecala, Avenida Aquiles Serdan, Gabriel Tepepa, Calle Peñon, Angustias de Calleja, Virginia Hernández y Dr. Parres.

5.3 Variables evaluadas

5.3.1 Índice de severidad de daño (ISD)

Se evaluaron todos los árboles de *F. benjamina* plantados en las avenidas antes mencionadas y que cumplían con los criterios establecidos mediante la escala especificada en el cuadro 2.

Cuadro 2. Escala usada para evaluar la severidad de la muerte descendente de árboles de *Ficus benjamina* en el oriente del estado de Morelos, propuesta por Salas *et al.* (2016) con una leve modificación en la descripción de los síntomas.

Clase	Descripción
0	Árbol sano, no hay evidencia de síntomas visibles.
1	Marchitez foliar evidente; se puede observar presencia de signos. No todos los síntomas se expresan.
2	El árbol está visiblemente enfermo. Hay síntomas evidentes de la enfermedad y signos presentes. Pérdida de más de 50 % del área foliar en un patrón progresivo.
3	Afectación total del árbol; ausencia total de follaje; hay pérdida y desprendimiento evidente de ramas; 75 % del tronco afectado, la enfermedad se manifiesta con claridad. Cuerpos fructíferos presentes.
4	Árbol completamente seco y/o podrido.

Se realizó registro espacial de los árboles enfermos en la zona de muestreo y su grado de severidad, lo que permitió visualizar patrones de avance de la enfermedad y su incidencia en las zonas.

5.3.2 Coloración

Se colectaron hojas de distinta tonalidad de color y se realizaron 300 mediciones mediante un Espectrofotómetro X-Rite modelo 3290. La escala de color se realizó con base en la escala CIELAB (L, C, H).

Cuadro 3. Escala de color diseñada con base a la escala CIELAB (L, C, H) en hojas de *Ficus benjamina*.

Clase	Coloración
1	Verde
2	Amarillo verdoso
3	Naranja-amarillo

5.3.3 Contenido relativo de clorofila

El contenido relativo de clorofila se determinó en las hojas de todos los árboles mediante un SPAD marca Konica minolta, modelo SPAD-502 plus. La medición se realizó directamente a pie de árbol, se cortaron 4 hojas una por cada punto cardinal, se limpiaron previamente con papel sanita, se realizó la calibración previa del aparato y se tomó la lectura promedio de cuatro lecturas que el mismo SPAD calcula. Se realizó un análisis estadístico de correlación de Pearson mediante el paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, versión 9.0), para determinar la posible correlación entre el contenido relativo de clorofila y el índice de severidad de daño de la enfermedad.

5.3.4 Porcentaje de árboles plagados y enfermos

El porcentaje de árboles plagados y enfermos se obtuvo mediante la siguiente función estadística:

$$\% \text{ de árboles enfermos o plagados} = \frac{\text{Número de árboles afectados}}{\text{Total de árboles muestreados}} \times 100$$

En el caso donde el patógeno o plaga presente era más de uno, se tomó en cuenta el de mayor frecuencia.

5.4 Colecta de muestras

En las diferentes áreas donde se evaluó la incidencia y severidad de la enfermedad, se colectaron muestras de ramas de árboles de *F. benjamina* con síntomas característicos de muerte descendente, marchitez y/o pérdida de follaje. Estas fueron colocadas en bolsas de polietileno y etiquetadas con el sitio y árbol muestreado, las cuales, se colocaron en una hielera para transportarse al laboratorio de Fitopatología de la EESuX-UAEM, donde se almacenaron en refrigeración para su posterior proceso. En total se colectaron 50 muestras de ramas con síntomas característicos de muerte descendente

5.5 Obtención de aislados

De las ramas colectadas se lavaron con agua corriente, posteriormente se cortaron para identificar la zona de avance de la enfermedad. Se realizaron fracciones de 5 mm² aproximadamente de dicha zona y fueron desinfestados con hipoclorito de sodio al 1 % durante dos minutos, se lavaron con agua destilada estéril dos veces y se secaron en sanitas previamente esterilizadas. Posteriormente se colocaron 4 fracciones en una caja Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Las cajas se incubaron a 28 ± 1 °C por 48 horas hasta observar crecimiento (Mendoza, 1999).

También se realizaron cámaras húmedas de las muestras colectadas y se incubaron en el laboratorio durante 8 días a temperatura ambiente, hasta observar crecimiento fungoso. Se tomó una muestra de micelio con una aguja de disección flameada y se transfirió a una caja Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas Petri fueron selladas con Parafilm® para evitar contaminación y se incubaron a temperatura ambiente para favorecer el crecimiento del hongo.

Los aislados obtenidos se purificaron por técnica de punta de hifa y se incubaron en las mismas condiciones hasta que se observó micelio y/o estructuras de reproducción

para su posterior identificación. Estos mismos aislados fueron purificados por segunda ocasión por la técnica de cultivos monospóricos en medio PDA.

5.6 Pruebas de patogenicidad

5.6.1 Inoculo

Una vez obtenidos los cultivos monospóricos se procedió a sembrar en cajas Petri con medio de cultivo PDA y se incubó a 28 °C hasta que el micelio cubrió totalmente la caja. Para realizar la inoculación se utilizó una cepa de 5 días de edad.

5.6.2 Inoculación

Con la finalidad de evaluar la patogenicidad de las sepas aisladas, se inocularon 10 árboles de *F. benjamina* sanos procedentes de vivero de siete meses de edad y de 40 a 50 cm de altura.

La inoculación se efectuó en ramas de la parte media del árbol. Después de haber desinfestado la zona con hipoclorito de sodio al 1 %, la corteza se separó con un bisturí aséptico, abarcando un área de 10 mm cuadrados; con una aguja de disección se extrajo un cubo de medio de cultivo con micelio y se colocó en el lugar donde se retiró la corteza, posteriormente se colocó nuevamente la corteza y se protegió la zona con algodón húmedo y un plástico adherente a manera de cámara húmeda. En el testigo la inoculación se hizo con PDA sin micelio. Transcurridos 45 días se retiró el plástico adherente y se raspó superficialmente con un bisturí la porción del tallo inoculada, a fin de demarcar y medir con un vernier el avance lineal del patógeno (Rondón *et al.*, 1991).

5.6.3 Reaislamiento

Se tomaron fragmentos de la zona de avance de la enfermedad, fueron desinfestados con hipoclorito de sodio al 1% por un minuto, se lavaron dos veces con agua destilada estéril y fueron secados en papel sanita durante 15 min. Una vez secos se colocaron 4 trocitos en cajas Petri con medio de cultivo PDA. Las cajas Petri fueron selladas con Parafilm® para evitar contaminación y se incubaron a 28 °C por 48 horas.

Las características macro y micro de las colonias fueron comparadas con los cultivos monosporicos iniciales.

5.7 Identificación morfológica

Los aislamientos se identificaron morfológicamente con base en el color, forma de la colonia, crecimiento del micelio, estructuras reproductivas y dimensiones de conidios con apoyo de artículos científicos, ilustraciones y fotografías. Así mismo con el apoyo de claves taxonómicas y descripciones morfológicas de Barnett y Hunter (1998) y Burgess *et al.* (2006).

5.8 Identificación molecular

La identificación por métodos moleculares se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero.

5.8.1 Extracción de ADN

Se utilizaron tres cultivos monospóricos de 6 días de edad provenientes de los dos sitios de muestreo. El DNA fue extraído mediante el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Se tomó una muestra de aproximadamente 20 mg de cada cultivo y se transfirió a un tubo Eppendorf donde se maceró con una punta estéril. Se adicionó 400 μ L de Buffer AP1 y 4 μ L de solución madre de RNasa A, se mezcló vigorosamente y se incubó la mezcla durante 10 minutos a 65 ° C, se mezcló tres veces durante la incubación invirtiendo el tubo. Después de la incubación se adicionaron 130 μ L de buffer P3 y se incubó cinco minutos sobre hielo. La mezcla se centrifugó durante cinco minutos a 14,000 rpm. Se traspasó el sobrenadante a una columna de centrifugación QIAshredder Mini (lila) colocada en un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó durante dos minutos a 14,000 rpm. Se transfirió nuevamente el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y se agregó 1.5 volúmenes de Buffer AW1 al lisado limpio y se mezcló por medio de un pipeteado, se pipetearon 650 μ L de la mezcla del paso anterior en la columna de centrifugación DNeasy Mini colocada en un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó durante 1 minuto a 8000 rpm y se desechó el precipitado. Se colocó la columna en un

nuevo tubo de recolección de 2 mL y se agregaron 500 µL de buffer AW2 y se centrifugó durante un minuto a 8000 rpm. Se desechó el precipitado y se reutilizó el tubo de recolección para nuevamente agregar 500 µL de buffer AW2 a la columna de centrifugación DNeasy Mini y centrifugar durante dos minutos a 14, 000 rpm para secar la membrana. El tubo con el precipitado se desechó y se transfirió la columna de centrifugado DNeasy Mini a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se le adicióno 100 µL de buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy. Se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente (15-25 ° C) y luego se centrifugó durante un minuto a 8000 rpm. El DNA que se obtuvo en este último tubo se resguardo para realizar la PCR. (QIAGEN, 2018).

