



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**MUERTE DESCENDENTE (*Lasiodiplodia* sp.
Pat.) EN LIMA Persa (*Citrus latifolia* Tanaka),
EN EL ESTADO DE MORELOS**

T E S I S

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

**P R E S E N T A:
MAIREL VALLE DE LA PAZ**

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

**CO- DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ADRIANA ROSALIA GUIJÓN HERNÁNDEZ**



Cuernavaca, Morelos. Diciembre del 2018

MUERTE DESCENDENTE (*Lasiodiplodia* sp. Pat.) EN LIMA Persa (*Citrus latifolia* Tanaka), EN EL ESTADO DE MORELOS

Tesis realizada por **M. C. Mairel Valle de la Paz** bajo la dirección del Comité Revisor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
DESARROLLO RURAL**

COMITÉ REVISOR

Director de tesis: _____
Dr. Dagoberto Guillén Sánchez

Co-Directora de tesis: _____
Dra. Adriana R. Guijón Hernández

Asesor: _____
Dr. Irán Alía Tejacal

Asesor: _____
Dr. Víctor López Martínez

Asesor: _____
Dr. Porfirio Juárez López

Asesor: _____
Dr. Edgar Martínez Fernández

Asesor: _____
Dra. Marianguadalupe Hernández Arenas

Asesor: _____
Dr. Rafael Ariza Flores

Cuernavaca Mor., a 25 de Septiembre del 2018.

AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca proporcionada para el desarrollo del programa doctoral.

A la **Facultad de Ciencias Agropecuarias**, y a todo el **Personal administrativo** por brindarme todas las facilidades necesarias para realizar la presente investigación.

Al **Dr. Dagoberto Guillén Sánchez**, por la dirección de la investigación, por sus conocimientos, experiencia, paciencia, por su invaluable amistad y apoyo incondicional durante todo el desarrollo del trabajo en campo y laboratorio.

A los **Doctores: Adriana R. Guijón Hernández, Irán Alía Tejacal, Víctor López Martínez, Porfirio Juárez López, Edgar Martínez Fernández, Marianguadalupe Hernández Arenas y Rafael Ariza Flores**, por su asesoría y valiosos comentarios, para el desarrollo del trabajo de investigación en campo y laboratorio.

Al **M. C. Vladimir Lezama**, por dirigir atinadamente la Coordinación de Postgrado, por siempre brindar la ayuda para todo trámite, por la buena disponibilidad en atender con su sencillez y carisma.

Al **Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos**, a la **Junta Local de Ornamentales**, al **M. C. Pablo Valle, M. C. Manuel Palma** y a todos los **Profesionales técnicos** que apoyaron en los recorridos de campo, por todos los municipios de Morelos, muchas gracias.

A **Daniel Perales Rosas**, por el acompañamiento en el desarrollo del proyecto, por los consejos, por el apoyo incondicional, por todo amor.

A los **productores de lima Persa**, especialmente al **Lic. Trinidad Padilla**, por permitir desarrollar parte de la investigación en su huerta, en Ticumán, Tlaltizapán.

A **mis estudiantes, Ma. Guadalupe, Luis Ángel Bibiano, Verónica Vargas, José Alberto Diaz, Luis Conde, Luy Guadarrama**, que ayudaron a realizar las evaluaciones en campo.

A **Álvaro González Hernández**, por ayudar en las evaluaciones en campo y laboratorio.

Al **Dr. Lalo, M. C. Aline, Dra. Adabella**, por todo el apoyo brindado en el laboratorio, pero además por su hermosa amistad.

DEDICATORIA

A mis hijos: Jamil y Eric

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE CUADROS	v
CAPÍTULO I	1
IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE <i>Lasiodiplodia</i> (BOTRYOSPHAERIACEAE) EN LIMA Persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) EN MORELOS, MÉXICO.....	1
Resumen.....	1
IDENTIFICATION OF <i>Lasiodiplodia</i> (BOTRYOSPHAERIACEAE) SPECIES ON PERSIAN LIME (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) IN THE MORELOS STATE, MEXICO	2
Abstract.....	2
1.1. Introducción	3
1.2. Materiales y métodos.....	5
1.2.1. Lugar del estudio	5
1.2.2. Colecta del material biológico	5
1.2.3. Aislamiento del hongo.....	5
1.2.4. Identificación y caracterización morfológica de los aislados	6
1.2.5. Pruebas de patogenicidad	6
1.2.6. Identificación molecular.....	7
1.2.7. Análisis filogenético	8
1.3. Resultados y discusión	9
1.3.1. Identificación y caracterización morfológica de los aislados	9
1.3.2. Pruebas de patogenicidad	12
1.3.3. Identificación molecular.....	13
1.3.4. Análisis filogenético	15
1.4. Conclusiones	20

1.5. Literatura citada	21
CAPITULO II	26
INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE MUERTE DESCENDENTE (<i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>L. citricola</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> y <i>Lasiodiplodia</i> spp.) (BOTRYOSPHAERIALES: BOTRYOSPHAERIACEAE) EN LIMA Persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) EN MORELOS, MÉXICO	26
Resumen	26
INCIDENCE AND SEVERITY OF DIEBACK (<i>Lasiodiplodia theobromae</i> , <i>L. citricola</i> , <i>L. pseudotheobromae</i> y <i>Lasiodiplodia</i> spp.) (BOTRYOSPHAERIALES: BOTRYOSPHAERIACEAE) IN LIMA Persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) IN MORELOS, MEXICO	27
Abstract	27
2.1. Introducción	28
2.2. Materiales y métodos	30
2.2.1. Ubicación del lugar de estudio	30
2.2.2. Evaluación de la incidencia	30
2.2.3. Evaluación de la severidad	33
2.2.4. Análisis estadístico	34
2.3. Resultados y discusiones	34
2.3.1. Síntomas observados en campo	34
2.3.2. Incidencia	37
2.3.3. Severidad	39
2.4. Conclusiones	47
2.5. Literatura citada	48

CAPÍTULO III	52
CONTROL <i>IN VITRO</i> CON FUNGICIDAS SOBRE <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griff. & Maubl y <i>L. citricola</i> Abdollahz AISLADOS DE LIMA Persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) EN MORELOS, MÉXICO.	52
Resumen.....	52
CONTROL <i>IN VITRO</i> WITH FUNGICIDES ON <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griff. & Maubl and <i>L. citricola</i> Abdollahz ISOLATED FROM LIMA Persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) IN MORELOS, MEXICO.....	53
Abstract.....	53
3.1. Introducción	54
3.2. Materiales y métodos.....	55
3.3. Resultados y Discusión.....	56
3.4. Conclusiones	59
3.5. Literatura citada	60

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. 1. Rama de lima Persa en cámara húmeda (A), cepa aislada de 5 días de edad (B), formación de picnidios después de 7 días en cámara húmeda (C), picnidio y conidio de <i>L. citricola</i> (D) (10X) y corte de picnidio mostrando parafisos, conidio en crecimiento e inmaduro (E) (100X).....	11
Figura 1. 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR obtenidos del ADN ribosomal en los aislamientos de <i>Lasiodiplodia</i> spp, con los cebadores ITS 4 e ITS 5. M (Marcador de PM 2 Kb ladder), carriles 1-16 DNA de muestras obtenidas con crecimiento miceliar y pruebas de patogenicidad banda 500 pb, carril 17. Control interno (Champiñón), carril 18 (Control negativo C ⁻) planta sana, carril 18 (Marcador PM 100 pb ladder).....	14
Figura 1. 3. Árbol filogenético basado en el análisis bayesiano y máxima parsimonia utilizando los primer ITS 5 e ITS 4.....	16
Figura 2. 1. Síntomas característicos de la muerte regresiva en árboles de lima Persa en el Estado de Morelos. A y E) Clase 0: Árbol sano; B y F) Clase 1: Exudaciones de goma; C y G) Clase 2: Agrietamiento visible con exposición de tejidos internos; D y H) Clase 3: Muerte descendente de ramas y cancro bien definido.....	35
Figura 2. 2. Severidad y dispersión de la muerte descendente en lima Persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) en un huerto de Coatlán del Río, Morelos. Mostrando daño en casi todos los árboles evaluados con un promedio de 2.4 de severidad	41
Figura 2. 3. Severidad y dispersión de la muerte descendente en lima Persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) en un huerto del municipio de Puente de Ixtla, Morelos. Mostrando daño en los árboles evaluados con un promedio de 1.6 de severidad.....	42

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.1. Lista de las secuencias ensambladas (ITS5 /ITS4), del producto de PCR, con su número de acceso del GENBANK (NCBI), obtenidas de los 16 aislamientos de tallo, ramas (primarias y secundarias) y raíz de limón Persa (<i>Citrus latifolia</i>) de varios municipios del Estado de Morelos.....	17
Cuadro 2. 1. Huertos de lima Persa en el Estado de Morelos seleccionados para evaluar incidencia y severidad de la muerte regresiva (<i>Lasiodiplodia</i> spp.).....	31
Cuadro 2. 2. Escala utilizada para evaluar la severidad de la muerte descendente en árboles de lima Persa en el estado de Morelos.....	34
Cuadro 2. 3. Comparación de medias de la incidencia y la severidad de la muerte descendente (<i>Lasiodiplodia</i> spp.) en huertos de lima Persa, en el estado de Morelos.....	43
Cuadro 2.4. Porcentaje de Incidencia de la muerte descendente, de los municipios evaluados del estado de Morelos.....	46
Cuadro 2. 5. Porcentaje de la severidad de la muerte descendente, de los municipios evaluados del estado de Morelos.....	46
Cuadro 3. 1. Fungicidas evaluados <i>in vitro</i> sobre <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Lasiodiplodia citricola</i> , aislado de lima Persa (<i>Citrus latifolia</i> Tanaka) con síntomas de gomosis y muerte descendente de las zonas citrícolas de Tlaltizapán y Jantetelco municipios del Estado de Morelos. México.....	57

CAPÍTULO I

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE *Lasiodiplodia* (BOTRYOSPHAERIACEAE) EN LIMA Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) EN MORELOS, MÉXICO.

Resumen

Durante el mes de agosto del 2015 en el estado de Morelos, México, en plantaciones de lima Persa se observaron síntomas de muerte descendente de ramas, gomosis y formación de canchales. Con el propósito de identificar morfológicamente y molecularmente el agente causal, se muestrearon 46 árboles de cinco a ocho años de edad, en 46 huertas de los municipios de Tlaltizapán, Ayala, Coatlán del Río y Jantetelco. Se hicieron aislamientos, pruebas de patogenicidad y caracterización morfológica del patógeno, además se identificaron las especies mediante PCR utilizando los cebadores ITS5 / ITS4 y se construyó un árbol filogenético bayesiano con agrupamiento de clados. Los resultados permitieron diferenciar de 16 aislados, cuatro clados y tres especies, correspondientes al género *Lasiodiplodia*, diferenciándose entre estas a *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*. Las secuencias fueron depositadas en el GenBank, como nuevos reportes de patógenos fúngicos en lima Persa para el Estado de Morelos.

Palabras claves: *Citrus latifolia*; Diagnóstico; Cítricos; Muerte descendente.

IDENTIFICATION OF *Lasiodiplodia* (BOTRYOSPHAERIACEAE) SPECIES ON PERSIAN LIME (*Citrus latifolia* Tanaka) IN THE MORELOS STATE, MEXICO

Abstract

During the month of August 2015 in the state of Morelos, Mexico, in plantations of Persian lime, symptoms of branch dieback, gummosis and canker formation were observed. With the purpose of morphologically and molecularly identifying the causal agent, 46 trees from five to eight years of age were sampled in 46 orchards of the municipalities of Tlaltizapan, Ayala, Coatlan del Rio and Jantetelco. Isolates, pathogenicity tests and morphological characterization of the pathogen were made, and the species were identified by PCR using the ITS5 / ITS4 primers and a Bayesian phylogenetic tree with grouping of clades was constructed. The results allowed to differentiate from 16 isolates, four clades and three species, corresponding to the genus *Lasiodiplodia*, differentiating between these to *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*. The sequences were deposited in the GenBank, as new reports of fungal pathogens in Persian lime for the State of Morelos.

Key words: *Citrus latifolia*; Diagnosis; Citrus; Dieback.

1.1. Introducción

La producción de cítricos en México, en especial de lima Persa (*Citrus latifolia*) se ha orientado al consumo fresco, hoy en día es el líder en la exportación de la fruta a escala mundial (Schwentesi y Gómez, 2005). La producción nacional en el 2016, fue de 5.75 millones de toneladas con un valor de 16,781 millones de pesos, para ese año la superficie sembrada de cítricos fue de 533,749 ha, de las cuales 180,252 ha fueron de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swing), 178,877 ha de toronja (*Citrus paradisi* Macf.) y 335,610 ha de naranja Valencia (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), (SIAP, 2017).

En el estado de Morelos en el 2010 se tenían huertas de cítricos establecidas en 28 de los 33 municipios, con 1000 ha de superficie sembrada, con alta producción y calidad de exportación. Actualmente se cuenta con una superficie establecida de 612 ha, en 17 municipios, donde destaca el limón y la naranja Valencia con 32 y 66 % de la superficie total, y un rendimiento de 12.11 y 7.76 t ha⁻¹ respectivamente, siendo ambas especies las de mayor importancia económica, el resto de la superficie está compuesta por otros cítricos (CESVMOR, 2018; SIAP, 2017).