5.8.2 Amplificación del gen ribosomal 18S mediante PCR

Para amplificar el gen 18S ribosomal se utilizaron los iniciadores NS 1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3') y Fun (5'-GATCCCTAGTCGGCATAGTT-3') que codifican para el gen nuclear ribosomal 18S. El volumen total de reacción de la PCR fue de 25 µL, utilizado para el master mix los siguientes reactivos: 2.5 µL solución amortiguadora (10X), 1 µL MgCl₂ (50mM), 1 µL dNTP (10 mM), 1 µL cada iniciador a 10 pmol µL, 1 µL Taq polimerasa 3U/reacción, 15.5 µL H₂O mili-Q, 2 µL ADN (100 ng). Finalizados los ciclos de la PCR, los productos se visualizaron en gel de agarosa al 1 % con de bromuro de etidio. Así también, se utilizó un marcador de peso molecular de 1.5 kb (GeneRuler) para calcular el tamaño de los amplicones. Los iniciadores y las condiciones de PCR utilizados se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de PCR utilizados para la amplificación del gen 18S

Iniciadores	Gen	Condiciones de PCR					Tamaño producto (pb)	Referencia
		1 ciclo	34 ciclos			Final		
NS1 F	18S rARN	94°C 5 min	94 °C 1min	62 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 7 min	1000	White <i>et al.</i> , 1990.
Fun R								Klingspor y Jalal, 2006

5.8.3 Análisis filogenético del gen 18S

Los productos de PCR del gen 18S ARNr se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Cuernavaca, Morelos, para lo cual emplearon un secuenciador Applied Biosystems, modelo 3130xl. Las secuencias de nucleótidos obtenidas de gen 18S ARNr se compararon con la base de datos del Gen Bank mediante la herramienta BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990), servicio ofrecido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (siglas en inglés NCBI). Las secuencias se alinearon y compararon con el software bioinformático Mega 7.0. Para la elaboración de los respectivos árboles filogenéticos se utilizó el mismo software.

5.8.4 Amplificación del gen del factor de elongación de la traducción 1-alfa

Para amplificar el gen de elongación 1-alfa (EF1- α), se utilizaron los primers EF1-728F (5'- CATCGAGAAGTTTCGAGAAGG -3') y EF1-986R (5'- TACTTGAAGGAACCCCTTACC -3') (Carbone and Kohn, 1999) como lo describe Phillips *et al.* (2005).

Cuadro 5. Condiciones de PCR utilizados para la amplificación del gen de elongación 1-alfa (EF1- α).

Iniciadores	Gen	Condiciones de PCR					Tamaño producto (pb)	Referencia
		1 ciclo	32 ciclos			Final		
EF1-728 F		94°C	58 °C	72 °C	72 °C	72 °C		Carbone and Kohn, 1999. Alves <i>et al.</i> , 2008.
	EF1- α	1 min	40 seg	1 min	1 min	7 min	300	
EF1-986 R								

5.8.5 Análisis filogenético del gen de elongación 1-alfa

Los productos de PCR del gen elongación 1-alfa (EF1- α), se enviaron a secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM, Campus Cuernavaca, Morelos, para lo cual emplearon un secuenciador Applied Biosystems, modelo 3130xl. Las secuencias de nucleótidos obtenidas de gen 1-alfa (EF1- α) se compararon con la base de datos del Gen Bank mediante la herramienta BLAST algorithm (Altschul *et al.*, 1990), servicio ofrecido por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (siglas en inglés NCBI). Las secuencias se alinearon y compararon con el software bioinformático Mega 7.0. Para la elaboración de los respectivos árboles filogenéticos se utilizó el mismo software.

5.9 Evaluación de fungicidas *in vitro*

5.9.1 Aislados

Se evaluó el aislado obtenido de árboles de *Ficus benjamina* con síntomas de muerte descendente.

5.9.2 Fungicidas

Se evaluó la efectividad biológica *in vitro* de tres fungicidas preventivos (contacto) y cinco curativos (sistémico).

Cuadro 6. Fungicidas evaluados *in vitro* para la inhibición de crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de ramas de *Ficus benjamina* con síntomas de muerte descendente.

Ingrediente activo	Nombre comercial		Modo de acción	Grupo químico	Formulación	Dosis (100 mL)
Tebuconazole	Folicur® EW	250	Sistémico	Triazoles	EW	150 µL 300 µL 600 µL
Cyprodinil + Fludioxinil	Switch®		Sistémico	Anilinoimidazoles/ Phenylpyroles	WG	0.125 g 0.25 g 0.5 g
Pyraclostrobin + Boscalid	Cabrio C®		Sistémico	Methoxycarbamatos/ Pyridinecarboxamidas	WG	0.4 g 0.8 g 1.6 g
Procloraz	Sportak® 45 CE		Sistémico	DMI- Imidazoles	EC	0.5 mL 1 mL 2 mL
Difeconazole	Score® 250 EC		Sistémico	Triazoles	EC	62.5 µL 125 µL 250 µL
Captan	Inter Captan® 50 ph		Contacto	Phthalamidas	WP	0.187 g 0.375 g 0.75 g
Mancozeb	Manzate® 200		Contacto	Dithiocarbamatos	WP	0.125 g 0.25 g 0.50 g
Clorotalonil	Trevanil® 75 ph		Contacto	Cloronitrilos	WP	0.125 g 0.25 g 0.5 g

EW=emulsión aceite en agua, WG= Granulo dispersable en agua, EC= Concentrado emulsionable, WP= polvo humectable.

5.9.3 Preparación de medio de cultivo con fungicida

Se preparó medio de cultivo PDA en matraces de dos litros y se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos, cuando el medio disminuyó su temperatura a 50 °C aproximadamente se procedió a vaciar en matraces de 250 mL previamente esterilizados con el fin de preparar solo 100 mL de medio con fungicida por cada dosis. Se pesaron previamente los fungicidas en polvo y los líquidos se midieron con una micropipeta para posteriormente mezclarlos con el medio y se vaciaron en cajas Petri. De cada fungicida se evaluaron tres dosis, alta, media y baja, siendo la dosis media (X) la recomendada por el formulador, la dosis alta fue 2X y la baja ½ X. Posteriormente en cada caja petri previamente etiquetadas, se colocó en el centro un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio y/o conidios del aislamiento, el cual fue obtenido de una colonia en crecimiento activo de 8 días de edad. Como testigo se utilizó cajas Petri con medio de cultivo PDA sin fungicida. Se utilizó un diseño completamente al azar con 25 tratamientos y cinco repeticiones, donde la unidad experimental fue una caja Petri. El diámetro de la colonia se midió con un vernier a los tres y 10 días después.

5.9.4 Análisis de datos

Con el diámetro de crecimiento de la colonia de cada tratamiento y la del testigo se calculó la eficacia de inhibición del crecimiento colonial de cada producto a través de la fórmula de Abbott (Abbott, 1925).

$$ET = \frac{Dt - Dx}{Dt} \times 100$$

ET=Eficacia de tratamiento

Dt=Diámetro en el testigo

Dx=Diámetro en cada tratamiento

Los datos fueron sometidos a análisis de varianza (ANOVA) usando SAS (Statistical Analysis System, versión 9.0). Las medias de cada tratamiento se compararon utilizando la prueba no paramétrica del rango estudentizado de Tukey (HSD) con diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Descripción de síntomas de la enfermedad

En los árboles muestreados se observó ramas de aspecto normal, ramas con secamiento el cual iniciaba en el ápice y avanzaba hacia la base, lo cual se conoce como muerte descendente (Figuras 2A y 2B). Estas ramas mostraron haces vasculares necrosados (Figura 2C). En estado avanzado de muerte descendente, los árboles presentaron síntomas de defoliación parcial o total y secamiento parcial o total de sus ramas (Figura 2D), lo que coincide con Varela *et al.* (2013) quienes describen al género *Lasiodiplodia* como el agente causal de la muerte de plantas de naranjo agrio injertadas con diferentes especies de cítricos en viveros, así como la muerte de ramas en árboles de limón mexicano y de la pudrición del pedúnculo en frutos de naranja. Por su parte Valle *et al.* (2019) también reporta tres especies de dicho género causando muerte descendente y gomosis en Lima persa. Por otro lado, Al-Sadi *et al.* (2013) asocian a *L. theobromae* con la muerte regresiva y gomosis en mango y lima agria y mencionan también síntoma de necrosis de raíz en palma datilera. Los resultados de Rodríguez *et al.* (2010) concluyen que *L. theobromae* está presente en ramas, tallos y pedúnculos de mango con síntomas de muerte descendente al igual que Ismail *et al.* (2012), sin embargo, este último asocia a *L. pseudotheobromae* y *L. egyptiaca* causando el mismo síntoma.