El Comité de Sanidad Vegetal del estado de Morelos, debido a la baja producción y disminución del área sembrada, recomendaba aplicaciones de fungicidas específicos contra la gomosis, causada por *Phytophthora* spp, debido a la coincidencia de síntomas en los árboles, como la formación de canchales, pudrición de la fruta, gomosis, muerte regresiva y descendente de las ramas, sin embargo, no se lograban resultados satisfactorios. Los síntomas anteriores también son causados por las especies del género *Lasiodiplodia* (Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

El reporte más antiguo encontrado sobre *Lasiodiplodia* spp., fue realizado por Álvarez (1976) afectando el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*). También se ha encontrado causando distintas enfermedades en varios cultivos principalmente frutícolas.

Muñoz *et al.* (2015), reportaron que las especies de *Lasiodiplodia* eran muy comunes en los trópicos, causando varias enfermedades en las plantas, tanto en las etapas de cultivo como en postcosecha y que su actividad celulolítica permitía la penetración y colonización de la planta de manera similar a la de un hongo que causa pudrición blanda, utilizando el almidón y otros sacáridos presentes en el sustrato inicial de la madera. La etiología de esta enfermedad es crucial para estudios epidemiológicos y para una mejor comprensión de la distribución e importancia de este hongo, así como para el establecimiento de estrategias y tratamientos de control efectivo.

La mayoría de las descripciones de este fitopatógeno se han basado en sus características morfológicas y es a partir de la década pasada que se ha complementado la identificación con técnicas de biología molecular. Varela *et al.* (2013), lo describen como el agente causal de la muerte de plantas de naranjo agrio injertadas con diferentes especies de cítricos en viveros, de la muerte de ramas en árboles de limón mexicano, lima persa y de la pudrición del pedúnculo en frutos de naranja.

Estudios realizados por Phillips *et al.* (2013), indican que, debido a la presencia cosmopolita, el amplio número de huéspedes y la variabilidad morfológica de este hongo, existen varias especies crípticas, las cuales están separadas por el tamaño y forma del conidio, afectando las plantaciones citrícolas en México. Por tal motivo el objetivo fundamental del trabajo fue aislar, identificar y diagnosticar molecularmente, el agente causal de la muerte descendente de ramas y gomosis en árboles de lima Persa en el Estado de Morelos.

1.2. Materiales y métodos

1.2.1. Lugar del estudio

El estudio se realizó durante el mes de agosto del 2015, en el estado de Morelos, México, ubicado geográficamente a los 22°51'43" de latitud Norte y 102°36'38" longitud Oeste y a una altura sobre el nivel del mar de 2 309 m, en huertas comerciales de lima Persa con edades de cinco a ocho años.

Las plantaciones evaluadas se ubican en los municipios de Tlaltizapán, Ayala, Coatlán del Río y Jantetelco. Para lo cual fueron considerados productores registrados en el padrón del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos.

1.2.2. Colecta del material biológico

El muestreo en las plantaciones se realizó aplicando la metodología propuesta por Acosta *et al.* (2012). Se colectaron 46 muestras, procedentes de ramas primarias, secundarias y troncos de árboles, con síntomas de exudación de goma, canchros, manchas negras (picnidios) y muerte descendente en las ramas, las que fueron transportadas en bolsas de polietileno y conservadas en refrigeración a 6 °C hasta su procesamiento en el laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc de la UAEM (EESuX-UAEM).

1.2.3. Aislamiento del hongo

Cada muestra fue seccionada en fracciones de 0.5 cm², considerándose la zona de avance de la pudrición o necrosis. Los fragmentos se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2 % por 2 min y se realizaron tres lavados con agua destilada estéril por 2 min cada uno, se secaron en papel de filtro estéril para eliminar el exceso de agua. Posteriormente se colocaron cuatro fragmentos de tejido

por caja Petri, que contenían medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), previamente elaborado. Después de sembradas las cajas Petri con las fracciones de tejido enfermo, se incubaron bajo luz blanca a ± 24 °C durante tres días. Una vez que se obtuvo el crecimiento del patógeno, se procedió a su purificación. Los cultivos puros se obtuvieron sembrando puntas de hifas, en PDA, con agujas de pino esterilizadas.

Los aislados monospóricos, fueron resembrados en medio de cultivo jugo V8-Agar (Ortiz, 1996), y luego almacenados en tubos de ensayo con medio papa dextrosa agar (PDA) cubiertos con aceite (Crous *et al.*, 2006).

1.2.4. Identificación y caracterización morfológica de los aislados

La identificación de los aislados se realizó con la ayuda de las claves y descripciones taxonómicas de Phillips *et al.* (2013), basado en las características morfológicas de las ascosporas, estados conidiales, pigmentación, grosor de la pared y forma de los conidios, dimensiones, septación, presencia de paráfisis en los conidiomas y estriaciones. La observación se llevó a cabo con un microscopio óptico de campo claro, modelo Olympus®.

1.2.5. Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron cumpliendo con, los postulados de Koch y siguiendo la metodología descrita por Agrios (2005).

La inoculación se realizó en plantas certificadas de lima Persa de un año de edad a una altura de 15 cm del nivel del suelo. Los tallos fueron desinfestados con hipoclorito de sodio al 1.5 % y lavados con agua destilada estéril. Posteriormente con un bisturí se realizó una incisión a la corteza del tallo, de aproximadamente 7 mm. Después se cortaron discos de 0.5 cm, de medio de cultivo con crecimiento micelial, con una aguja de disección de cada una de las cepas con edad de 7 días. La inoculación se realizó

mediante la colocación de micelio con medio de cultivo en las aberturas de los tallos, el testigo solo recibió medio de cultivo sin crecimiento micelial. Para favorecer la infección, el área de inoculación se cubrió con algodón humedecido con agua destilada estéril y se resguardó con Parafilm®.

Las plantas fueron etiquetadas individualmente y mantenidas bajo condiciones a campo abierto. Se realizaron evaluaciones visuales cada 15 días durante 3 meses, tomando en cuenta la evolución de los síntomas.

Al detectar los síntomas de la enfermedad, se procedió a hacer el aislamiento, con el fin de observar las características del hongo desarrollado en las cajas Petri antes de hacer la inoculación. Se compararon las características morfológicas del hongo inoculado, los síntomas que presentaron las plantas inoculadas, periodo de incubación y daño del tejido.

1.2.6. Identificación molecular

La identificación molecular se realizó mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), en el laboratorio de Fitopatología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales, Coyoacán, Ciudad de México, México.

La extracción del ADN genómico se llevó a cabo empleando el método AP descrito por (Sambrook y Russell, 2012), utilizando el micelio del cultivo monospórico de los aislamientos obtenidos. La calidad del mismo se evaluó por electroforesis horizontal en gel de agarosa 1% (Ultrapure, Gibco, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). La concentración de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).

Los cebadores empleados para la identificación molecular de los hongos fueron ITS5 (TCC GCT TAT TGA TAT GC) e ITS4 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) de los genes ribosomales (rDNA).

El análisis de las muestras finalmente fue corroborado con aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) según el protocolo descrito por Ahrens y Seemüller (1992), y con modificaciones en los componentes: agua ultrapura estéril (16.25 µl), solución amortiguadora TBE IX (2.5 µL), MgCl₂ a 2.5 mM (1.25 µL), dNTPs a 0.2 mM (0.5 µL), iniciadores universales ITS5 e ITS4 a 20 pmol (1 µL de cada uno), DNA polimerasa (Promega®) a 1U (0.5 µL) y 80 ng (2 µL) de ADN genómico extraído previamente según (Sambrook y Russell, 2012).

1.2.7. Análisis filogenético

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron purificados empleando el kit Wizard (Promega®, USA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El producto de la PCR purificado fue enviado a secuenciar a Macrogen Inc. (Seoul, Korea del Sur).

Las secuencias fueron ensambladas y editadas con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1 (Hall, 1999). Las secuencias de hongos fueron comparadas y depositadas en la base de datos del GenBank (NCBI, 2016).

Los árboles filogenéticos fueron reconstruidos con los datos de las terminaciones de ITS5 e ITS4, además fueron analizados con el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 7.0.14 (Swofford, 2003; Tamura *et al.*, 2007), alineadas con ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) y comparados con las secuencias de genes homólogos depositadas en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2016). Después de analizar la congruencia entre los conjuntos de datos, se hizo un análisis de máxima parsimonia (MP), se realizaron los análisis filogenéticos en PAUP (Phylogenetic Analysis Using

Parsimony) versión 4.0b10 (Swofford, 2002), los árboles parsimoniosos se obtuvieron con la función de búsqueda heurística con 1000 repeticiones de adición aleatoria, bisección y reconstrucción de árboles (TBR) como algoritmo de intercambio de ramas y los espacios o datos faltantes fueron considerados deleciones completas. Los niveles de confianza de los puntos de ramificación de árboles fueron determinados mediante el análisis de bootstrap con 1000 repeticiones (Kimura, 1980; Felsenstein, 1985; Hillis y Bull, 1993). La secuencia HQ231345 de *Phoma tracheiphila* de GenBank se utilizó como el taxón fuera de grupo.

1.3. Resultados y discusión

1.3.1. Identificación y caracterización morfológica de los aislados

De los 46 árboles muestreados de lima Persa, se obtuvieron 16 aislados procedentes de los síntomas observados en ramas primarias y secundarias con muerte descendente y exudación de goma. Solo tres de ellos fueron identificados morfológicamente según las claves taxonómicas reportadas por Phillips *et al.* (2013). En la observación al microscopio óptico, se identificaron colonias con crecimiento de micelio gris ahumado, luego gris olivo a gris verdoso a azul pizarra oscuro y la presencia de picnidios a los 30 días de incubación. Así como conidios producidos y formados por una sola célula, de forma ovalada, hialinos y de doble pared con 17- 26 x 12 μm de tamaño en la inmadurez. En la madurez los conidios mostraron una coloración marrón oscura, dos células y estriaciones con 18-28 x 11-16 μm de tamaño, lo cual coincide con estructuras reproductivas asexuales del género *Lasiodiplodia*, pared verruculosa <2 μm , 1-septo con estriaciones longitudinales, lo que concuerda con lo reportado por Phillips *et al.* (2013).

Resultados similares fueron obtenidos por Slippers *et al.* (2004) y Alves *et al.* (2008), logrando colonias en medio de cultivo moderadamente densas, con micelio aéreo que

inicialmente fueron blancas tornándose gris-olivo a los 7 días hasta llegar a un color azul pizarra oscuro.

Damm *et al.* (2007) y Netto *et al.* (2014) confirmaron que la principal característica que distingue al género *Lasiodiplodia* de otros géneros cercanamente relacionados es la presencia de picnidios, parafisos y estriaciones longitudinales en conidios maduros, lo cual coincide con lo observado en este estudio.

Las dimensiones de los conidios y los parafisos, concuerdan con las planteadas por Pitt y Hocking (2009), Phillips *et al.* (2013) y Muñoz *et al.* (2015) para este género.

Varela *et al.* (2013) describen a *Lasiodiplodia* como el agente causal de la muerte de plantas de naranjo agrio injertadas con diferentes especies de cítricos en viveros, de la muerte de ramas en árboles de limón mexicano y de la pudrición del pedúnculo en frutos de naranja.

La confusión del agente patógeno se debe a que produce síntomas muy similares a los que provoca la enfermedad conocida como gomosis, causada por *Phytophthora parasitica*, como el escurrimiento de goma, manchas foliares, pudriciones de frutos, muerte regresiva, canchales y la muerte de árboles, todos estos asociados a diversas especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae (Muñoz *et al.*, 2015).

Debe señalarse que hasta la fecha no había sido informada esta enfermedad para el estado de Morelos sobre lima Persa, razones que justificarían la inefectividad de su manejo en campo.

Derivado del muestreo, se identificaron y caracterizaron morfológicamente tres especies dentro del género *Lasiodiplodia*. La primera mostró colonias con conidióforos ausentes, células conidiógenas holoblásticas, discretas, hialinas, lisas, de pared delgada, cilíndricas, proliferando recurrentemente con 1-2 anillos, 11-16 × 3-5 µm. Conidios inicialmente hialinos, sin septas, elipsoide a ovoide, con contenido granular,

ambos extremos redondeados ampliamente, pared <2 μm , pigmentada, verruculosa, ovoide, 1-septado con estriaciones longitudinales, correspondientes a la especie *L. citricola* (Figura 1.1).

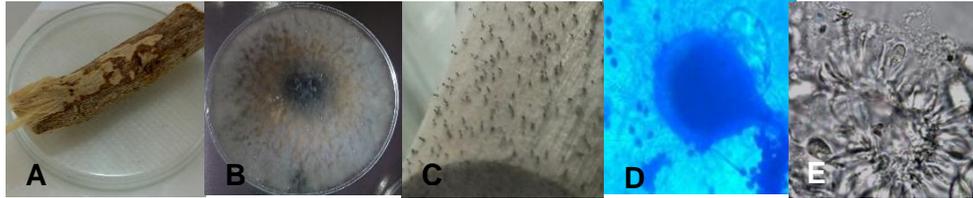


Figura 1. 1. Rama de lima Persa en cámara húmeda (A), cepa aislada de 5 días de edad (B), formación de picnidios después de 7 días en cámara húmeda (C), picnidio y conidio de *L. citricola* (D) (10X) y corte de picnidio mostrando parafisios, conidio en crecimiento e inmaduro (E) (100X).

Otra de las especies identificadas y caracterizadas fue *L. pseudotheobromae*, observándose conidios elipsoidales, ápices y bases redondeadas, más anchas en su parte media a dos tercios superiores, de paredes gruesas, hialinas y sin septos.