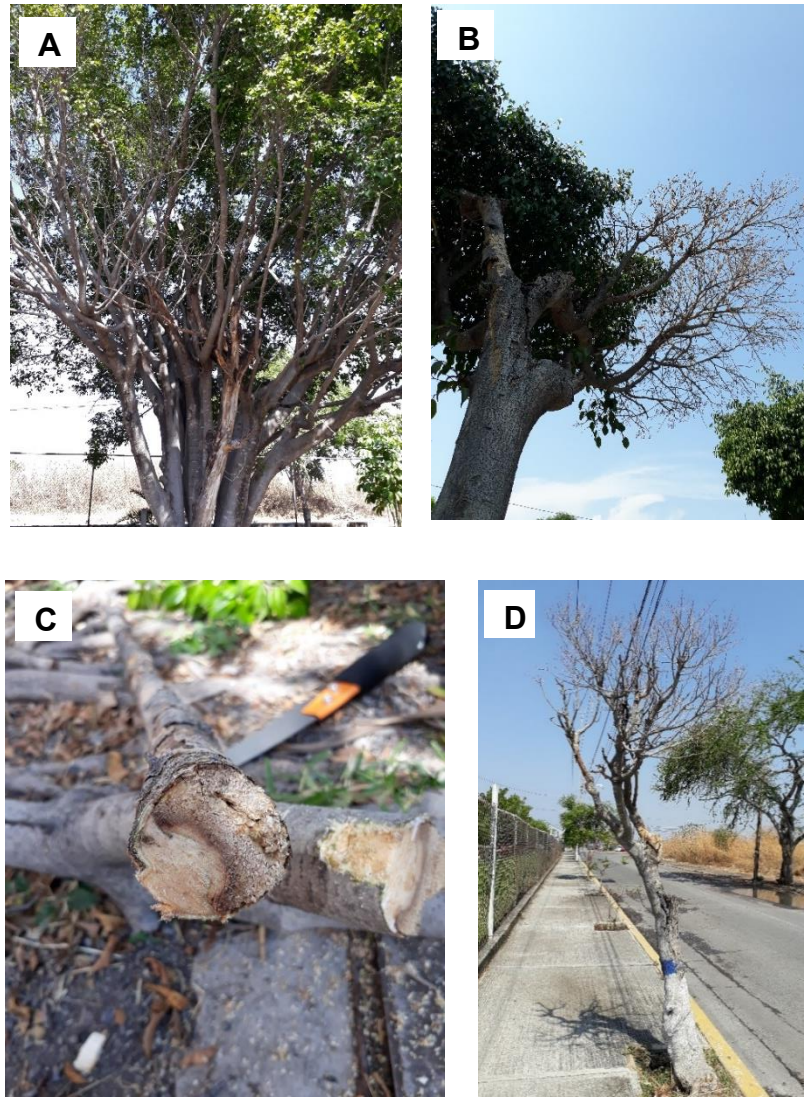


Figura 2. Síntomas de muerte descendente en árboles de *Ficus benjamina*. **A), B)** Ramas con muerte descendente. **C)** Haces vasculares necrosados. **D)** Árbol con síntoma de secamiento y defoliación total.

6.2 Índice de severidad de daño.

Con base a la evaluación realizada y la escala de severidad utilizada, se encontró que el 60 % de los árboles se encuentran aparentemente sanos, 30 % se encuentran en una escala de severidad 1, 8% en una escala de severidad 2, 1 % en una escala de severidad 3 y un 1 % más se encuentra totalmente dañado o muerto, es decir en escala

de severidad 4. Esto confirma que la incidencia de la enfermedad aun no alcanza el 50%, sin embargo, el 39% de los árboles muestreados ya presentan algún síntoma de la enfermedad. Estos resultados coinciden con los reportes previos de Salazar (2017), quien menciona una alta incidencia de la enfermedad en distintas especies del género *Ficus* en el estado de Morelos, sin embargo, contrario a este estudio, dicho autor asocia a la muerte descendente a *Phytophthora* sp., *Ganoderma* sp., *Verticillium* sp., *Fusarium* spp. y *Phellinus* spp.

6.3 Coloración

De los 700 árboles muestreados, 449 presentaron un color verde opaco y poco luminoso, 217 un color amarillo verdoso opaco y luminoso y por último 84 un color amarillo opaco y luminoso y se obtuvieron valores de L, C, H promedios como se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Parámetros de color presentados en hojas de árboles evaluados de *Ficus benjamina*.

L	C	H	Color
62.49-74.33	41.36-50.45	64.56-94.99	naranja-amarillo, opaco, luminoso
55.63-62.44	36.14-41.2	95.02-99.73	amarillo-verdoso, opaco, luminoso
12.63-55.56	7.53-36.01	100.4-126.1	verde, opaco, poco luminoso

LCH: Luminosidad, Cromaticidad, Hue.

El resultado del presente estudio concuerda con lo descrito por García, *et al.* (2017), quien presenta valores promedio de 42.24 a 73.90 para L, de 27.78 a 49.26 para C, y de 97.70 a 121.36 para H, en la coloración de frutos de limón persa, que va del tono verde oscuro al verde amarillento en la etapa de mayor maduración. La misma autora menciona que los valores de luminosidad aumentaron de la calidad extra a la calidad B

lo cual explica la tendencia a colores más claros, en este caso el amarillo. La cromaticidad fue en aumento al disminuir la calidad, y en contraste el tono disminuyó del verde oscuro en la calidad extra a un amarillo verdoso en la calidad B, en limón persa. Dicha tendencia fue la misma que se observó en hojas de *Ficus benjamina* ya que entre mayor era el índice de severidad de daño, la senescencia de la hoja aumentaba y esto provocaba la pérdida de la coloración verde oscuro.

6.4 Correlación de contenido relativo de clorofila con índice de severidad de daño.

De manera general los datos demuestran que hay una correlación negativa entre el contenido relativo de clorofila y la severidad, es decir que a mayor cantidad de clorofila menor la severidad (Cuadro 8). Aunque esta correlación es baja, el valor de la significancia es alta, por lo que se concluye que si hay correlación según datos comparados con Solorzano *et al.* (2015).

Cuadro 8. Correlación estadística entre contenido relativo de clorofila e índice de severidad de daño.

Variable	Ubicación	Coefficiente de Correlación
Clorofila X Severidad	Angustias de Calleja	-0.62***
Clorofila X Severidad	Aquiles Serdán	-0.67***
Clorofila X Severidad	Dr. Parres	N.S.
Clorofila X Severidad	ESSUX	-0.67***
Clorofila X Severidad	Gabriel Tepepa	-0.33**
Clorofila X Severidad	Insurgentes	-0.27**
Clorofila X Severidad	Morelos	-0.24*
Clorofila X Severidad	Peñon	N.S
Clorofila X Severidad	Reforma	-0.54***
Clorofila X Severidad	Tetecala	-0.35*
Clorofila X Severidad	Virginia HDZ	-0.56**
Clorofila X Severidad	Independiente de la ubicación	-0.44***

*, **, ***: Correlación significativa para $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.0001$, respectivamente. N.S.: No significativo

6.5 Porcentaje de árboles plagados y enfermos

Se encontró que el 100 % de los árboles están afectados por Trips y el 39% de estos se encuentran además enfermos. El trips de *Ficus benjamina* es un trips relativamente grande, se asemeja y está estrechamente relacionado al trips del laurel cubano, *Gynaikothrips ficorum*. Mound *et al.* (1995), Mound y Marullo (1996), sugieren que ambas especies son nativas del sudeste asiático y que ambos habitan agallas de las hojas en más de una especie de *Ficus*, además pueden coexistir en la misma agalla de las hojas. Mound y colaboradores (1995), reportan que *G. uzeli* es el inductor primario de agallas (es decir, agallas de las hojas dobladas) en *F. benjamina*, mientras que *G. ficorum* es el inductor primario de agallas de las hojas enrolladas en *Ficus microcarpa* L., mientras que Held y Boyd (2008) mencionan que *Gynaikothrips uzeli* se alimenta de especies de plantas no relacionadas con *Ficus*, pero *F. benjamina* es el único huésped conocido en el que *G. uzeli* puede completar con éxito su ciclo de vida. Por su parte Narrea *et al.* (2013) confirman la alta especificidad de *Gynaikothrips uzeli* y *G. ficorum* hacia *F. benjamina* y *F. microcarpa*, respectivamente. Por otro lado, Denmark (1967) menciona que *Gynaikothrips ficorum* es pantropical, apareciendo donde *Ficus microcarpa* L. está plantado, este es registrado desde Argelia, Canarias, Colombia, Cuba, República Dominicana, Guam, Taiwán, Ecuador, India, Java, México, Nassau (Bahamas), Nicaragua, Israel, Palestina, Panamá, Puerto Rico, El Salvador, Tailandia, España, Sicilia y los Estados Unidos. En los Estados Unidos, se registra desde California, Florida, Hawái y Texas. Una vez que se estableció en Florida, *Gynaikothrips uzeli* se extendió rápidamente en *Ficus benjamina* L. procedente de viveros en el sur de Florida (Held *et al.*, 2005). Ha sido reportado de 10 estados en los Estados Unidos continentales: Hawai, Puerto Rico, Trinidad, México, Colombia, Argentina y Costa Rica (Cabrera *et al.*, 2008; Held y Boyd, 2008; Borbon y Agostini, 2011). De tal forma y considerando la amplia distribución de ambas especies, es muy probable que sean estas las que se encuentran afectando los árboles de *Ficus benjamina* muestreados en el presente estudio.

6.6 Pruebas de patogenicidad

A los 30 días de la inoculación, se observó un leve amarillento en los árboles y la formación de picnidios en la herida realizada para la inoculación, sin embargo, a los 45

días se encontró agrietamiento de corteza y la lesión necrótica en forma descendente midió de 40.54 a 74.37 mm, con un promedio de 58.46 mm. La lesión no se presentó en el testigo (Figura 3A, 3C).