La tercera especie correspondió a *L. theobromae*, observándose células conidiógenas hialinas, de pared delgada, lisas, cilíndricas a sub-obpiriformes, holoblásticas, discretas, determinadas o indeterminadas y proliferantes por una o dos anillas distintas, o proliferando al mismo nivel, dando lugar a espesamientos periclinales, el conidio es subovoide a elipsoide ovoide, ápice redondeado ampliamente, afilando a la base truncada, más ancho en el tercio medio a tercero superior, paredes gruesas, contenido granular, inicialmente hialino y aseptado, permaneciendo hialino durante mucho tiempo, llegando a ser marrón oscuro y 1-septado solamente. Luego produce la descarga de los conidiomas, con depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuesta longitudinalmente dando una apariencia estriada a los conidios.

L. pseudotheobromae es una especie hermana de *L. theobromae* y recientemente se ha descrito en cultivares de *Acacia*, *Citrus aurantium*, *Coffea*, *Gmelina* y *Rosa* (Alves

et al., 2008). Se ha reportado en diferentes especies del género *Citrus*, pero hasta el momento no se había reportado en lima Persa (*C. latifolia*).

Slippers y Wingfield, 2007, citado por Phillips *et al.*, 2013, reportaron estos fitopatógenos como especies endófitas, que se encuentran en los huertos comerciales de cítricos en México.

1.3.2. Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad realizadas en las plantas certificadas de lima Persa, revelaron que los hongos aislados en este estudio son patógenos para este cultivo, observándose los primeros síntomas a los 22 días después de la inoculación (DDI), confirmándose que las especies del género *Lasiodiplodia* identificadas están asociadas a esta enfermedad y que son capaces de ocasionar clorosis en las hojas, muerte descendente de ramas primarias y secundarias, formación de canchales y exudación de goma.

Las hojas de árboles enfermos se tornaron amarillentas y cloróticas, a diferencia de las hojas del testigo. Estos síntomas se hicieron más notorios en algunos árboles, además los tallos presentaron agrietamientos de color café. En las plantas sin inocular no se observaron daños característicos, los tallos fueron sanos y cortes limpios.

A los 29 DDI, los árboles mostraron hojas con clorosis muy marcada en el nervio central, mientras que las plantas sanas continuaron con tallos limpios sin daño y hojas verdes y sanas.

A los 36 DDI se apreció una clorosis muy marcada con respecto a las demás observaciones, encontrándose hojas muy amarillentas, pero poco enrolladas, y la formación de una herida en la base del tallo (pudrición) de algunas plantas. A los 42 DDI algunos árboles mostraron la formación de un cancro bien definido en la base del

tallos. Los árboles sin inocular no evidenciaron síntomas de ninguna enfermedad y se mantuvieron sanos hasta el final de las evaluaciones.

Algunos investigadores como Moriwaki *et al.* (2003), reportaron que el uso de las pruebas de patogenicidad y características morfológicas permiten separar taxonómicamente las especies del género *Lasiodiplodia*. Estos resultados demuestran la importancia y actual vigencia de las herramientas tradicionales en la separación de especies en la taxonomía de hongos.

Siendo muy importante sobre todo para los productores de lima Persa, ya que son los que exportan en gran parte esta fruta para el mercado estadounidense.

Los estudios morfológicos y las secuencias de ITS mostraron a las mismas especies de *Lasiodiplodia* utilizadas para la inoculación.

1.3.3. Identificación molecular

Los estudios realizados por PCR empleando los cebadores ITS5 / ITS4 en la identificación molecular de las especies, ofrecieron como resultado la amplificación de fragmentos de ADN de 500 pb, obtenido a partir de micelios fúngicos de las muestras para todos los aislados (Figura 1. 2).

El análisis de secuencia mostró que los hongos corresponden a las especies *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*. Sin embargo, no se lograron alinear 13 de los aislamientos obtenidos, pertenecientes al género *Lasiodiplodia* spp., lo que indica que existe la posibilidad de que correspondan a nuevas especies.

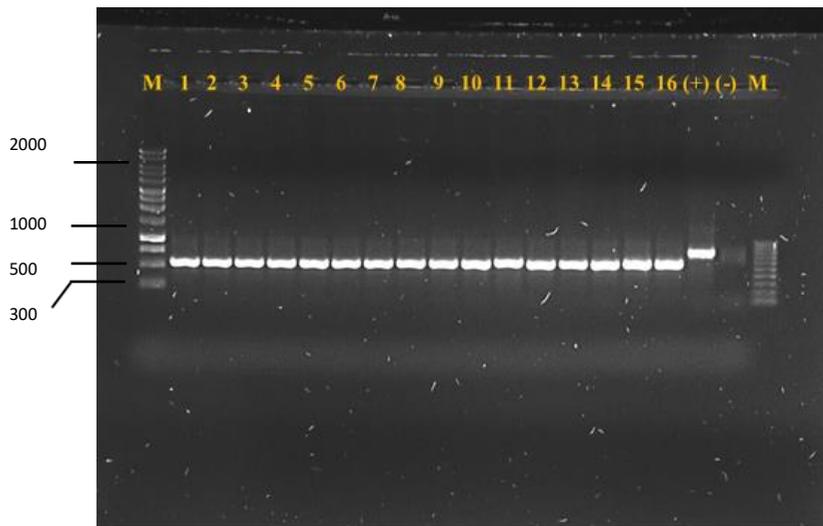


Figura 1. 2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de la PCR obtenidos del ADN ribosomal en los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp, con los cebadores ITS 4 e ITS 5. M (Marcador de PM 2 Kb ladder), carriles 1-16 DNA de muestras obtenidas con crecimiento miceliar y pruebas de patogenicidad banda 500 pb, carril 17. Control interno (Champiñón), carril 18 (Control negativo C⁻) planta sana, carril 18 (Marcador PM 100 pb ladder).

Estos resultados sugieren que estas especies que prevalecen en las huertas de cítricos constituyen una amenaza a la calidad de las plantaciones por lo que se deben implementar tratamientos de control adecuados. Siendo un problema de gran importancia económica en la región, debido a la alta susceptibilidad de los limones a esta enfermedad (Timmer *et al.*, 2002).

Los marcadores moleculares se han empleado recientemente para examinar genes y genotipos, modos reproductivos y especiación de un número de hongos, incluyendo *Botryosphaeria* spp. y sus anamorfos (Burgess *et al.*, 2006).

Otros estudios de diversidad genética afirman que las dos especies crípticas de *Lasiodiplodia* (*L. theobromae* y *L. pseudotheobromae*), no han sido encontradas y estudiadas en el mismo huésped por lo que no se ha podido establecer si en algún

momento ocurrió alguna hibridación entre ambas (Begoude *et al.*, 2010). Por otro lado Al-Sadi *et al.* (2013), encontraron un moderado nivel de diversidad genética en poblaciones de tres especies de *Lasiodiplodia* provenientes de distintos huéspedes y orígenes geográficos, y un alto número de genotipos no especificados.

Las 15 secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank con números de accesos para: *Lasiodiplodia citricola* (KY271187), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (KY284596), *Lasiodiplodia theobromae* (KY284589, KY284587) y *Lasiodiplodia* spp. (KY284584, KY284595, KY284594, KY290890, KY284592, KY284593, KY284588, KY284591, KY284586, KY284585 y KY284590) respectivamente.

1.3.4. Análisis filogenético

El árbol filogenético obtenido del análisis del ADN de los 16 aislamientos del género *Lasiodiplodia* se presenta en la Figura 1. 3. Los árboles obtenidos estaban arraigados a *Lasiodiplodia* spp., *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*.

En el análisis bayesiano, la posición de los clado de las especies de *Lasiodiplodia* en relación entre sí fueron diferentes, pero dentro de cada especie la topología era similar al árbol de máxima parsimonia (TreeBASE 11035). En este estudio se identificaron cuatro clados, cada uno correspondiente a una especie diferente de *Lasiodiplodia*.

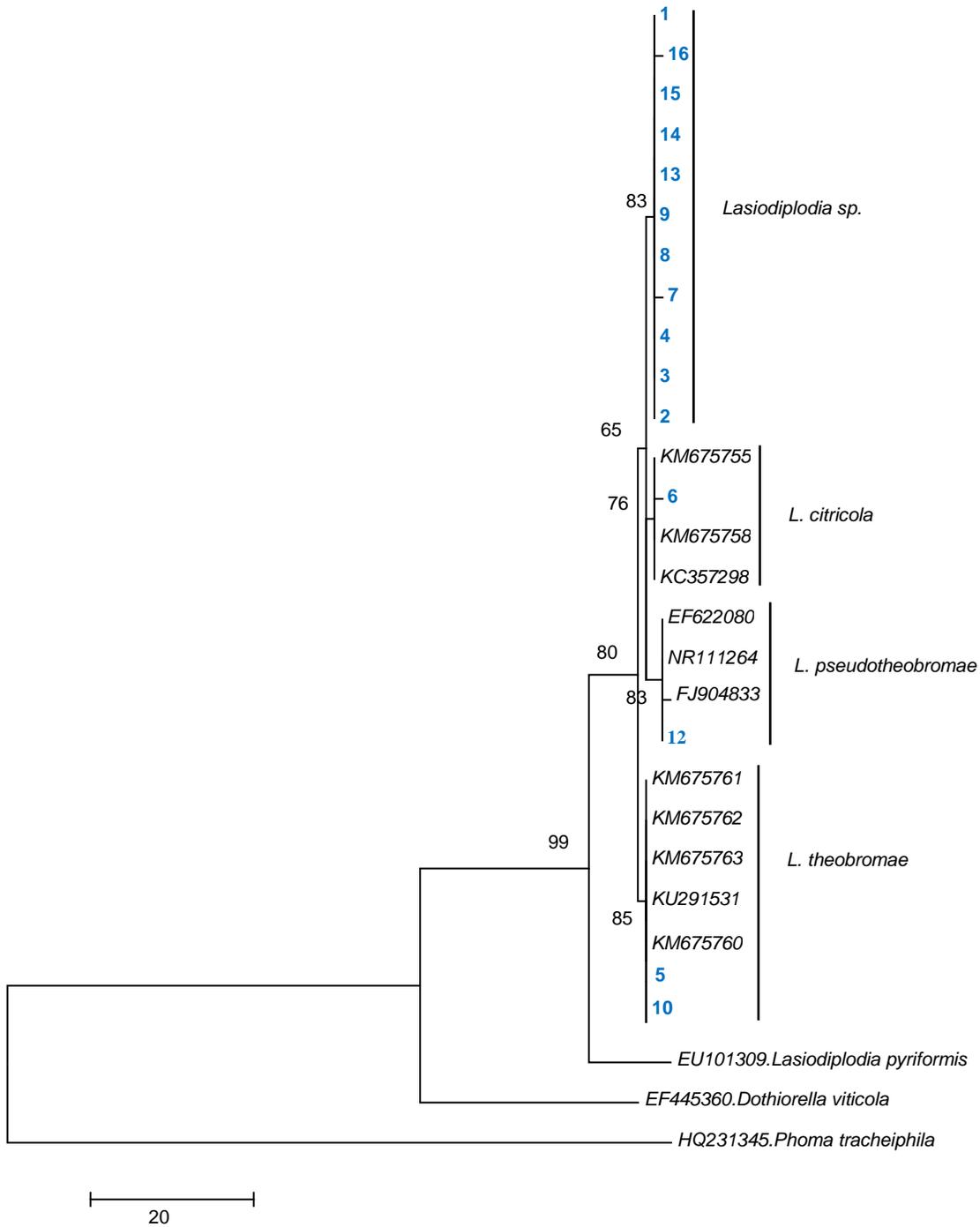


Figura 1. 3. Árbol filogenético basado en el análisis bayesiano y máxima parsimonia utilizando los primer ITS 5 e ITS 4.

Cuadro 1. 1. Lista de las secuencias ensambladas (ITS5 /ITS4), del producto de PCR, con su número de acceso del GENBANK (NCBI), obtenidas de los 16 aislamientos de tallo, ramas (primarias y secundarias) y raíz de limón Persa (*Citrus latifolia*) de varios municipios del Estado de Morelos.