Figura 3. Prueba de patogenicidad realizada en árboles de *Ficus benjamina*. **A)** Lesión en tallo **B)** Medición de la lesión. **C)** Testigo sin lesión

Los resultados del presente estudio se asemejan a los reportados por Ismail *et al.* (2012) quien menciona que seis semanas después de la inoculación de cepas de *Lasiodiplodia* en árboles de mango, observó lesiones de corteza necrótica de color marrón alrededor de los sitios de inoculación que se extienden hacia arriba y hacia abajo, lo que conduce a la marchitez y el secado de las hojas apicales y terminales, y observó al igual que en el presente estudio agrietamiento de la corteza del tallo y estructuras fungosas (picnidios estromáticos y micelio) en las lesiones necróticas alrededor de los sitios de inoculación. El mismo autor reporta que *L. teobromae* produjo una lesión de corteza de 56.5 mm, lesión de cambium de 60.7 mm de longitud, medidas muy similares a las obtenidas en el presente estudio. Valle *et al.* (2019) observó síntomas de clorosis en hojas, muerte descendente de ramas primarias y secundarias, la formación de canchales y exudados gomosos a los 22 días después de la inoculación en plantas certificadas de lima persa, confirmándose que las especies del género *Lasiodiplodia* son capaces de ocasionar muerte descendente.

6.7 Descripción morfológica

Del primero al tercer día las colonias desarrollaron abundante micelio algodonoso de color blanco-grisáceo, aéreo y de rápido crecimiento (Figura 4 A), posteriormente se tornó gris oliváceo; en el centro de la caja Petri se observó denso y de color gris oscuro (Figura 4 B). A partir de los ocho días el micelio se comenzó a tornar negro en toda la caja y a partir de los 16 días se observaron estructuras de reproducción (Conidios picnidiales) (Figuras 4 C y D). Dichas características coinciden con lo descrito por Sandoval *et al.* (2013), Alves *et al.* (2008) y Phillips *et al.* (2013).

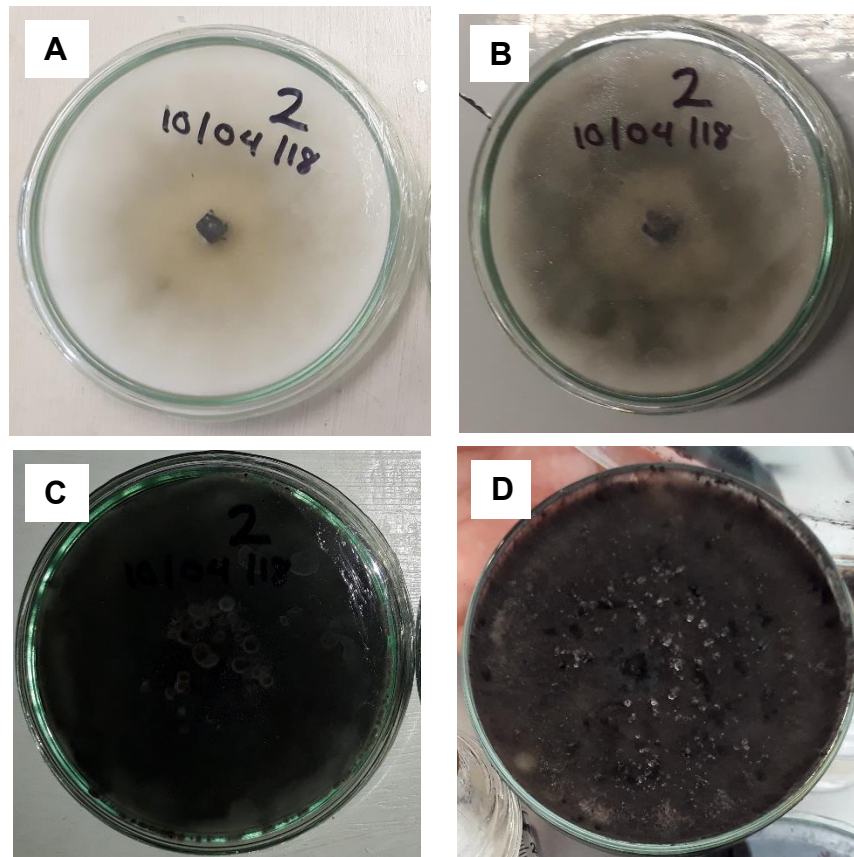


Figura 4. Cultivo en medio PDA de *Lasiodiplodia theobromae* aislado de ramas de *Ficus benjamina* con síntomas de muerte descendente. **A)** Crecimiento de cuatro días. **B)** Crecimiento de ocho días. **C)** y **D)** Crecimiento de 20 días con presencia de picnidios.

6.8 Morfología de estructuras reproductivas de *L. theobromae*

El hongo presenta conidiomas picnidiales producidos en estroma, semi-inmersos, dispersos, simples o compuestos y en agregados; picnidios negros, piriformes y ostiolados. Paráfisis hialinos, cilíndricos y aseptados de 35.55-76.97 x 1.08-2.98 μm (55.16 x 1.87 μm en promedio) (Figura 5 C). Después de 20 días, se observaron conidios inmaduros sin septos (amerosporas) hialinos, subovoides a elipsoidales, con pared gruesa y citoplasma granulado (Figura 5 A), con un tamaño de 15.27-22.09 x 8.22-13.19 μm (18.70 x 10.86 μm promedio de 100 esporas). Los conidios maduros presentaron un septo (didimosporas) de color café oscuro, elipsoidales a ovoides, con estriaciones longitudinales irregulares, con medidas de 17.25-24.51 x 9.22-13.98 μm (20.26 x 12.30 μm promedio de 100 esporas) (Figura 5 B). Estas últimas entran dentro del rango de reportes previos hechos para esta especie por Alves *et al.* (2008), Burgess *et al.* (2006), Pavlic *et al.* (2004) y Sandoval *et al.* (2013).

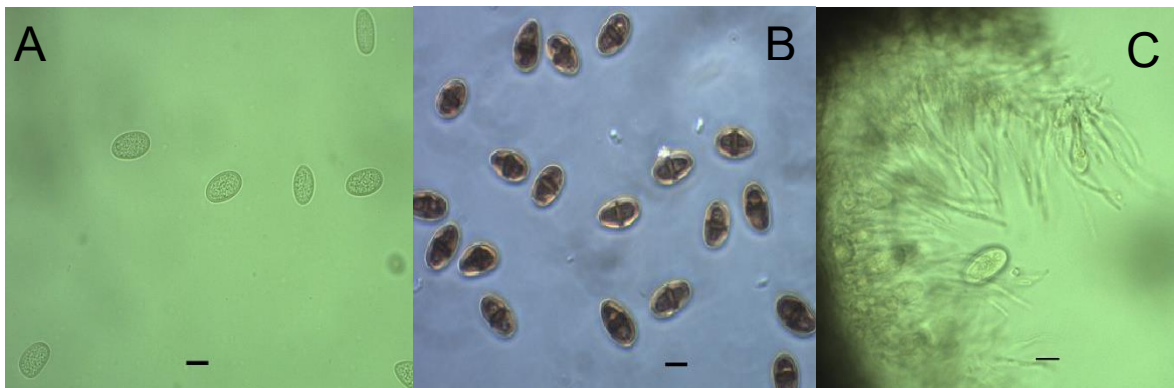


Figura 5. *Lasiodiplodia theobromae*. **A)** Conidios inmaduros (Amerosporas). **B)** Conidios maduros (Didimosporas). **C)** Paráfisis hialinos, aseptados. Barra de escala = 10 μm .

6.9 Identificación molecular

6.9.1 Análisis filogenético del gen 18S

Con los iniciadores utilizados NS1 y Fun se obtuvieron amplicones de 1000 pares de bases (pb). Los resultados del BLAST confirmaron que los tres aislamientos secuenciados MML-2, MML-3 y MML-4 con números de acceso en el GenBank de

MN493113, MN493114, MN493115 respectivamente, identificaron como *Lasiodiplodia theobromae* y se reveló un 99% de identidad.

Con base en esto se realizó el siguiente árbol filogenético:

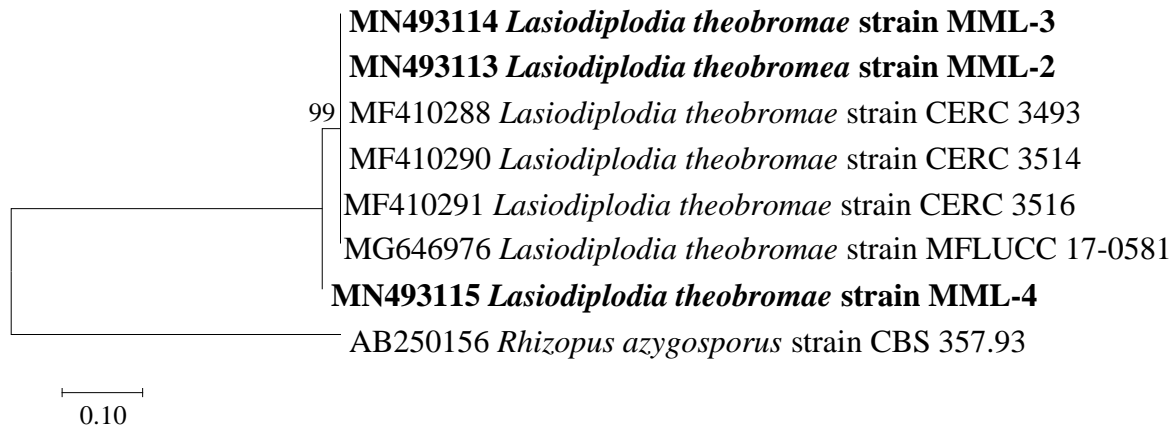


Figura 6. Análisis filogenético de la subunidad ribosomal 18S de diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae*. La especie *Rhizopus azygosporus* se utilizó como grupo externo (método Jukes-Cantor, 1969).