NO. SECUENCIA	ACCESO GENBANK	ESPECIE	SECUENCIAS ENSAMBLADAS ITS5 / ITS4
1	KY284584	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	>1 AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTC TCCCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTC CAGTCAGTAAACGCAGACGCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTGG TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTA CAACCCTCAAGCTCTGCTTGGAAATGGGCACCGTCTCATTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGC GGTGGCTGTTGAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCC GGACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAG CATATC
2	KY284590	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	>2 TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCACC CTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTCAGTCAGT AAACGCAGACGCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCT TTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACAACCTC AAGCTCTGCTTGGAAATGGGCACCGTCTCATTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGGTGGCT GTTGAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCGGACGAA CCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATC
3	KY284585	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	>3 CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGA CTCTCCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAA CTCCAGTCAGTAAACGCAGACGCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCT TGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA TTACAACCCCTCAAGCTCTGCTTGGAAATGGGCACCGTCTCATTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTC GGCGGTGGCTGTTGAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCC CGCCGGACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAAC TTAAGCATATC
4	KY284586	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	>4 CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTC CCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTCA GTCAGTAAACGCAGACGCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTT CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACA ACCCTCAAGCTCTGCTTGGAAATGGGCACCGTCTCATTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCGG TGGCTGTTGAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCG ACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCA TT
5	KY284589	<i>L. theobromae</i>	>5 CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGAGCTCCGGCTCGACTCTC CCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTCA GTCAGTAAACGCAGACGCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTT CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTACA ACCCTCAAGCTCTGCTTGGAAATGGGCACCGTCTCACTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGCG GTGGCTGTTGAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCG GACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGC AATCA

NO. SECUENCIA	ACCESO GENBANK	ESPECIE	SECUENCIAS ENSAMBLADAS ITS5 / ITS4
6	KY271187	<i>L. citricola</i>	>6 GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCCGGGCTTCGGCTCGAC TCTCCCACCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTTCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAAC CCAGTCAGTAAACGCAGACGCTGATAAAACAAGTCAATAAACTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTG GTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTA CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGAATTGGCACCGTCCCTCACTGCGGACGCGCTCAAAGACCTCGGC GGTGGCTGTTCAAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCC GGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAG CATATC
7	KY284591	<i>Lasiodiplodia sp</i>	>7 TTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCACCC TTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTCAGTCAGTA AACGCAGACGCTGATAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCAT CGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT TGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCCTCA AGCCCTGCTTGAATTGGCACCGTCCCTATTGCGGACGCGCTCAAAGACCTCGCGGTGGCTG TTCAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCGACGAAC CTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA
8	KY284588	<i>Lasiodiplodia sp</i>	>8 TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCACCC CTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTCAGTCAGTA AAACGCAGACGCTGATAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCA TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTT TTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACAACCCCTC AAGCTCTGCTTGAATTGGCACCGTCCCTATTGCGGACGCGCTCAAAGACCTCGCGGTGGCT GTTCAAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCGACGA CCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATC
9	KY284593	<i>Lasiodiplodia sp</i>	>9 AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCCGGGCTTCGGCTCGACTC TCCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTC CAGTCAGTAAACGCAGACGCTGATAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG TTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCA TCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACA CAACCCCTCAAGCTCTGCTTGAATTGGCACCGTCCCTATTGCGGACGCGCTCAAAGACCTCGGC GGTGGCTGTTCAAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCC GGACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAG CATATC
10	KY284587	<i>L. theobromae</i>	>10 CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCCGGGCTTCGGCTCGACTCTC CCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTTCAAACCTCA GTCAGTAAACGCAGACGCTGATAAAACAAGTTAATAAACTAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTT CTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATC GAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTACA ACCCTCAAGCTCTGCTTGAATTGGCACCGTCCCTCACTGCGGACGCGCTCAAAGACCTCGGC GTGGCTGTTCAAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCG GACGAACCTTCTGAACTTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGC ATATC
11	Sin acceso	<i>Fusarium sp.</i>	>11 AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTACAACTCATCAACCTGTG AACATACCTATAACGTTGCCCTCGCGGGAACAGACGCGCCCGTAACACGGGCGCCCGCCGAG GGACCCCTAACTCTGTTCTATAATGTTTCTTCTGAGTAAACAAGCAAATAAATAAACTTCAACA ACGGATCTCTTGGCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGA ATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCCTGT CGAGCGTCATTACAACCTCAGGCCCGGGCTGGCGTTGGGGATCGCGGAAGCCCGCTGCG GGCACAACGCCGTCCTCAAAATACAGTGGCGGTCGCCCGCAGCTTCCATTGCGTAGTAGTAACA CCTCGCAACTGGAGAGCGGCGCGCCAGCCGTAACACCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGAAT CAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATATC

NO. SECUENCIA	ACCESO GENBANK	ESPECIE	SECUENCIAS ENSAMBLADAS ITS5 / ITS4
12	KY284596	<i>L. pseudotheobromae</i>	>12 GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTCAAAC TCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAT TACAACCCTCAAGCTCTGCTTGAATTGGGCACCGTCCTCACTGCGGACCGCCCTCAAAGACCTCG GCGGTGGCTGTTACGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGTGGTTGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATA
13	KY284592	<i>Lasiodiplodia sp</i>	>13 GTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTCAAACCTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTA CAACCTCAAGCTCTGCTTGAATTGGGCACCGTCCTCATTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGCGGGTGGCTGTTACGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATA
14	KY290890	<i>Lasiodiplodia sp</i>	>14 AACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTCAAACCTCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTA CAACCTCAAGCTCTGCTTGAATTGGGCACCGTCCTCATTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGGCGGTGGCTGTTACGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATA
15	KY284594	<i>Lasiodiplodia sp</i>	>15 TGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCTCCCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTCAAACCTCCAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCA TTACAACCCTCAAGCTCTGCTTGAATTGGGCACCGTCCTCATTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGGCGGTGGCTGTTACGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATA
16	KY284595	<i>Lasiodiplodia sp</i>	>16 CAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGAGTTTTCGGGCTTCGGCTCGACTCTCCACCCCTTTGTGAACGTACCTCTGTTGCTTTGGCGGCTCCGGCCGCCAAAGGACCTCAAACCTCAAGTCAGTAAACGCAGACGTCTGATAAACAAGTTAATAAACTAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCAATACACCTCAAGCTCTGCTTGAATTGGGCACCGTCCTCATTGCGGACGCGCCTCAAAGACCTCGGGCGGTGGCTGTTACGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGTCGCCCGCCGGACGAACCTTCTGAACCTTTCTCAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTTAAGCATATA

Estos fueron: Clado 1 (*Lasiodiplodia* spp.), Clado 2 (*L. citricola*), Clado 3 (*L. pseudotheobromae*) y Clado 4 (*L. theobromae*).

Las especies *Dothiorella viticola* (EF445360) y *Phoma tracheiphila* (HQ231345) se encontraron representadas fuera de grupo.

Varios estudios consideran que un soporte superior o igual al 70 % brinda una información confiable sobre el posicionamiento de cada especie en la cladograma (Arnold *et al.*, 2007), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el trabajo.

En consecuencia, la formación del árbol permitió la conformación de agrupaciones, las cuales nos confirman la presencia de tres nuevas especies del género *Lasiodiplodia* afectando las plantaciones de lima Persa en el estado de Morelos.

1.4. Conclusiones

A partir de los síntomas presentes en plantaciones de lima Persa, con muerte descendente y exudación de goma, procedentes de los municipios: Tlaltizapán, Ayala, Coatlán del Río y Jantetelco, en el Estado de Morelos, se obtuvieron 16 aislados, entre los que se lograron identificar tres especies correspondientes al género *Lasiodiplodia* sp., *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*, confirmadas por su morfología, patogenicidad y análisis molecular a partir de los genes ITS 5 e ITS 4, con una distancia genética hasta del 99 %, las que fueron agrupadas en cuatro clados según el árbol filogenético y registradas en el GenBank.

1.5. Literatura citada

- Abdollahzadeh, J; Javadi, A; Mohammadi Goltapeh, E; Zare, R *and* Phillips, A.J.L. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*. Dec; 25: 1–10. DOI: 10.3767/003158510X524150
- Acosta-Pérez, JA, Ortiz-García, CF, Zaldívar-Cruz, JM, Rodríguez-Cuevas, M, Bautista-Muñoz, CC, & Cruz Castillo-Aguilar, C de la. 2012. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y ciencia*, 28(3), 245-258. Recuperado en 13 de septiembre de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792012000300004&lng=es&tlng=es
- Agrios, G. N. 2005. Introduction to plant pathology. *Elsevier Academic Press publication*. ISBN: 978-0-12-044563-9. DOI:10.1016/C2012-0-01423-8
- Al-Sadi AM, Al-Wehaibi AN, Al-Shariqi RM, Al-Hammadi MS, Al-Hosni I, Al-Mahmooli IH and Al-Ghaithi AG. 2013. Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease* 97(10):1363-1369. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0245-RE>
- Arnold, A., Henk, D., Eells, R., Lutzoni, F., & Vilgalys, R. 2007. Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Micología*, 99 (2), 185–206. Recuperado de <http://www.mycologia.org/content/99/2/185.full.pdf+html>
- Álvarez, MG. 1976. Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71: 169 p. <https://biblat.unam.mx/es/revista/fitofilo>
- Alves A, Crous PW, Correia A and. Phillips AJL. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- Ahrens, U., and E. Seemüller. 1992. Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828–832.

https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08_828.pdf

Burgess TI, Barber PA, Mohali S, Pegg G, de Beer W and. Wingfield MJ. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423-435. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040071>

Begoude BAD, Slippers B, Wingfield MJ and Roux J. 2010. Characterization of *Botryosphaeriaceae* and *Cryphonectriaceae* associated with *Terminalia* spp. in Africa, PhD thesis, University of Pretoria. 268 p. <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/28515/Complete.pdf?sequence=6>

CESVMOR. 2018. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos. Campaña contra huanglongbing de los cítricos. Primer reporte de enero del 2018. Recuperado el 18 de septiembre del 2018. <https://cesvmor.org.mx/informes-mensuales-sanidad-vegetal-2018/>

Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F., Philips, A. J., & Groenewald, J. Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in mycology*, 55, 235-253. DOI:10.3114/sim.2007.57.01

Damm U, Crous P Wand Fourie PH. 2007. Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99:664-680. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18268901>

Felsenstein, J. 1985. Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791. DOI:10.2307/2408678

Hall, T. A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000. <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>

- Hillis, D.M., and Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42: 182-192. DOI:10.1093/sysbio/42.2.182.
- Kimura, M. 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120. DOI:10.1007/BF01731581-
- Muñoz, P., García-Estrada, R., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., and Allende-Molar, R. 2015. Lasiodiplodia theobromae en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 33 (1), 54-74. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61240687004>
- Moriwaki, J., Sato, T., Tsukiboshi, T. 2003. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. Nov. *Japan. Mycoscience* 44:47-53. <https://doi.org/10.1007/S10267-002-0079-7>
- NCBI. 2016. National Center for Biotechnology Information. En línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. DOI: 10.1093/nar/gkv1290
- Netto MSB, Assuncao IP, Lima GSA, Marques MW, Lima WG, Monteiro JHA, de Queiroz BV, Michereff S J, Phillips AJ Land Camara MPS. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4>
- Ortiz García, C. F. 1996. Etude de la diversite genetique de populations de *Phytophthora* pathogenes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.) (No. 04; TESIS.).129 p. <http://catalogue-bibliotheques.cirad.fr/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=19334>
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ and Crous PW. 2013. The *Botryosphaeriaceae*: genera and species known from culture. *Studies in Mycology* 76: 51-167. DOI: 10.3114/sim0021
- Pitt J and Hocking A. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. 3 ed. Springer. pp 125-127. ISBN978-0-387-92207-2. <https://www.springer.com/br/book/9780387922065>

- Sambrook J and Russell DW. 2012. Molecular cloning. A Laboratory Manual. Third Edition. 1. 1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m8265?lang=es®ion=MX>
- Schwentesi Rindermann, Rita and Manuel Ángel Gómez Cruz. 2005. Limón Persa. Tendencias en el mercado mexicano. Ed. CIESTAAM/UACH y Banco Mundial, México, D.F. 158 pp. ISBN: 968-02-0167-8. <http://www.concivver.com/archivosenpdf/Limonpersa2005.pdf>
- SIAP. 2017. Atlas Agroalimentaria Anual. in: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México 236 p. <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>
- Swofford, D. L. 2002. (PAUP). Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.458.6867&rep=rep1&type=pdf>
- Swofford, D.L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods) Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00191.x
- Slippers B, Crous P W, Denman S, Coutinho TA, Wingfield B D and Wingfield M J. 2004. Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycology* 96:83-101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148832>
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews*, 21(2-3), 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488738>
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22 (22), 4673–4680.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308517/>

Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH. 2002. Plagas y enfermedades de los cítricos. The American Phytopathological Society. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 90 pp.
<https://www.mundiprensa.mx/catalogo/9788484760276/plagas-y-enfermedades-de-los-citricos>

Varela FSE, Orozco SM, Torres ARI and Silva AGL. 2013. Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas. ISBN: 9786077654643. 428 p.
http://biblioteca.uaaan.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=40044&shelfbrowse_itemnumber=76742

CAPITULO II

INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE MUERTE DESCENDENTE (*Lasiodiplodia theobromae*, *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* y *Lasiodiplodia* spp.) (BOTRYOSPHAERIALES: BOTRYOSPHAERIACEAE) EN LIMA Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) EN MORELOS, MÉXICO

Resumen

La muerte descendente ocasionada por *Lasiodiplodia* spp., es una enfermedad que ataca seriamente la lima Persa, teniendo gran importancia en los huertos que se cultivan en el Estado de Morelos. El objetivo del trabajo fue evaluar la incidencia y severidad de la muerte descendente en 46 huertos, con 6 años promedio de edad. Las plantaciones evaluadas se ubicaron en los municipios de Amacuzac (7 huertos), Ayala (4), Coatlán del Río (9), Cuautla (1), Jantetelco (5), Jonacatepec (1), Puente de Ixtla (5), Tepalcingo (3) y Tlaltizapán (11). La identificación del agente patógeno se realizó en base al análisis de la morfología microscópica de sus estructuras desarrolladas en los tejidos del hospedante y en los aislamientos creciendo en los medios de cultivo. Se evaluó la incidencia en base al número de plantas con síntomas desde la presencia de gomosis hasta la muerte descendente de ramas. La severidad fue evaluada con una escala de 3 niveles de severidad, transformándose a porcentaje de infección mediante la fórmula de Townsend y Heuberger y analizados mediante Kruskal Wallis determinando comparación de medias (α =Tukey). Como resultado se detectó en los aislados de campo, sobre lima Persa la presencia de *Lasiodiplodia* spp., confirmándose una incidencia considerable de muerte descendente de ramas. De los 46 huertos evaluados el 78% presenta incidencias que oscilan del 31.83 al 100% y en más del 71% presento una severidad que fluctuó del 30.0 al 100 %. Los huertos que presentaron menor incidencia y severidad se ubicaron en los municipios de Amacuzac, Ayala, Coatlán del Río y Tlaltizapán.

Palabras clave: *Lasiodiplodia* sp., muerte descendente, *Citrus latifolia*, incidencia, severidad.

INCIDENCE AND SEVERITY OF DIEBACK (*Lasiodiplodia theobromae*, *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* y *Lasiodiplodia* spp.) (BOTRYOSPHAERIALES: BOTRYOSPHAERIACEAE) IN LIMA Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) IN MORELOS, MEXICO

Abstract

The dieback caused by *Lasiodiplodia* spp., is a disease that seriously attacks the Persian lime, having great importance in the orchards that are cultivated in the State of Morelos. The objective of the work was to evaluate the incidence and severity of the dieback in 46 orchards, with 6 years of average age. The plantations evaluated were located in the municipalities of Amacuzac (7 orchards), Ayala (4), Coatlán del Río (9), Cuautla (1), Jantetelco (5), Jonacatepec (1), Puente de Ixtla (5), Tepalcingo (3) and Tlaltizapan (11). The identification of the pathogen was made based on the analysis of the microscopic morphology of its structures developed in the tissues of the host and in the isolates growing in the culture media. The incidence was evaluated based on the number of plants with symptoms from the presence of gummosis to the dieback of branches. The severity was evaluated with a scale of 3 levels of severity, transforming to percentage of infection by means of the Townsend and Heuberger formula and analyzed by Kruskal Wallis determining comparison of means ($\alpha =$ Tukey). As a result, the presence of *Lasiodiplodia* spp., was detected in field isolates, on Persian lime, confirming a considerable incidence of branch dieback. Of the 46 orchards evaluated, 78% presented incidences ranging from 31.83 to 100% and in more than 71% presented a severity that fluctuated from 30.0% to 100%. The orchards that presented lower incidence and severity were located in the municipalities of Amacuzac, Ayala, Coatlan del Río and Tlaltizapan.

Keyword: *Lasiodiplodia* spp., dieback, Persa lime, *Citrus latifolia*, incidence, severity.

2.1. Introducción

México participa con el 21 % de la producción total de limas y limones en el mundo, dónde los limones y limas acidas en sus variedades limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y lima persa (*Citrus latifolia*), se obtuvo una producción de 627.4 miles de toneladas (FAOSFAT, 2018).

La producción de lima Persa se ha orientado al consumo en fresco, México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en la producción de lima Persa y limón mexicano, donde el 70 % del total se destina al mercado nacional y el resto al mercado de exportación, principalmente a los Estados Unidos de América (Schwentenius y Gómez, 2005; INTAGRI, 2018). La producción nacional para el 2017 fue de 10.05 millones de toneladas, con un rendimiento promedio de 17.65 ton /ha, con un valor de la producción de 16,781 millones de pesos, para ese año la superficie sembrada de cítricos fue de 649,023 ha, de las cuales 198,310 ha fueron de limón, 340,586 ha de naranja dulce, 20,127 ha de toronja y 90,000 ha de lima Persa (SIAP, 2018; INTAGRI, 2018).

En el 2016 se tuvo una producción de 2,439,477 toneladas de lima Persa, 4.9 % por arriba de lo alcanzado en 2015 (SIAP, 2017). Los productores mayores de lima persa son Veracruz (717,014 t), Michoacán (619,612 t) y Oaxaca (263,448 t), Morelos ocupa el doceavo lugar con una producción de 3880 t (SIAP, 2018).

En 2010, Morelos contaba con 1000 ha de superficie sembrada, con huertas de cítricos establecidas en 28 de los 33 municipios, con producción alta y calidad de exportación, actualmente se cuenta con una superficie establecida de 612 ha sembradas, en 17 municipios, de éstas destaca el limón y la naranja Valencia, con 32

y 66 % de la superficie total establecida respectivamente, y un rendimiento de 12.11 y 7.76 ton/ha respectivamente, siendo ambas especies las de mayor importancia económica, el resto de la superficie está compuesta de todos los demás cítricos (CESVMOR, 2018; SIAP, 2018). Se tiene una clara disminución de la superficie, este cultivo tiende a tener diversos problemas tanto en raíces, tronco, follaje y frutos, siendo las enfermedades muy comunes en lima Persa (Christensen, 2017). Es importante destacar que se pensaba que la disminución de superficie por la muerte de árboles era ocasionado por enfermedades como la gomosis, la cual se tienen reportes en otros estados como Colima y Tabasco, que es ocasionada por *Phytophthora parasitica* (Vidales, 1982; Acosta *et al.*, 2012), en Tabasco, Acosta *et al.* (2012), señalaron a la gomosis o pudrición del pie, como una de las enfermedades más importantes, ya que causaba la muerte de muchos árboles de cítricos de pie franco e injertado, provocando grandes pérdidas y la eliminación de huertas.

Es importante destacar que las autoridades sanitarias, técnicos profesionales y productores de cítricos del estado de Morelos, venía realizando aplicación de productos que controlan a este patógeno, pero no se veían mejoras en el control. Mientras coincidentemente Abdollahzadeh *et al.* (2010) observaron otros síntomas que podían atribuirse a otros agentes que producían: formación de canchales, pudrición de la fruta, muerte regresiva y descendente de ramas, además de exudado de goma. La producción de gomosis en los cultivos, perenes se conocen tanto especies de *Phytophthora* como de otros hongos fitopatógenos de la familia Botryosphaeriaceae, la cual tiene varios géneros que causan manchas foliares, pudriciones de frutas, muerte descendente, canchales perennes y finalmente la muerte económicamente importantes cultivos perennes leñosas y plantas ornamentales, así como tanto nativa y especies de árboles forestales introducidas (Burgess *et al.*, 2006; Mohali *et al.*, 2007).

Estudios recientes citan a especies del género *Lasiodiplodia* causando enfermedades en el trópico en cultivos importantes como cacao (*Theobroma cacao* L.), aguacate

(*Persea americana* Mill), papaya (*Carica papaya* L.), caucho (*Hevea brasiliensis* Muell.), chirimoya (*Annona cherimola* Mill), durazno (*Prunus persica* (L.) Batsch), caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), uvas (*Vitis vinifera* L.) y cítricos (Picos *et al.*, 2015). Valle *et al.* (2017), reportan al menos tres especies del género *Lasiodiplodia* (*Lasiodiplodia theobromae*, *L. citricola* y *L. pseudotheobromae*), causando gomosis, muerte descendente de ramas y la muerte de árboles de lima Persa. Este complejo de problemáticas nos llevó a plantear el siguiente objetivo: determinar la incidencia y severidad de la muerte descendentes en plantaciones de limón 'Persa' en el Estado de Morelos.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Ubicación del lugar de estudio

El estudio se realizó en el periodo comprendido entre septiembre del 2014 -agosto del 2015, en el estado de Morelos, México, ubicado geográficamente a los 22°51'43" de latitud Norte y 102°36'38" Longitud Oeste y a una altura sobre el nivel del mar de 2 309 m, en huertas comerciales de lima 'Persa'.

Las plantaciones evaluadas se ubicaron en los municipios de Amacuzac, Ayala, Coatlán del Río, Jantetelco, Puente de Ixtla, Tepalcingo y Tlaltizapán. Para lo cual fueron considerados 46 productores registrados en el padrón del Comité Estatal de Sanidad Vegetal del estado de Morelos (Cuadro 2.1).

2.2.2. Evaluación de la incidencia

Para llevar a cabo la evaluación de la incidencia, se utilizó la metodología propuesta por Acosta *et al.* (2012), los cuales realizaron evaluaciones sistemáticas, en este caso,

se seleccionaron cinco hileras de cada huerto a evaluar, el número de árboles por hilera fue variable, ya que dependía del tamaño del huerto, el número de árboles por huerto oscilo entre 4 a 21 árboles. Por lo que los árboles por huerta oscilaron entre 21 a 50 árboles.

Cuadro 2.1. Huertos de lima Persa en el Estado de Morelos seleccionados para evaluar incidencia y severidad de la muerte regresiva (*Lasiodiplodia* spp).

Huerto	Municipio	Localidad	GPS información		(M.S.N.M.)	Patógeno
			Latitud	Longitud		
1	Tlaltizapán	San Rafael	18° 65 262	-99° 03 14 9	1032	<i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>L. theobromae</i>
2	Tlaltizapán	San Rafael	18° 63 52 5	-99° 00 97 1	1003	<i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>L. theobromae</i>
3	Tlaltizapán	San Rafael	18.65635	-99.03722	1053	<i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>L. theobromae</i>
4	Tlaltizapán	San Rafael	18.65635	-99.02013	1120	<i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>L. theobromae</i>
5	Tlaltizapán	San Rafael	18.63435	-99.00666	1041	<i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>L. theobromae</i>
6	Tlaltizapán	San Rafael	18.65306	-99.02171	1030	<i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>L. theobromae</i>
7	Tlaltizapán	San Rafael	18.654	-99.01788	1045	<i>Lasiodiplodia</i> sp. y <i>L. theobromae</i>
8	Jonacatepec	Amacuitlapilco	18.70532	-98.81314	1386	<i>Lasiodiplodia</i> sp. *
9	Tepalcingo	Tepalcingo	18.58512	-98.81215	1149	<i>Lasiodiplodia</i> sp. *
10	Tepalcingo	Tepalcingo	18.59631	-98.79999	1167	<i>Lasiodiplodia</i> sp. *
11	Tepalcingo	Tepalcingo	18.58512	-98.81215	1149	<i>Lasiodiplodia</i> sp. *
12	Puente de Ixtla	El coco	18.591593	-99.30553	880	<i>Lasiodiplodia</i> sp. *
13	Puente de Ixtla	El coco	18.591521	-99.30902	881	<i>Lasiodiplodia</i> sp. *
14	Puente de Ixtla	"El Remolino II" Col. Buenos Aires	18.61594	-99.307046	941	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
15	Puente de Ixtla	El coco	18.588484	-99.312079	934	<i>Lasiodiplodia</i> sp. *
16	Puente de Ixtla	El coco	18.590141	-99.320947	903	<i>Lasiodiplodia</i> sp. *
17	Coatlán del Río	Sta. Margara 01	18.73213	-99.42902	1020	<i>L. pseudotheobromae</i>
18	Coatlán del Río	Sta. Margara 02	18.733269	-99.430629	1015	<i>L. pseudotheobromae</i>
19	Coatlán del Río	Sta. Margara 04	18.73142	-99.4302	1024	<i>L. pseudotheobromae</i>
20	Coatlán del Río	La Cordillera. Tilancingo	18.74391	-99.44691	1044	<i>L. pseudotheobromae</i>
21	Coatlán del Río	Vertiente 03,Tilancingo	18.738629	-99.446264	1026	<i>L. pseudotheobromae</i>
22	Coatlán del Río	San José 01	18.74006	-99.42534	992	<i>L. pseudotheobromae</i>

Huerto	Municipio	Localidad	GPS información		(M.S.N.M.)	Patógeno
			Latitud	Longitud		
23	Coatlán del Río	Coatlán del Río	18.740969	-99.435883	1010	<i>L. pseudotheobromae</i>
24	Coatlán del Río	Tilancingo	18.73635	-99.45361	1067	<i>L. pseudotheobromae</i>
25	Coatlán del Río	Col. Cuauhtémoc	18.753323	-99.445669	1064	<i>L. pseudotheobromae</i>
26	Amacuzac	Amacuzac	18.636870	-99.313958	929	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
27	Amacuzac	Amacuzac	18.569708	-99.360583	924	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
28	Amacuzac	Coahuixtla	18.570251	-99.3838	928	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
29	Amacuzac	Coahuixtla	18.57175	-99.36667	925	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
30	Amacuzac	Miahuatlán	18.586522	-99.349734	894	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
31	Amacuzac	Miahuatlán	18.589589	-99.360445	1517	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
32	Amacuzac	Miahuatlán	18.603453	-99.394064	941	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
33	Ayala	Tecomalco	18.7599224	98.9909311	1072	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
34	Ayala	Tecomalco	18.7599224	98.9909311	1072	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
35	Ayala	Tecomalco	18.7599224	98.9909311	1072	<i>Lasiodiplodia sp.</i>
36	Jantetelco	Amayuca	18.71317	-98.79353	1425	<i>L. citricola</i>
37	Jantetelco	Amayuca	18.73256	-98.78864	1474	<i>L. citricola</i>
38	Tlaltizapán	Santa Rosa 30	18.69429	-99.18177	979	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>
39	Tlaltizapán	El Mirador 08, San Rafael	18.65705	-99.0276	1048	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>
40	Tlaltizapán	El Túnel 03, San Rafael	18.65262	-99.03149	1034	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>
41	Tlaltizapán	San Rafael	18.64943	-99.02406	1015	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>
42	Jantetelco	Amayuca. Los arenales	18.73256	-98.78864	1474	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>
43	Cuautla	El Polvorín, Santa Mónica	18.86543	-98.99383	1308	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>
44	Jantetelco	Chalcatzingo, de arriba	18.68985	-98.76344	1368	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>
45	Jantetelco	Chalcatzingo, Campo de arriba	18.68974	-98.76773	1361	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>
46	Ayala	Tlayecac, Campo Nuevo	18.76326	-98.90506	1738	<i>Lasiodiplodia sp. y</i> <i>L. theobromae</i>

El porcentaje de incidencia se determinó mediante la fórmula siguiente:

$$\% \text{ IE} = \left(\frac{NPE}{NTPE} \right) \times 100$$

Donde:

% IE= Porcentaje de incidencia de la enfermedad.