6.9.2 Análisis filogenético del gen endógeno del factor de elongación de la traducción 1-alfa.

Utilizando los iniciadores EF1-728F y EF1-986R, el amplicon obtenido fue de 300 pb aproximadamente lo que concuerda con lo reportado por Burgess *et al.* (2006). Los resultados del BLAST confirmaron que los tres aislamientos secuenciados MML-2, MML-3 y MML-4 con números de acceso en el GenBank de MN433924, MN433925, MN433926 respectivamente se identificaron como *Lasiodiplodia theobromae*.

Con base en lo anterior, se realizó el siguiente árbol filogenético:

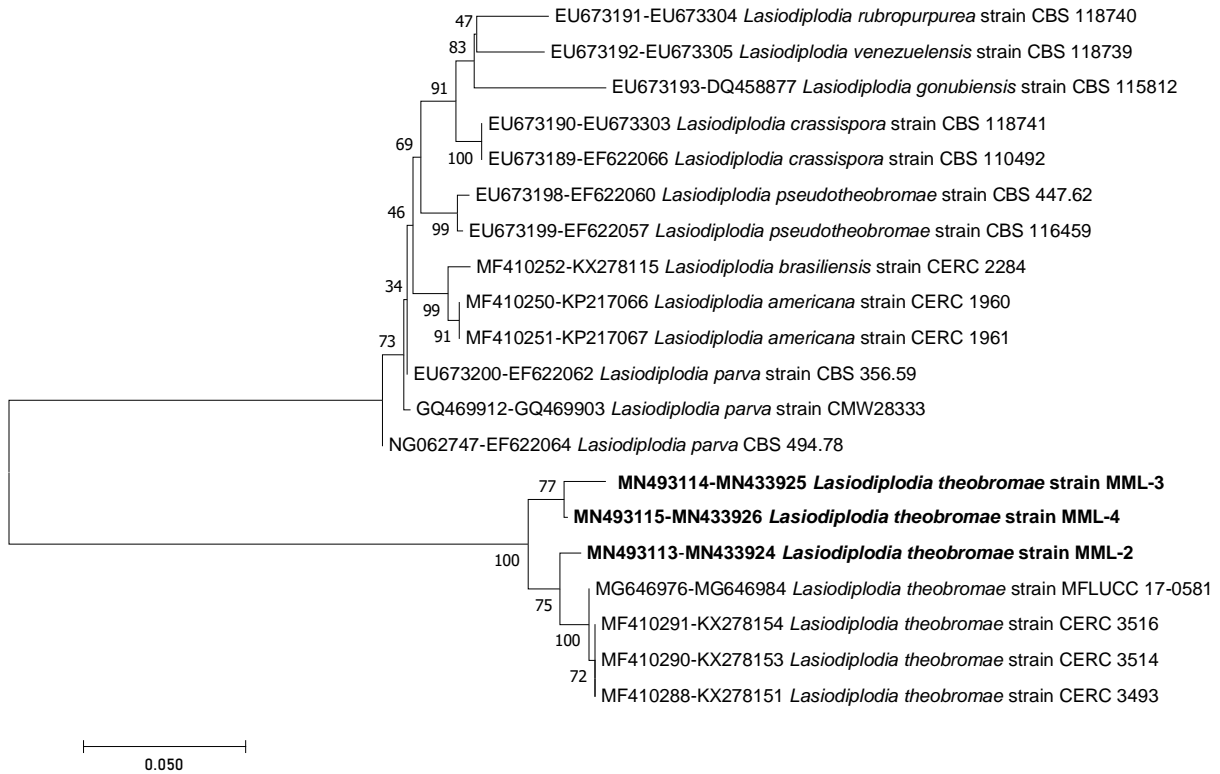


Figura 7. Árbol filogenético de comparación evolutiva obtenido a partir del análisis de los genes 18S ribosomal y EF-1 alfa de diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae*.

La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987). El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados agrupados en la prueba de arranque (1000 repeticiones) se muestran junto a las ramas (Felsenstein, 1985). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de probabilidad máxima compuesta (Tamura and Kumar, 2004) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA X (Kumar *et al.*, 2018).

Las cepas de esta investigación fueron comparadas con ocho cepas de *Lasiodiplodia* obtenidas del Gen Bank, lo cual las agrupó en un solo clado como *Lasiodiplodia theobromae*, coincidiendo con los resultados previos para esta especie de Alves *et al.* (2008) y Burgess *et al.* (2006).

Entre las especies estudiadas de *Lasiodiplodia*, este análisis mostró que este patógeno corresponde a *L. theobromae*, y que es la responsable de causar la muerte descendente en los árboles de *Ficus benjamina* en el oriente del estado de Morelos. Esam (2017) por su parte también reporta en su análisis filogenético utilizando los mismos iniciadores a *Lasiodiplodia theobromae* como agente causal enfermedad de muerte en los árboles de mango en Emiratos Árabes Unidos.

6.10 Evaluación de fungicidas *in vitro*

La combinación formulada de Cyprodinil + Fludioxinil, Mancozeb y Tebuconazole fueron los fungicidas más efectivos para reducir el crecimiento micelial en un 100% hasta el tercer día cuando el testigo lleno la caja, indistintamente de la dosis. Le siguió Difeconazole a dosis alta con 92 % de eficacia, Captan a dosis media y alta con 90% de eficacia. Sin embargo, en la evaluación realizada a los 10 días solo se mantuvo la mezcla de Cyprodinil + Fludioxinil y el Tebuconazole con un 100% de eficacia. De manera similar, Wang *et al.* (2007) encontraron que Cyprodinil + Fludioxinil, Tebuconazole y Procloraz mostraron el mejor efecto inhibitorio del crecimiento micelial de *L. theobromae* aislados de papaya. Por su parte Bester *et al.* (2007) reporta también al Tebuconazole como más efectivo *in vitro*. Por otro lado, Tovar *et al.* (2013) mencionan que Cyprodinil + Fludioxinil, Pyraclostrobin + Boscalid, Procloraz y Tebuconazole mostraron una alta efectividad contra *L. theobromae*, siendo la mezcla de Cyprodinil + Fludioxinil el fungicida más efectivo en la reducción de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae in vitro*. Los resultados de esta investigación coinciden con este último reporte a excepción de Pyraclostrobin + Boscalid quien solo mostro una efectividad de 67, 65 y 77 % a dosis baja, media y alta respectivamente.

Cuadro 9. Valores de la Inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *L. theobromae* en medio de cultivo PDA, mediante fungicidas que representan diferentes grupos químicos 72 horas después de la siembra.

Fungicida	Dosis (100 mL)	Diámetro de colonia (mm)	
		Media	Grupo estadístico
Testigo absoluto		83	A
Clorotalonil	0.125 g	57.036	B
Clorotalonil	0.25 g	50.256	B
Clorotalonil	0.5 g	43.06	C
Pyraclostrobin + Boscalid	0.8 g	28.558	D
Pyraclostrobin + Boscalid	0.4 g	26.91	D
Captan	0.187 g	23.212	D E
Pyraclostrobin + Boscalid	1.6 g	18.832	E
Difeconazole	62.5 µL	16.42	E F
Procloraz	1 mL	9.862	G F
Procloraz	2 mL	9.772	G F
Difeconazole	125 µL	9.632	G F
Procloraz	0.5 mL	9.258	G
Captan	0.375 g	7.656	G
Captan	0.75 g	6.924	G H
Difeconazole	250 µL	6.1	G H
Mancozeb	0.125 g	0	H
Mancozeb	0.25 g	0	H
Mancozeb	0.50 g	0	H
Cyprodinil+ Fludioxinil	0.125 g	0	H
Cyprodinil+ Fludioxinil	0.25 g	0	H
Cyprodinil+ Fludioxinil	0.5 g	0	H
Tebuconazole	150 µL	0	H
Tebuconazole	300 µL	0	H
Tebuconazole	600 µL	0	H

Medidas con letras iguales entre columnas con estadísticamente iguales.

La mezcla formulada de Cyprodinil + Fludioxinil y el Tebuconazole fueron los fungicidas más efectivos para reducir el crecimiento micelial tanto a los tres como a los 10 días de incubación. Mancozeb, Difeconazole, Captan y Procloraz mostraron alta efectividad contra *L. theobromae* a los tres días de evaluación, sin embargo, a los 10 días hubo crecimiento micelial, lo cual indica la pérdida de efectividad de estos fungicidas. Por su parte Esam *et al.* (2017) coincide con estos resultados al reportar que difenoconazole inhibe el crecimiento micelial y esporulación de *Lasiodiplodia theobromae* *in vitro* en un 77% a una concentración alta. Además, sugiere que difenoconazole + cyflufenamid es el fungicida sistémico más eficaz inhibiendo el crecimiento de este patógeno incluso a bajas concentraciones. Dicho fungicida no fue incluido en el presente estudio.