NPE = Número de plantas enfermas

NTPE = Número total de plantas evaluadas

2.2.3. Evaluación de la severidad

Para evaluar la severidad, se utilizó la escala de daño propuesta por Orozco- Santos, (1995), modificada por Valle, para poder determinar los porcentajes de daño ocasionados por diversas especies de *Lasiodiplodia* spp. (Cuadro 2.2). fue variable el número de árboles por hilera, ya que dependía del tamaño del huerto, el número de árboles por huerto oscilo entre 4 a 21 árboles. Los árboles por huerta oscilaban entre 21 a 50 árboles.

La severidad se transformó a porcentaje de infección (% PI), la cual fue calculada, utilizando la formula Townsend and Heuberger (1943).

La cual es la siguiente:

$$PI = \frac{\sum_{i=1}^{n=5} (n * V)}{\text{Categoria mayor} * N} * 100$$

Donde:

PI = Porcentaje de infección.

n = Número de plantas en cada categoría

V = Valor numérico de cada categoría

N = Número de plantas en muestra

Cuadro 2.2. Escala utilizada para evaluar la severidad de la muerte descendente en árboles de lima Persa en el estado de Morelos.

NIVEL DE SEVERIDAD	DESCRIPCIÓN DEL DAÑO
0	Árbol sano, son árboles con tronco principal, ramas primarias y secundarias sin presencia de exudaciones gomosas ni canchros.
1	Con presencia de exudaciones de goma en tronco principal o en ramas primarias y secundarias.
2	Con agrietamiento visible con exposición de tejidos internos, en tronco principal o en ramas primarias y secundarias.
3	Con presencia de cancro bien definido y presencia de cancro bien definido y muerte descendente de ramas.

2.2.4. Análisis estadístico

El porcentaje de incidencia (% IE) e infección (% PI), se les aplicaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de la varianza (Levene y Bartlett), como no se ajustaron a dichos principios se corrió una prueba de estadística no paramétrica, utilizando la prueba de Kruskal Wallis.

2.3. Resultados y discusiones

2.3.1. Síntomas observados en campo

Los síntomas característicos que se observaron fueron rajaduras en el tallo, exudaciones de goma, canchros en la base del tallo, agrietamiento visible con exposición de tejidos internos y necrosis descendente en ramas y árboles (Figura 2.1). La enfermedad descendió a la base de la rama anual e invadió las ramas secundarias. Khanzada *et al.* (2004), mencionan que, en plantas afectadas, las ramitas nuevas

comienzan a morir de las puntas hasta llegar a la madera vieja, dando un aspecto chamuscado a la extremidad, además las ramitas verdes jóvenes comienzan marchitándose primero en la base y luego se extiende hacia afuera a lo largo de las venas de los bordes de las hojas. La hoja afectada se vuelve marrón y sus márgenes se doblan hacia arriba, se queman y las hojas caen, dejando una rama seca. En condiciones severas las ramas se secan una tras otra en secuencia, resultando en la muerte de todo el árbol (Figura 2.1. D).



Figura 2.1. Síntomas característicos de la muerte regresiva en árboles de lima Persa en el Estado de Morelos. A y E) Clase 0: Árbol sano; B y F) Clase 1: Exudaciones de goma; C y G) Clase 2: Agrietamiento visible con exposición de tejidos internos; D y H) Clase 3: Muerte descendente de ramas y cancro bien definido.

En México, Acosta *et al.* (2012) y Vidales (1982), aislaron a *P. parasitica* como el agente causal de la gomosis en las regiones productoras de lima Persa y Naranja dulce var. Valencia de Colima y Tabasco. De acuerdo a la sintomatología reportada para este patógeno, Romero (1993) menciona que los síntomas de esta enfermedad pueden apreciarse en el follaje, en el tronco y en las raíces. Los árboles enfermos destacan en el huerto por su follaje amarillento y escaso, muerte de ramitas y pocos frutos. En el tronco, particularmente en la base, pueden observarse áreas necróticas, café obscuras, cuarteadas y con exudación de goma; con el tiempo la corteza se

desprende, dejando la madera al descubierto; las raíces se secan y arrugan, similar como cuando hay deficiencia de agua; permanecen firmes pero incapaces de absorber suficiente agua y minerales para el sostenimiento y desarrollo del árbol, el cual termina por morir.

Acosta (2008), reporta el daño de dos formas: Daño reversible, menciona que los árboles de semilla, afectados por gomosis, pero aun con posibilidad de recuperación, presentan varios niveles de daño. El daño más fuerte se manifiesta en limoneros y se reconoce por medio de una alta proporción de ramas secas, poco follaje y clorosis general severa. (Orozco-Santos, 1995). Esta enfermedad en arboles reduce su rendimiento hasta en 60%. En contraste, aquellos con daño ligero presentan un solo sector o una rama con follaje clorótico, mientras el resto de árbol presenta un aspecto normal. Las pérdidas de rendimientos en plantas con daño ligero se estiman entre 5 y 10%. En ambos casos, los árboles pueden o no presentar lesiones en el tronco con escurrimientos de goma y agrietamientos de corteza. Y el Daño irreversible, donde los árboles con este daño, presentan canchales visibles en tronco y alta proporción de ramas muertas. La recuperación con medios curativos es difícil, por lo que en poco tiempo mueren. Las pérdidas en rendimientos son del 100%.

Debe señalarse que hasta la fecha no había sido informada esta enfermedad para el estado de Morelos sobre lima Persa, razones que justificarían la ineffectividad de su manejo en campo, dado posiblemente a la confusión con los síntomas producidos por otro agente (*Phytophthora parasítica*) que produce gomosis.

La diferencia entre los síntomas y daños entre estos dos patógenos, es que *Lasiodiplodia* spp., en Lima Persa ocasiona la muerte descendente, algunos autores le llaman muerte regresiva, y la formación de puntos negros (picnidios), muy evidentes al momento de que se va secando la rama.

2.3.2. Incidencia

Las pruebas de medias de la incidencia de la muerte regresiva separaron 14 grupos, con diferencias estadísticas entre ellos. En el grupo A se ubicaron los huertos con mayor porcentaje de incidencia, que fue de 96.75 a 100 %, estos huertos se ubicaron en los municipios de Jonacatepec (1 huerto), Coatlán del río (2), Tlaltizapán (2) y Cuautla (1). En el grupo B se agruparon los huertos con incidencia media a alta, con porcentajes de 55.43 a 88.18 %, ubicándose en los municipios de Jantetelco (2 huertos), Coatlán del Río (4), Amacuzac (3), Tlaltizapán (3), Puente de Ixtla (4), Tepalcingo (3) y Ayala (1). En el grupo H se ubicaron los huertos con incidencias de 23.81 a 49 %, con ubicación en los municipios de Puente de Ixtla (1 huerto), Jantetelco (3), Amacuzac (1), Coatlán del Río (2), Ayala (1) y Tlaltizapán (3). Finalmente, en el grupo I se tuvieron los huertos que presentaron la menor incidencia de la enfermedad con 11.97 a 25.45 % y se ubicaron en los municipios de Tlaltizapán (3 huertos), Ayala (2), Amacuzac (3) y Coatlán del Río (1) (Cuadro 2. 2. y 2. 3.).

A observarse de la agrupación de los municipios, se observa que se tiene un porcentaje de incidencia de la enfermedad de alta a media, del 49 al 100%, en todos los municipios: Jonacatepec, Coatlán del Río, Cuautla, Amacuzac, Tlaltizapán, Puente de Ixtla, Tepalcingo, Ayala, Puente de Ixtla, Jantetelco, con 37 de los 46 huertos evaluados, es decir que se observa una clara presencia de la enfermedad en todo el estado de Morelos, donde se cultiva lima Persa, sin embargo es importante destacar que en los municipios de Coatlán del Río y Tlaltizapán están localizados en la parte sur-poniente del estado de Morelos, donde predomina un clima cálido, integrado por la prolongación de la zona de pie de monte. El centro de la entidad conjuntamente con la montaña sur constituye el 60 % de la superficie estatal; donde se logran temperaturas medias anuales entre 22- 26°C, temperaturas máximas de 34 °C y lluvias predominantes en los meses de verano e invierno hasta de 900 mm (INEGI, 2018).

El municipio con menor porcentaje de incidencia de la enfermedad fue Coatlán del Río (11.97 %) y se localiza en sur poniente del estado, colindando con Guerrero y el Estado de México, caracterizado por un clima subhúmedo con lluvias en verano y en invierno A (W) es el predominante. Podemos encontrar también microclimas como el subtropical húmedo y el caluroso tropical con invierno indefinido. La precipitación promedio es de 1,000 milímetros anuales, las temperaturas máximas que se presentan son de 34°C, la media de 24°C y la mínima de 14°C. (Enciclopedias municipios y delegaciones, 2018).

Estas condiciones meteorológicas pueden influir en la infección y desarrollo de esta enfermedad. En este sentido, Picos *et al.* (2015) analizaron los estudios realizados en México sobre las afectaciones que causó esta enfermedad en la agricultura y manifestaron que varios investigadores coinciden en que elevados valores de humedad relativa y de temperatura favorecen la aparición de este hongo fitopatógeno. Además, plantearon que puede causar importantes pérdidas económicas sobre todo en frutales. También reportan que la fuente principal de infección de este patógeno se da por la presencia de plantas enfermas y restos de poda que quedan tirados en el campo, además, es favorecida por altas temperaturas, lluvias y humedad proporcionada por el riego, este factor ayuda a que las esporas sean expulsadas fuera de los picnidios y se acumulen en la atmósfera que rodea el cultivo y suelo (Muhammad, 2009; Cibrián, 2007, citados en Álvarez, 2015).

Recientemente *Lasiodiplodia pseudotheobromae* especie similar a *L. theobromae*, fue descrita en *Acacia*, *Citrus aurantium*, *Coffea*, *Gmelina* y *Rosa* (Alves *et al.*, 2008). Se ha reportado en diferentes especies del género *Citrus*, pero hasta el momento no se había reportado en lima Persa (*C. latifolia*).

La muerte descendente de árboles frutales puede resultar de la interacción de este patógeno con estrés hídrico, suelos arcillosos, escasa materia orgánica, elevada cantidad de caliza activa, fertilización inadecuada, exceso de riego, alta humedad por sombra intensiva, quemadura de sol, presencia de heridas y suelos compactados que

complican el desarrollo radicular, nutrición y aireación (Reckhaus y Adamou, 1987; Agustí, 2003).

Los árboles pueden ser susceptibles a la enfermedad debido a la presencia de heridas en ramas por causas naturales o por el uso de herramientas de corte en la cosecha y podas, alcalinidad del suelo y desbalance hídrico y nutricional (Ko *et al.*, 2004).

En base a los datos obtenidos en campo y al análisis estadístico se observa la presencia de la enfermedad en todos los municipios del Estado de Morelos, con diferentes porcentajes de incidencia, aun dentro de los mismos municipios, lo que nos permite inferir que existen otros factores como la edad de la planta, manejo agronómico, podas, fertilización, etc, que predisponen la presencia de la enfermedad.

2.3.3. Severidad

La severidad más alta de la muerte regresiva se encontró en huertos ubicados en los municipios de Tlaltizapán (1 huerto) y Coatlán del Río (1), los cuales fueron significativamente diferentes a todos los huertos, correspondiendo al grupo A con 100 % de severidad. En el grupo B se incluyeron a los huertos que presentaron severidades menores de 100%, las cuales van de 61.11 a 99.17 % ubicados en los municipios de Cuautla (1 huerto), Tlaltizapán (3), Coatlán del Río (5), Jantetelco (2), Amacuzac (3), Jonacatepec (1) y Puente de Ixtla (1) (Figura 2. 2). El siguiente grupo correspondió a huertos de lima Persa con porcentajes de infección de 30.81 a 43.39 % ubicados en los municipios de Jantetelco (3 huertos), Puente de Ixtla (2), Coatlán del Río (2) y Amacuzac (1), (Figura 2.3). Los huertos con porcentajes de infección de 9.42 a 27.97 % conformaron el siguiente grupo y se ubicaron en los municipios de Tlaltizapán (5 huertos), Ayala (3), Coatlán del Río (1) y Amacuzac (3). Por último, solo se obtuvo en el municipio de Tlaltizapán (1 huerto), el cual fue significativamente diferente a todos los demás, agrupándose en Q en la prueba de Tukey con un porcentaje de severidad de 5.08% (Cuadro 2. 2 y 2.4).

Varios autores como Briceño *et al.* (2011) y Rodríguez (2010) señalaron que la actividad del hongo se ve favorecida por condiciones de alta humedad ambiental y temperatura de 24 ± 26 °C. Mientras Almaguer *et al.* (2015) coinciden en que las especies del género *Lasiodiplodia* son comunes en los trópicos y causan varias enfermedades en plantas, tanto en las etapas de cultivo como en postcosecha, como *L. theobromae* que afecta a varios cultivos, principalmente frutícolas, siendo las lluvias y el viento los factores que determinan la dispersión de las esporas dentro de las áreas de cultivo.