Cuadro 10. Valores de la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *L. theobromae* en medio de cultivo PDA, mediante fungicidas que representan diferentes grupos químicos 10 días después de la siembra.

Fungicida	Dosis (100 mL)	Diámetro de colonia (mm)	
		Media	Grupo estadístico
Testigo absoluto		83	A
Clorotalonil	0.25 g	77.21	A B
Clorotalonil	0.125 g	76.558	A B
Clorotalonil	0.5 g	73.018	B
Captan	0.187 g	61.98	C
Captan	0.375 g	52.12	D
Mancozeb	0.125 g	51.578	D
Difeconazole	62.5 µL	47.894	D
Pyraclostrobin + boscalid	0.8 g	47.822	D
Mancozeb	0.50 g	37.276	E
Mancozeb	0.25 g	36.922	E
Captan	0.75 g	35.77	E
Pyraclostrobin + boscalid	1.6 g	31.698	E
Pyraclostrobin + boscalid	0.4 g	31.342	E
Difeconazole	125 µL	29.422	E
Procloraz	2 mL	20.024	F
Procloraz	0.5 mL	19.386	F
Difeconazole	250 µL	18.798	F
Procloraz	1 mL	17.206	F
Cyprodinil+ fludioxinil	0.125 g	0	G
Cyprodinil+ fludioxinil	0.25 g	0	G
Cyprodinil+ fludioxinil	0.5 g	0	G
Tebuconazole	150 µL	0	G
Tebuconazole	300 µL	0	G
Tebuconazole	600 µL	0	G

Medidas con letras iguales entre columnas con estadísticamente iguales

7 CONCLUSIONES

La frecuencia de aislamientos, las identificación morfológica y molecular, análisis filogenético y pruebas de patogenicidad confirmaron que el agente causal de la muerte descendente de *Ficus benjamina* en el oriente del estado de Morelos corresponde a *Lasiodiplodia theobromae*.

Con base al muestreo realizado se determinó que la muerte descendente de *Ficus benjamina* presenta 40% de incidencia y un índice de severidad 1 a 4 en el total de árboles muestreados en el oriente del estado de Morelos.

La mezcla formulada de Cyprodinil + Fludioxinil y Tebuconazole fueron los fungicidas más efectivos para reducir el crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* *in vitro* en un 100%. Sin embargo, se recomienda evaluarlos en campo para confirmar su eficacia.

8 LITERATURA CITADA

- Abbot, W. S. 1925. A method for computing the effectiveness of the insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265-267.
- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi, G. E., Zare, R. and Phillips, A.J.L. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25:1-10.
- Alanís-Flores, G. J. 2005. El arbolado urbano en el área metropolitana de Monterrey. *Ciencia* 8(1):20-32.
- Al-Sadi, A. M., Al-Wehaibi, A. N., Al-Shariqi, R. M., Al-Hammadi, M. S., Al-Hosni, I. A., Al-Mahmooli, I. H., and 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*. 97:1363-1369.
- Álvarez, M.G. 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71: 169 p.
- Alvidrez-Villarreal, R., Hernández-Castillo, F.D., García-Martínez, O., Mendoza-Villarreal, R., Rodríguez-Herrera, R., Aguilar, C.N. 2012. Isolation and pathogenicity of fungi associated to ambrosia borer (*Euplatypus segnis*) found injuring pecan (*Carya illinoensis*) wood. *Agricultural Sciences* 3:405-416.
- Alexopoulos, C.J. 1985. *Introducción a la Micología*, Editorial Universitaria de Buenos Aires. 615 p.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410.
- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A. and Phillips, A.J.L. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1-13.

- Barnett, L.H., Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Bautista, B.S. S., Díaz, P.J.C., Barrera, N.L. 2002. Postharvest fungal rots of sapote mamey, *Pouteria sapota* (Jacq.) H.E. More & Stearn. Postharvest Biology and Technology 24:197-200.
- Becerra, L. 1995. Enfermedades del cultivo de mango. La producción de mango en México. Editorial Limusa. México. p: 83-101
- Bester, W., Crous, P.W., Fourie, P.H. 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. Australian Plant Pathology 36:73-77.
- Berg, C.C. and Corner, E.J.H. 2005. Moraceae - Ficus. Flora Malesiana Series I (Seed Plants), 17: 1-730.
- Britton, K.O., Hendrix, F.F., Pusey, P.L., Okie, W.R., Reilly, C.C., Daniell, J.W. 1990. Evaluating the reaction of peach cultivars to infection by three *Botryosphaeria* species. Hortscience 25: 468-470.
- Burgess, T.I., Barber, P.A., Mohali, S., Pegg, G., De Beer, W. and Wingfield, M.J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. Mycologia 98: 423-435.
- Brown, G.E. and Hendrix, F.F. 1981. Pathogenicity and histopathology of *Botryosphaeria dothidea* on apple stems. Phytopathology 71: 375-379.
- Canales, C.R. 1998. Tecnología para la producción temprana de mango. 1 ed. Comité Editorial del Campo Experimental Edzná. 12 p.
- Canales, C.R. 2007. Control de la necrosis en frutos de marañón, *Anacardium occidentale*, en la península de Yucatán. Reporte anual de investigación e innovación tecnológica INIFAP. http://utep.inifap.gob.mx/tecnologias_agricolas.php (consulta, mayo 2014).

- Carauta, P.P.J., Díaz, B.E. 2002. Figueiras no Brasil. Editora Universidade Federal do Rio de Janeiro. 211 p.
- Carbone, I. and Kohn, L.M. 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia* 91:553-556.
- Cardoso, J.E., Vidal, J.C., Santos, A.A., Freire, F.C.O., Viana, F.M.P. 2002. First report of black branch dieback of cashew caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Brazil. *Plant Disease* 86: 558.
- Cedeño, L. y Palacios, P. E. 1992. Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causa de las lesiones y gomosis en cítricos. *Fitopatología Venezuela* 5: 10–13.
- Cedeño, L., Carrero, C., Mohali, S., Palacios, P. E., Quintero, K. 1995. Muerte regresiva en parchita causada por *Lasiodiplodia theobromae* en Venezuela. *Fitopatología Venezuela* 8: 11–14.
- Cedeño, L., Mohali, S., Palacios, P. E. 1996. Ultrastructure of *Lasiodiplodia theobromae* causal agent of Caribbean pine blue stain in Venezuela. *Interciencia* 21: 264–271.
- Chaudhary, L.B., Sudhakar, J.V., Kumar, A., Bajpai, O., Tiwari, R. & Murthy, G.V.S. 2012. Synopsis of the genus *Ficus* L. (Moraceae) in India. *Taiwania* 57(2): 193-216.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F.O., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P. and Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55:235-253.
- Da Silva, P.A.V., Martins, R.B., Michereff, S.J., Da Silva, B.M., Câmara, P.S.M. 2012. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal Plant Pathology* 132:489-498.
- Damm, U., Crous, P.W and Fourie, P.H. 2007. *Botryosphaeriaceae* as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. *Mycologia* 99:664-680.

- Darvas, J.M. and Kotze, J.M. 1987. Fungi associated with pre- and postharvest diseases of avocado fruit at Westfalia Estate, South Africa. *Phytophylactica* 19: 83-85.
- De Borbon, C.M., Agostini, J.P. 2011. *Gynaikothrips uzeli* (Zimmermann) and *Androthrips ramacahndrai* Karny (Thysanoptera, Phlaeothripidae), first records for Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Cuyo* 43 (1): 253-260.
- De Medeiros, V.M.R., Vichiato, M., Wander, D.P., Lafeá, D.C., De Sousa, P.L., Da Paz, L.M.L. and Prado, E. 2013. Defoliation and progressive death of branches on *Ficus microcarpa* L. trees in the city of Belo Horizonte, Minas Gerais state, Piracicaba 8:17-27.
- Denman, S., Crous, P.W., Taylor, J.E., Kang, J.C., Pascoe, I. and Wingfield, M.J. 2000. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria* and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Studies in Mycology* 45:129-145.
- Denmark, H.A. 1967. Cuban laurel thrips, *Gynaikothrips ficorum*, in Florida. Florida Department of Agriculture. Entomology Circular 59, 1–2.
- Esam, E.S., Arjun, S., Ayah, A., Khawla, A. A., Tahra, S.A., Rabah, I., Khaled, E., Synan, F.A. 2017. Detection and management of mango dieback disease in the United Arab Emirates. *International Journal of Molecular Sciences* 18:1-18.
- Fernández, H.E., Moreno, S.S.F., Rentería, M.M.E., Arratia, C.A.A. y Villar, L. E. 2017. *Neoscytalidium dimidiatum* agente causal de muerte descendente en *Ficus benjamina* L. en México. *Revista Chapingo serie horticultura*. 23: 203-210.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Freire, F.C.O., Bezerra, J. L. 2001. Foliar endophytic fungi of Ceará State (Brazil); a preliminary study. *Summa phytopathologica* 27: 304-308.