Los resultados del estudio corroboran que la mayor severidad de los daños producidos por *Lasiodiplodia* spp, ocurren en los municipios ubicados en el Sureste del estado, caracterizado por un clima semicálido, con precipitaciones de 800 mm y temperatura media anual de 24°C , pero debe agregarse un factor predominante en esta región donde se cultiva la lima Persa y es que los suelos tienen una gran afluencia de aguas subterráneas lo que puede ser determinante para la diseminación rápida de este patógeno, como ocurre con otros patógenos en suelos arcillosos.

Previo a este estudio Acosta *et al.* (2012) señalaron, que, en las plantaciones de *C. latifolia*, existía una nueva enfermedad con síntomas externos similares a la gomosis y que los productores equivocadamente estaban manejando como tal. Esta enfermedad estuvo presente en el 44 % de las plantaciones de *C. latifolia* con una incidencia promedio de 10.2 % e intervalo de 1.7 a 25.0 %.

La disminución de la superficie de cítricos ha sido atribuida entre otros factores a los daños por *Phytophthora* (Vidales, 1982; Acosta *et al.*, 2012). Sin embargo, estos resultados preliminares, exponen una afectación creciente, con daños hasta grado 3, con presencia de cancro y muerte descendente de ramas, atribuibles hoy al parecer a varias especies de *Lasiodiplodia*.

Del muestreo y monitoreo realizado durante un año consecutivo de septiembre del 2014 a agosto del 2015, en un principio se pensaba que el patógeno que estaba

causando la enfermedad era *Phytophthora parasitica*, ya que en México se tiene el primer reporte que la gomosis en huertos de lima Persa, ocasionado la eliminación de huertos, además de que incide sobre diferentes tipos de cítricos, pero en el proceso de aislamiento de los patógenos que estaban ocasionando la muerte descendente y la producción de goma, no se logró aislar a *Phytophthora parasitica*, solo se aisló a *Lasiodiplodia* spp. de los diferentes síntomas que comparten con el género *Lasiodiplodia* spp.

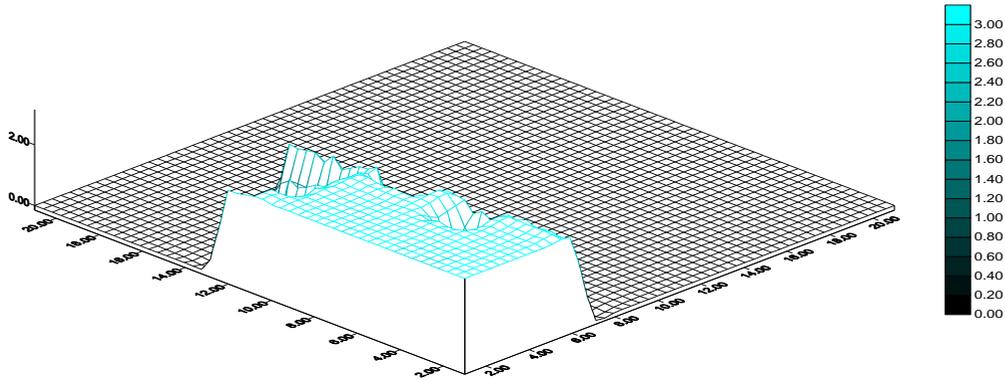


Figura 2. 2. Severidad y dispersión de la muerte descendente en lima Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en un huerto de Coatlán del Río, Morelos. Mostrando daño en casi todos los árboles evaluados con un promedio de 2.4 de severidad.

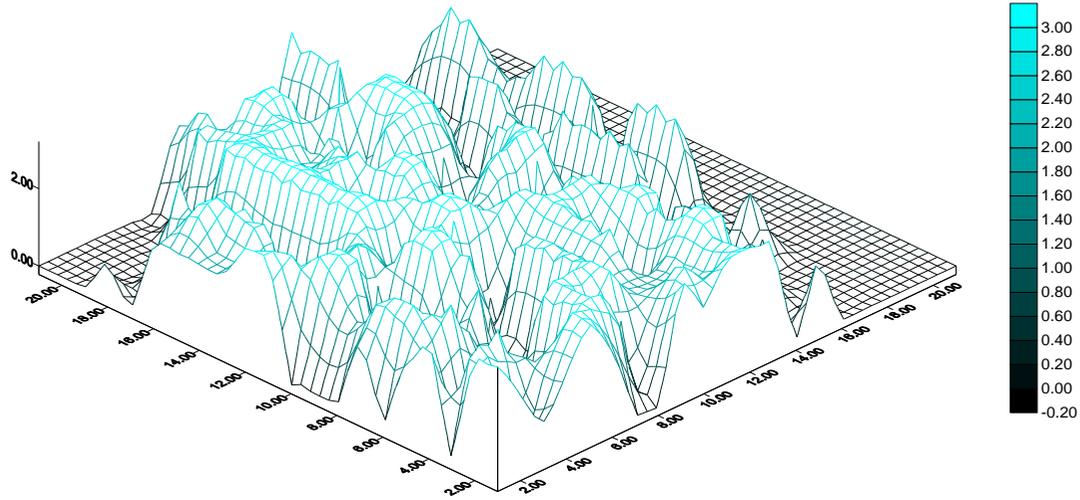


Figura 2. 3. Severidad y dispersión de la muerte descendente en lima Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en un huerto del municipio de Puente de Ixtla, Morelos. Mostrando daño en los árboles evaluados con un promedio de 1.6 de severidad.

La producción de gomosis en los cultivos perennes se conoce que son provocados tanto por especies de *Phytophthora* como de otros hongos fitopatógenos de la familia Botryosphaeriaceae, la cual tiene varias especies que causan manchas foliares, pudriciones de frutas, muerte descendente, canchros y finalmente la muerte de cultivos económicamente importantes como plantas perennes leñosas y plantas ornamentales, así como especies de árboles forestales nativas e introducidas (Burgess *et al.*, 2006; Mohali *et al.*, 2007). Valle *et al.* (2017), reportan al menos tres especies del género *Lasiodiplodia* (*Lasiodiplodia theobromae*, *L. citricola* y *L. pseudotheobromae*), causando gomosis, muerte descendente y la muerte de árboles de lima Persa.

Los miembros de la familia Botryosphaeriaceae (Botryosphaeriales, Dothideomycetes, Ascomycota) son cosmopolitas y presentan una amplia gama de hospedantes monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Barr 1987). Esta familia de hongos fitopatógenos se asocia con diversos síntomas tales como la formación de canchros, pudrición de la fruta, muerte descendente y la gomosis (Barr 1987; Von Arx,

1987, citado en Abdollahzadeh *et al.*, 2010) y también se conocen como endófitos (Slippers y Wingfield, 2007, citado por Phillips *et al.*, 2013).

Los resultados observados del análisis estadístico de la severidad, podemos observar que la enfermedad se presenta con diferentes intensidades en el Estado de Morelos y entre los mismos municipios, lo que nos demuestra que Morelos cuenta con las condiciones adecuadas tanto de temperatura y humedad, idóneas para el desarrollo de esta enfermedad, aunado al mal manejo por parte del productor, lo que desencadena el desarrollo y la propagación de la muerte descendente.

Cuadro 2. 3. Comparación de medias de la incidencia y la severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en huertos de lima Persa, en el estado de Morelos.

No. HUERTO	MUNICIPIO	INCIDENCIA		SEVERIDAD	
		MEDIA REAL	Grupos Tukey	MEDIA REAL	Grupos Tukey
1	TLALTIZAPÁN	32.64	H I G ^z	19.89	P O N Q
2	TLALTIZAPÁN	79.37	E B D A C	65.71	K E J B I D H A G C F
3	TLALTIZAPÁN	23.81	H I	13.02	P Q
4	TLALTIZAPÁN	25.45	I	17.58	P O N Q
5	TLALTIZAPÁN	13.33	I	5.08	Q
6	TLALTIZAPÁN	55.66	E B D H I G C F	40.97	K P J M I O H L N
7	TLALTIZAPÁN	19.82	I	15.34	P O Q
8	JONACATEPEC	97.14	A	71.75	E B D H A G C F
9	TEPALCINGO	70.75	E B D A G C F	49.06	K J M I O H L G N F
10	TEPALCINGO	68.57	E B D H A G C F	55.56	K E J M I D H L G

No. HUERTO	MUNICIPIO	INCIDENCIA		SEVERIDAD	
		MEDIA REAL	Grupos Tukey	MEDIA REAL	Grupos Tukey
11	TEPALCINGO	69.14	E B D A G C F	50.51	K E J M I H L G N F
12	PUENTE DE IXTLA	75.00	E B D A G C F	58.67	K E J I D H L G C F
13	PUENTE DE IXTLA	71.86	E B D A G C F	59.64	K E J I D H L G C F
14	PUENTE DE IXTLA	73.98	E B D A G C F	66.20	K E J B I D H A G C F
15	PUENTE DE IXTLA	49.00	E D H I G C F	33.33	K P J M I O L N Q
16	PUENTE DE IXTLA	55.43	E B D H I G C F	40.54	K P J M I O H L G N
17	COATLÁN DEL RÍO	68.06	E B D H A G C F	64.35	K E J B I D H A G C F
18	COATLÁN DEL RÍO	100.00	A	95.04	B D A C
19	COATLÁN DEL RÍO	73.61	E B D A G C F	67.80	E J B I D H A G C F
20	COATLÁN DEL RÍO	43.95	E H I G F	39.60	K P J M I O H L N
21	COATLÁN DEL RÍO	86.92	B A C	83.29	E B D A C F
22	COATLÁN DEL RÍO	44.31	E D H I G F	40.54	K P J M I O H L G N
23	COATLÁN DEL RÍO	73.78	E B D A C F	69.41	E J B I D H A G C F
24	COATLÁN DEL RÍO	11.97	I	10.76	P Q
25	COATLÁN DEL RÍO	100.00	A	100.00	A
26	AMACUZAC	71.88	E B D A G C F	65.85	K E J B I D H A G C F
27	AMACUZAC	49.29	E D H I G C F	36.63	K P J M I O H L N Q
28	AMACUZAC	16.57	I	9.42	P Q
29	AMACUZAC	20.00	I	11.11	P Q

No. HUERTO	MUNICIPIO	INCIDENCIA		SEVERIDAD	
		MEDIA REAL	Grupos Tukey	MEDIA REAL	Grupos Tukey
30	AMACUZAC	83.64	B D A C	79.85	E B D A C F
31	AMACUZAC	77.88	E B D A C F	77.88	E B D A G C F
32	AMACUZAC	19.52	I	9.84	P Q
33	AYALA	67.33	E B D A G C F	61.11	K E J B I D H L G C F
34	AYALA	25.83	I	19.01	P O N Q
35	AYALA	31.83	H I G	22.01	P M O N Q
36	JANTETELCO	88.18	B A	88.18	E B D A C
37	JANTETELCO	47.61	E D H I G C F	33.41	K P J M O L N Q
38	TLALTIZAPÁN	96.75	A	95.42	B A C
39	TLALTIZAPÁN	36.32	H I G F	27.97	P M O L N Q
40	TLALTIZAPÁN	71.01	E B D A G C F	70.26	E B I D H A G C F
41	TLALTIZAPÁN	100.00	A	100.00	A
42	JANTETELCO	48.15	E D H I G C F	43.39	K P J M I O H L G N
43	CUAUTLA	100.00	A	99.17	B A
44	JANTETELCO	83.78	B A C	83.00	E B D A C F
45	JANTETELCO	44.18	E H I G F	30.81	K P M O L N Q
46	AYALA	15.75	I	16.04	P O N Q

²Letras similares en el sentido de las columnas indican significancia estadística de acuerdo a la prueba de Tukey ($\alpha \leq 0.05$).

Cuadro 2. 4. Porcentaje de Incidencia de la muerte descendente, de los municipios evaluados del estado de Morelos.

ALTA 96.75 – 100%	MEDIA – ALTA 55.43 – 88.18%	MEDIA – BAJA 23.81 – 49%	BAJA 11.97 – 22.45
Cuautla	Amacuzac	Amacuzac	Amacuzac
Coatlán del Río	Ayala	Ayala	Ayala
Jonacatepec	Coatlán del Río	Coatlán del Río	Coatlán del Río
Tlaltizapán	Jantetelco	Jantetelco	Tlaltizapán
	Puente de Ixtla	Puente de Ixtla	
	Tepalcingo	Tlaltizapán	
	Tlaltizapán		

Cuadro 2. 5. Porcentaje de la severidad de la muerte descendente, de los municipios evaluados del estado de Morelos.

ALTA 100%	MEDIA – ALTA 61.11 – 99.17%	MEDIA – BAJA 30.81 – 43.39%	BAJA 5.08 – 27.97
Coatlán del Río	Amacuzac	Amacuzac	Amacuzac
Tlaltizapán	Coatlán del Río	Coatlán del Río	Ayala
	Cuautla	Jantetelco	Coatlán del Río
	Jantetelco	Puente de Ixtla	Tlaltizapán
	Jonacatepec		
	Puente de Ixtla		
	Tepalcingo		
	Tlaltizapán		

2.4. Conclusiones

1. La muerte descendente es una enfermedad que ataca seriamente a los árboles de lima Persa, la cual tiene una gran incidencia en los huertos de cítricos del Estado de Morelos, encontrándose presente en el 100% de las huertas evaluadas en este trabajo. Las incidencias van del 11.97 al 100%, de los cuales el 78% presenta incidencias que oscilan del 31.83 al 100%. La cual es favorecida por los factores edafoclimáticos y el manejo inadecuado que los productores realizan a los huertos.