- García, L.F.M., Herrera, C., J.A., Pérez, S. J.A., Alatríste, P. I., Contreras, O. A. 2017. Relación entre color y parámetros fisicoquímicos de Limón persa (*Citrus latifolia* T.) del centro de Veracruz, México. *Agroproductividad*. 10:9-14.
- Gómez, J.R., Nieto, A. D., Téliz, O. D., Mora, A.J.A., Martínez, D.M.T and Vargas, H.M. 2009. Evaluación de la calidad e incidencia de hongos en frutos refrigerados de zapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn. *Agrociencia* 43:37-48.
- Held, D.W., Boyd, D. 2008. New records of *Gynaikothrips uzeli* (Zimmerman) (Thysanoptera: Phlaeothripidae) on *Ficus benjamina* in Texas and O'ahu, Hawaii. USA. *PanPacific Entomologist* 84: 77–80.
- Held, D.W., Boyd, D., Lockley, T., Edwards, G.B. 2005. *Gynaikothrips uzeli* (Thysanoptera: Phlaeothripidae) in the southeastern United States: distribution and review of biology. *Florida Entomologist* 88: 538–540.
- Hernández, A.M. 2010. Caracterización cualitativa de frutos de rambután (*Nephelium lappaceum* L.) almacenamiento postcosecha y patógenos asociados. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 50 p.
- Hernández, F.L.M., Gómez, J. R y Andrés, A.J. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, INIFAP. Libro Técnico No. 1. Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 87 p.
- 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* 41:649-660
- Johnson, G.I. Cooke, A.W., Dean, J.R. 1992. Mango stem end rot pathogens- Fruit infection by endophytic colonisation of the inflorescence and pedicel. *Association of Applied Biologists* 120:225-234.
- Jukes, T.H. and Cantor C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro HN, editor, *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132, Academic Press, New York.

- Khanzada, M.A., Lodhi, A.M. and Shahzad, S. 2005. Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of mango decline in Sindh. Pakistan Journal of Botany 37:1023-1030.
- Klingspor, L., & Jalal, S. 2006. Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus spp.* from clinical samples using real-time PCR. Clinical microbiology and infection 12(8): 745-753.
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33:1870-1874.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. and Tamura, K. 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution 35:1547-1549.
- Liu, A., Chen, W. and Li, X. 2005. Changes in the postharvest physiology and lychee fruits latently infected by anthracnose fungus and the biological characteristic of the pathogenic fungus of the disease. Acta Horticulturae 665:365371.
- Lin, Y.H., Chang, J.Y., Liu, E.T., Chao, C.P., Huang, J.W. & Chang, P.F.L. 2009. Development of a molecular marker for specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 4. European Journal of Plant Pathology 123: 353-365.
- Lutchmeah, R.S. 1988. *Lasiodiplodia theobromae* causing fruit rot of *Annona muricata* in Mauritius. Plant Pathology 37:152.
- Martínez, S.C. 2010. Etiología e incidencia de hongos asociados al manchado de cálices de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero, México. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados. Montecillo, Estado de México. 88 p.
- Mendoza, Z.C. 1999. Micología Agrícola: Manual de Prácticas. Universidad Autónoma, Chapingo, Departamento de Parasitología Agrícola, Chapingo, México. p. 16

- Mohali, S. 1993. Estudio histológico de madera de pino caribe con manchado azul causado por *Botryodiplodia theobromae*. Fitopatología Venezuela 6: 14-17.
- Mohali, S., Encinas, O. y Mora, N. 2002. Manchado azul en madera de *Pinus oocarpa* y *Azadirachta indica* en Venezuela. Fitopatología Venezuela 15: 30-32.
- Mohali, S., Burgess, T.I and Wingfield, M.J. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. Forest Pathology 35:385-396.
- Mosqueda, V.R., De los Santos, R.F., Becerra, L.E.N., Cabrera, M., Ortega, Z.D.A y del Angel, P.A.L. 1996. Manual para cultivar mango en la planicie costera del Golfo de México. Campo Experimental Cotaxtla. INIFAP-CIRGOC. Folleto Técnico No. 15. Veracruz, México. 130 p.
- Mound, L. A., Wang, C. L., Okajima, S. 1995. Observations in Taiwan on the identity of the Cuban laurel thrips (Thysanoptera, Phlaeothripidae). Journal of the New York Entomological Society 103:185–190
- Mound, L. A., Marullo, R. 1996. The thrips of Central and South America: an introduction. Memoirs on Entomology International 6:1–488.
- Narrea, C.M., Vergara, C.C., Malpartida, Z.J. 2013. Insectos fitófagos asociados a *Ficus benjamina* L. y a *F. microcarpa* L. (urticales: moraceae) en Lima, Perú. Ecología Aplicada, 12(2): 67-74.
- Naranjo, M.J.D. 2014. Caracterización morfológica y molecular del género *Ganoderma* en zonas protegidas y ciudades del Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agrícolas. 63 p.
- Oliveira, L.S.R., Alves, E. y Oliveira, S.M.A. 2010. Estudos da interação *Lasiodiplodia theobromae* x mangueira caracterização morfológica de isolados do patógeno. Acta Microscopica 19: 221-231
- Ochoa, A.S., Vázquez, M. y Farías, R. 2007. Identificación genético molecular de hongos asociados a la pudrición peduncular del fruto de aguacate en Michoacán, México.

Memorias X Congreso Internacional/ XXXV Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Abs.

Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T.A., Gryzenhout, M. and Wingfield, M.J. 2004. *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new *Botryosphaeria* anamorph from native *Syzygium cordatum* in South Africa. *Studies in Mycology* 50: 313-322.

Pegg, K.G., Coates, L.M., Korsten, L. and Harding, R.M. 2003. Foliar, fruits and soilborne diseases. p. 299-337. In A. W. Whiley AW, Schaffer B and Wolstenholme BN (eds.). *The Avocado: Botany, Production, and Uses*. CABI Publishing, UK. 560 p.

Peterson, R.A., Johnson, G.I., Schipke, L.G. and Cook, A.W. 1991. Chemical control of stem end rot. *Acta Horticulturae* 291: 304-307.

Phillips, A.J.L., Alves, A., Pennycook, S.R., Johnston, P.R., Ramaley, A., Akulov, A. and Crous, P.W. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21: 29-55.

Phillips, A.J.L., Alves, A., Correia, A. and Luque, J. 2005. Two new species of *Botryosphaeria* with brown, 1-septate ascospores and *Dothiorella* anamorphs. *Mycologia* 97: 513-529.

Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. 2013. The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51-167.

Piedra, M.E.M., Ramírez, R.R. e Ibarra, M.G. 2006. El género *Ficus* (Moraceae) en el estado de Morelos, México. *Acta botánica Mexicana* 75: 45-75.

Picos, M.P.A., García, E.R.S., León, F.J., Sañudo, B.A. y Allende, M.R. 2014. *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33(1): 54-74.

Ploetz, R.C. 2003. *Diseases of Tropical Fruit Crops*. CABI Publishing. Wallingford, UK. P. 76-77.

- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. No. 519. Kew, Surrey, UK: Commonwealth Mycological Institute.
- Punithalingam, E. 1980. Plant diseases attributed to *Botryodiplodia theobromae* Pat. J. Cramer, Vaduz. 121 p.
- Queiroz, F., Muniz, M. and Menezes, M. 1997. Podridão da haste do mamoeiro 'Sunrise Solo' causada por *Botryodiplodia theobromae* no Estado de Alagoas. Summa Phytopathologica 23(1):44-45.
- Rebell, G. and Forster, R.K. 1976. *Lasiodiplodia theobromae* as a cause of keratomycoses. Sabouraudia 14: 155-70.
- Rivas, T.D. 2001. Importancia y ambiente de los bosques y árboles urbanos. Universidad Autónoma Chapingo. México. P 29-66.
- Rivas, T.D. 2000. Manual de poda para árboles urbanos. Universidad Autónoma Chapingo. México. 116 p.
- Rodríguez. De O. S., Alves. E., Alves. De O. S. M. 2010. Estudos da interação *Lasiodiplodia theobromae* x mangueira e caracterização morfológica de isolados do patógeno Acta Microscopica Vol. 19(3): 221-231
- Rojo, B.I. 2013. *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum capsici* asociadas a pudrición del pedúnculo y antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. Unidad Culiacán, Culiacán, Sinaloa. 69 p.
- Rondón, A., Hung, G., Reyes, F. y Solorzano, R. 1991. Reacción de patrones cítricos a *Phytophthora nicotianae* B. de Haan. var. *parasitica* (Dastur) Waterh, en condiciones de umbráculo. Revista Agronomía Tropical 43: 03-04.
- Rubini, M.R., Silva, R.R.T., Pomella, A.W., Maki, C.S., Araujo, W.L., Dos Santos, D.R. and Azevedo, J.L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao

- (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis pernicios*a, causal agent of witches' broom disease. International Journal of Biological Sciences 1:24-33
- Saavedra, R. L., Alvarado, R. D., Hernández, de R.P., Martínez, T.T., Mora, A. G. y Villa, C.J. 2016. Condición de copa, indicador de salud en árboles urbanos del bosque San Juan de Aragón, Ciudad de México. Revista Madera y Bosques. 2:15-27.
- Salas, R.A., Murillo, G.O., Murillo, C.R., Ávila, A.C. y Mata, G.X. 2016. Evaluación de la severidad de la pudrición del tronco en *Gmelina arborea* Roxb. Revista forestal Mesoamericana Kurú 2547:5-7.
- Salazar, H.P. 2017. Muerte fulminante del Laurel. Revista de Jardinería Magazine guía completa 18:34-36.
- Sandoval, S.M., Nieto, A.D., Sandoval, I.J.S., Téliz, O.D., Orozco, S.M., Silva, R.H.V. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). Agrociencia 47(1): 61-73.
- Saitou N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4:406-425.
- Saeed, E.E., Sham, A., AbuZarqa, A., Al Shurafa, K.A., Al Naqbi, T.S., Iratni, R., El-Tarabily, K. and AbuQamar, S.F. 2017. Detection and management of mango dieback disease in the United Arab Emirates. Molecular Sciences 18: 2086.
- Sangchote, S., 1991 *Botryodiplodia* stem end rot of mango and its control. Acta Horticulturae 291: 293-303.
- Schoch, C., Shoemaker, R.A., Seifert, K.A., Hambleton, S., Spatafora, J.W. and Crous, P.W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. Mycologia 98: 1041-1052.
- Schomaker, M.E., Zarnoch, S.J., Bechtold, W.A., Latelle, D.J., Burkman, W.G. and Cox, S. M. 2007. Crown-condition classification: A guide to data collection and analysis. (General Technical Report SRS-102) USDA Forest Service. P. 2.

- Serrato, A., Ibarra, M.G. & Oyama, K. 2004. Biogeography and conservation of the genus *Ficus* (Moraceae) in Mexico. *Journal of Biogeography* 31(3): 475-485.
- Slippers, B., Crous, P.W., Denman, S., Coutinho, T.A., Wingfield, B.D. and Wingfield, M.J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia* 96:83-101.
- Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A.J.L., Groenewald, J.Z., Lombard, L., Wingfield, M.J., Postma, A., Burgess, T. and Crous, P.W. 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* 76:31-49.
- Smith, H., Wingfield, M.J., Crous, P.W. and Coutinho, T.A. 1996. *Sphaeropsis sapinea* and *Botryosphaeria dothidea* endophytic in *Pinus* spp. and *Eucalyptus* spp. in South Africa. *South African Journal of Botany* 62: 86-88.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. *Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification*. San Francisco, California: Freeman, 573 p.
- Sivakumar, D., Wijeratnam, R.S.W., Wijesundera, R.L.C. and Abeysekera, M. 1997. Post-harvest diseases of rambutan (*Nephelium lappaceum*) in the western province. *Journal of the National Science Council of Sri Lanka* 25:225-229.
- Solorzano, M.S., Alia, T.I., Rivera, C.F., López, M.V., Pérez, F.L.J., Pelayo, Z.C., Guillén, S.D., Díaz de León, S.F. and Maldonado, A.Y.I. 2015. Quality attributes and functional compounds of Mexican plum (*Spondias purpurea* L) fruit ecotypes. *Fruits* 70(5): 261-270.
- Summerbell, R.C., Kraiden, S., Levine, R. and Fuksa, M. 2004. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. *Medical Mycology* 42: 543-547.

- Tamura, K., Nei, M. and Kumar, S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
- Tovar, P.J.M., Mora, A.J.A., Nava, D.C., Téliz, O.D., Villegas, M.A. y Leyva, M.S.G. 2012. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (jacq.) H.E. Moore and Stearn] grafts in México *Revista Fitotecnia Mexicana* 36 (3): 233-238
- Tucuch, C.F.M., Palacios, P.A., Ku, N.R. y Guzmán, E.C. 2005. Manejo del cultivo de mango en el estado de Campeche. Campo Experimental Edzna, INIFAP. Folleto Técnico. Campeche, Camp., México. 34 p.
- Úrbez, T. J.R., Leavitt, G.M., Guerrero, J.C., Guevara, J. and 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* 92:519-529.
- Valle, de la P. M., Guillén, S. D., Gijón, H. A. R., Alía, T.I., López, M.V., Juárez, L.P., Martínez, F.E., Hernández, A. M., Ariza, F.R. 2019. Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México. *Revista Bio Ciencias* 65:595
- Varela, F.S.E., Orozco, S.M., Torres, A.R.I., Silva, A.G.L. 2013. Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas 428 p.
- Vásquez, 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.
- Van Niekerk, J.M., Crous, P.W., Groenewald, J.Z., Fourie, P.H and Halleen, F. 2004. DNA phylogeny, morphology and pathogenicity of *Botryosphaeria* species on grapevines. *Mycologia* 96:781-798.

- Ventura, J.A., Costa, H. and Tatajiba, J. 2004. Papaya diseases and integrated control. p. 201-268. In: Naqvi SAMH (ed.). Diseases of Fruits and Vegetables: Diagnosis and Management. Volume II. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, United States of America. 704 p.
- Wang, F., Zhao, L., Li, G., Huang, J. and Hsiang, T. 2011. Identification and characterization of *Botryosphaeria spp.* causing gummosis of peach trees in Hubei Province, Central China. Plant Disease 95:1378-1384.
- Wang, H.L. Chen, P.H., Ni, H.F. and Chen, R.S. 2007. Physiological characterization and screen of control chemicals for *Lasiodiplodia theobromae* of papaya. Plant Pathol. Bull. 16:71-77.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., & Taylor, J.L. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications, Academic Press. P. 315-322.

Páginas web

- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (2008) Inventarios forestales. <http://www.fao.org> (noviembre 2017)
- INAFED, Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal de la Secretaría de Gobernación (2016) Enciclopedia de Municipios y Delegaciones de México. <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/.../17006a.html> (mayo 2017)
- ISA Hispana, Sociedad Internacional de Arboricultura (2011) Beneficios de los árboles. <http://www.isahispana.com> (mayo 2017)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 26 de septiembre de 2019.

DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ
DR. VÍCTOR LÓPEZ MARTÍNEZ
DR. IRÁN ALIA TEJACAL
DR. PORFIRIO LÓPEZ JUÁREZ
DR. DANIEL BÁRCENAS SANTANA
COMITÉ REVISOR
P R E S E N T E.

Por medio del presente me complace notificarle que ha sido designado como parte del Comité de tesis que presenta: **ING. MARICELA MARTÍNEZ LÓPEZ**, bajo el título: "**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS *IN VITRO* DEL AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE DESCENDENTE DE *Ficus benjamina* L. EN EL ORIENTE DEL ESTADO DE MORELOS**". Mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ**, que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro** en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural.

Asimismo solicito a Usted me envíe por escrito el resultado de dicha revisión a más tardar en quince días naturales.

Sin más por el momento, agradezco de antemano su valiosa colaboración, y aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

M. en C. VLADIMIR LEZAMA LÓPEZ
Jefe de Programas Educativos de Posgrado
De la Facultad de Ciencias Agropecuarias.

Recibi-
3/oct/2019

Recibi
13/OCT/2019

Recibi
2/octubre/2019

Recibi
02/octubre/2019



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de octubre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **"Identificación morfológica y molecular y sensibilidad a fungicidas *in vitro* del agente causal de la muerte descendente de *Ficus benjamina* L. en el Oriente del Estado de Morelos"**, que presenta: **MARICELA MARTÍNEZ LÓPEZ**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 46, 329 70 00, Ext. 3211 / fagropecuarias@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de octubre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **"Identificación morfológica y molecular y sensibilidad a fungicidas *in vitro* del agente causal de la muerte descendente de *Ficus benjamina* L. en el Oriente del Estado de Morelos"**, que presenta: **MARICELA MARTÍNEZ LÓPEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. IRÁN ALIA TEJACAL
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de octubre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **"Identificación morfológica y molecular y sensibilidad a fungicidas *in vitro* del agente causal de la muerte descendente de *Ficus benjamina* L. en el Oriente del Estado de Morelos"**, que presenta: **MARICELA MARTÍNEZ LÓPEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. VÍCTOR LÓPEZ MARTÍNEZ
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209.
Tel. (777) 329 70 46, 329 70 00, Ext. 3211 / fagropecuarias@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de octubre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: **"Identificación morfológica y molecular y sensibilidad a fungicidas *in vitro* del agente causal de la muerte descendente de *Ficus benjamina* L. en el Oriente del Estado de Morelos"**, que presenta: **MARICELA MARTÍNEZ LÓPEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. PORFIRIO LÓPEZ JUÁREZ
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 11 de octubre de 2019.

MTRO. JESÚS EDUARDO LICEA RESÉNDIZ
DIRECTOR DE LA FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y DESARROLLO RURAL
P R E S E N T E.

Por medio del presente informo a usted que después de revisar el trabajo de tesis titulado: "**Identificación morfológica y molecular y sensibilidad a fungicidas *in vitro* del agente causal de la muerte descendente de *Ficus benjamina* L. en el Oriente del Estado de Morelos**", que presenta: **MARICELA MARTÍNEZ LÓPEZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLÉN SÁNCHEZ**, y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Agropecuarias y Desarrollo Rural**, lo encuentro satisfactorio, por lo que emito mi **VOTO DE APROBACIÓN** para que la alumna continúe con los trámites necesarios para presentar el examen de grado correspondiente.

Sin más por el momento y agradeciendo de antemano su valiosa colaboración, quedo de usted.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia

DR. DANIEL BARCENAS SANTANA
Comité Evaluador

C.i.p. Archivo