2. La severidad de la muerte descendente en árboles de lima 'Persa', nos indican que más del 71 % de los huertos evaluados, presentan severidades que van del 30.01 al 100% de porcentaje de infección de la enfermedad, lo cual refleja la importancia de esta enfermedad en la reducción de la rentabilidad del cultivo.

3. Los huertos que presentaron menor incidencia y severidad se ubicaron en los municipios de Amacuzac, Ayala, Coatlán del Río y Tlaltizapán, observándose una relación directa.

4. A pesar de que los municipios que presentaron menor porcentaje de la incidencia y severidad de la enfermedad, se obtuvieron registros de huertos de esos municipios, presentando porcentajes de incidencia y severidad altas, medias y bajas, lo cual nos indica que este patógeno se encuentra ampliamente distribuido en todo el estado de Morelos.

2.5. Literatura citada

- Abdollahzadeh, J; Javadi, A; Mohammadi Goltapeh, E; Zare, R y Phillips, A.J.L. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia*. 2010 Dec; 25: 1–10.
- Acosta Pérez, Jorge Alberto. 2008. Selección de patrones de cítricos tolerantes al virus de la tristeza de los cítricos (VTC) con resistencia a la gomosis de los cítricos en la Sabana de Huimanguillo, Tabasco. Tesis de Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco. Programa de Producción Agroalimentaria en el Trópico. H. Cárdenas, Tabasco. 68 pp.
- Acosta-Pérez, J.A., C.F. Ortiz-García, J.M. Zaldívar-Cruz, M. Rodríguez-Cuevas, C.C. Bautista-Muñoz, C. de la Cruz Castillo Aguilar. 2012. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 28(3): 245-258.
- Agustí, M. 2003. Citricultura. Mundi-Prensa. Madrid, España. 422 p.
- Almaguer C. M; Sánchez E. K.C.; Díaz V. L. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* in the atmosphere of Havana. *Rev. Cubana de Ciencias Biológicas*. 4 (2):130-134.
- Álvarez, L. A. 2015. Eficacia fungicida en el control de *Lasiodiplodia theobromae* en plantas de palto (*Persea americana*) con el uso del bioestimulante a base de algas marinas Fertimar® En línea: www.avocadosource.com/WAC8/Section_03/AlvarezLA2015.pdf. Consultado el 08 de marzo del 2018.
- Alves A, Crous PW, Correia A and. Phillips AJL. 2008. Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28:1-13. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- Barr, M. E. 1987. *Prodromus to Class Loculoascomycetes*. Amherst, Massachusetts: Published by the author.
- Briceño G, García J, Maselli A, Rosales L. 2011. Efecto de extractos etanólicos de ruda y neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género *Erwinia*. *Agronomía Tropical*, 61(2):141-148.

- Burgess, T. I., Barber, P.A., Mohali, S., Pegg, G., De Beer, Z.W., Wingfield, M. J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. From the tropics, recognised based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98:423-35.
- CESVMOR. 2018. Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos. Campaña contra huanglongbing de los cítricos. Primer reporte de enero del 2018. Recuperado el 18 de septiembre del 2018. <https://cesvmor.org.mx/informes-mensuales-sanidad-vegetal-2018/>
- Christensen, J. 2017. Common Diseases of Lime Trees. En línea: <https://www.gardeningchannel.com/common-diseases-of-lime-trees/>. Consultado el 01 de noviembre del 2017.
- Da Silva Morales, Wilson; Antônio De Castro, Hilario; Domínguez Lima, Juliana; Das Graças Leite, Eloísa Aparecida y De Souza, Mauricio. 2007. Susceptibilidades de três espécies cítricas à *Dothiorella gregaria* Sacc. em função do estado nutricional susceptibility of three citrus species to *Dothiorella gregaria* Sacc. in function of the nutritional state. *Ciência Rural*, Vol.37 (1), p.7.
- Enciclopedias de los municipios y delegaciones de México. 2018. Estado de Morelos. Coatlán del Río. En línea: <http://siglo.inafed.gob.mx/enciclopedia/EMM17morelos/municipios/17005a.html>. Consultado el 01 de diciembre del 2018.
- FAOSFAT. 2018. Citrus Fruit Fresh and Processed. Statistical Bulletin 2016. En línea: <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es/>. Consultado el 9 de marzo del 2018.
- INEGI. 2018. CLIMA MORELOS. Consulta: 10/02/2018 en: www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mor/territorio/clima.aspx?tema=me&e=17.
- INTAGRI. 2018. La producción de limón en México. Serie Frutales Núm. 41. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 5p. En línea: <https://www.intagri.com/index.php/articulos/frutales/la-produccion-de-limon-en-mexico>. Consultado el 15 de junio del 2018.

- Khazada, M. A., Lodhi, A. M., and Shahzad, S. 2004. Mango dieback and gummosis in Sindh, Pakistan caused by *Lasiodiplodia theobromae*. En línea: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2004/mango/>. Plant Health Progress doi:10.1094/PHP-2004-0302-01-DG. Consultado el 13 de marzo del 2018.
- Ko, W. H., I. T. Wang, and P. J. Ann. (2004). *Lasiodiplodia theobromae* as a causal agent of Kumquat dieback in Taiwan. Plant Dis. 88: 1383.
- Orozco-Santos, M. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 150 p.
- Romero Cova, Sebastián, 1993. Hongos fitopatógenos. Impreso en México. ISBN-968-884-042-4. Universidad Autónoma Chapingo. 347 pp.
- Schwentesi Rindermann, Rita and Manuel Ángel Gómez Cruz. 2005. Limón Persa. Tendencias en el mercado mexicano. Ed. CIESTAAM/UACH y Banco Mundial, México, D.F. 158 pp. ISBN: 968-02-0167-8. <http://www.concitur.com/archivosenpdf/Limonpersa2005.pdf>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2018. Producción Anual. Cierre de la producción agrícola por cultivo. En línea: http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=15. Consultado en línea el 13 de febrero de 2018.
- Mohali, S., Slippers, B., Wingfield, M. J. 2007. Identification of Botryosphaeriaceae species from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. Fungal Diversity 25: 143-65.
- Picos M.P.A; García E.R.S; León F.J; Sañudo- B.A; Allende M.R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 33, núm. 1, pp. 54-74. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Texcoco, México.
- Phillips, J. L., Alan, Slippers Bernard, Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2013. Plant pathogenic and endophytic Botryosphaeriales known from culture. *Studies in Mycology* 76:84.

- Reckhaus, P., and I. Adamou. 1987. Hendersonula dieback of mango in Niger. Plant Dis. 71: 1045.
- Rodríguez G. E. 2010. *Lasiodiplodia theobromae*: fitopatógeno de mango (*Mangifera indica*) y palto (*Persea americana*). Lima: Manufacturas Gráficas S.A.C.
- Valle-de la Paz. M., Guillén-Sánchez. D., Alía-Tejacal. I., López-Martínez. V., Juárez-López. P., Martínez-Fernández, E., Perales-Rosas, D., Hernández-Arenas, M., y Ariza-Flores, R. 2017. Control *in vitro* con fungicidas sobre *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl y *L. citricola* Abdollahz aislados de lima Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en Morelos, México. Congreso internacional de las Ciencias Agropecuarias. Agrocencias 2017. Memorias con ISBN 958-959-16-3592. Realizado en la Habana, Cuba del 20 al 24 de noviembre del 2017. 1255pp.
- Vidales F. J. A. 1982. Etiología de la Gomosis de los Cítricos en Tecomán, Colima y búsqueda de fuentes de resistencia. Tesis de Maestría. Chapingo, México, Abril de 1982.

CAPÍTULO III

CONTROL *IN VITRO* CON FUNGICIDAS SOBRE *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl y *L. citricola* Abdollahz AISLADOS DE LIMA Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) EN MORELOS, MÉXICO.

Resumen

La muerte descendente es una enfermedad importante en lima Persa. Reportan una incidencia del 40 al 70% de muerte descendente en este cultivo. El objetivo del trabajo fue evaluar *in vitro* nueve fungicidas para inhibir el crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* y *L. citricola*. Las cepas identificadas molecularmente con número de acceso GenBank *Lasiodiplodia theobromae* KY284587 y *L. citricola* KY271187, colectadas de árboles de lima Persa de los municipios de Tlaltizapán y Jantetelco respectivamente, del Estado de Morelos, México. Los tratamientos fueron evaluados mediante el método de dilución en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), los hongos se purificaron por el método de punta de hifa, se colocó un disco de 0.5 cm con micelio de los hongos en el centro de cajas Petri, se evaluaron cada 24 hr., tres dosis diferentes con cinco repeticiones cada una y su testigo, los cuales fueron: Ziram, Carbendazim, Thiram, Tiofanato metílico, Tiabendazol, Cyprodinil + fludioxonil, Iprodiona, *Trichoderma harzianum*, Benomilo y un testigo sin fungicida, todos ellos diluidos en 100 mL medio de PDA. Se uso un diseño experimental completamente al azar, se realizó un ANOVA simple con la prueba Kruskal-Wallis, $\alpha \leq 0.05$. *Lasiodiplodia theobromae* fue sensible a todas las dosis de fungicidas con 0.0 diámetro de crecimiento micelial. En *Lasiodiplodia citricola* los fungicidas Ziram, Carbendazim, Thiram, Tiofanato metílico, Tiabendazol, Iprodiona, *Trichoderma harzianum*, Benomilo fueron más efectivos con 0.0 diámetro de crecimiento micelial que Cyprodinil + fludioxonil y el testigo absoluto, siendo estadísticamente diferentes.

Palabras clave: *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia citricola*, *Citrus latifolia*, muerte descendente, fungicidas.

CONTROL IN VITRO WITH FUNGICIDES ON *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl and *L. citricola* Abdollahz ISOLATED FROM LIMA PERSA (*Citrus latifolia* Tanaka) IN MORELOS, MEXICO

Abstract

The dieback is an important disease in 'Persian' lime. They report an incidence of 40 to 70% of descending death in this crop. The objective of the work was to evaluate *in vitro* nine fungicides to inhibit the mycelial growth of *Lasiodiplodia theobromae* and *L. citricola*. The molecularly identified strains with accession number GenBank *Lasiodiplodia theobromae* KY284587 and *L. citricola* KY271187, collected from 'Persian' lime trees from the municipalities of Tlaltizapan and Jantetelco respectively, from the State of Morelos, Mexico. The treatments were evaluated by means of the dilution method in potato-dextrose-agar culture medium (PDA), the fungi were purified by the hyphal tip method, a 0.5 cm disc was placed with mycelium of the fungi in the center of Petri dishes, were evaluated every 24 hr., three different doses with five repetitions each and its control, which were: Ziram, Carbendazim, Thiram, Methyl thiophanate, Thiabendazole, Cyprodinil + fludioxonil, Iprodione, *Trichoderma harzianum*, Benomilo and a control without fungicide, all of them diluted in 100 mL of PDA medium. A completely randomized experimental design was used, a simple ANOVA was performed with the Kruskal-Wallis test, $\alpha \leq 0.05$. *Lasiodiplodia theobromae* was sensitive to all doses of fungicides with 0.0 mycelial growth diameter. In *Lasiodiplodia citricola* the fungicides Ziram, Carbendazim, Thiram, Methyl thiophanate, Thiabendazole, Iprodione, *Trichoderma harzianum*, Benomilo were more effective with 0.0 mycelial growth diameter than Cyprodinil + fludioxonil and the absolute control, being statistically different.

Key words: *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia citricola*, *Citrus latifolia*, dieback, fungicides.

3.1. Introducción

La producción de cítricos en México, en especial de lima Persa (*Citrus latifolia* Tanaka), se ha orientado la producción para el consumo en fresco, hoy en día es el exportador líder de esta fruta a escala mundial (Schwentenius y Gómez, 2005). La producción nacional para el 2016, fue de 5.75 millones de toneladas con un valor de la producción de 16,781 millones de pesos, para ese año la superficie sembrada de cítricos fue de 533,749 ha, de las cuales 180,252 ha fueron de limón, 17,887 ha de toronja y 335,610 ha de naranja dulce (SIAP, 2016).

Los productores mayores de lima Persa son Veracruz (717,014 t), Michoacán (619,612 t) y Oaxaca (263,448 t), Morelos ocupa el doceavo lugar con una producción de 3880 t. Para el 2010, tenía huertas de cítricos establecidas en 28 de los 33 municipios, con 1000 ha., de superficie sembrada con una producción alta y calidad de exportación, actualmente cuenta con una superficie establecida de 612 ha sembradas en 17 municipios, de éstas destaca la lima Persa y la naranja valencia, con 32 y 66% de la superficie total establecida, respectivamente, y un rendimiento de 12.11 y 7.76 ton/ha respectivamente, siendo ambas especies las de mayor importancia económica, el resto de la superficie está compuesta de todos los demás cítricos (CESVMOR, 2010; SIAP, 2016).

Los productores asociaban al patógeno *Phytophthora parasitica* con los síntomas de gomosis y muerte descendente, debido a que varios autores habían determinado a este patógeno como el agente causal, tal como Fawcett (1936) que la encontró en Argentina atacando cítricos. Frezzi (1950), reporta a varias especies de cítricos como hospedantes de este patógeno, incluidos, por orden cronológico *Citrus sinensis* (1937), *C. aurantifolia* (1938), *C. nobilis* (1939), *C. limonia* (1939). En México Vidales (1986), reporta por primera vez a esta especie ocasionando la gomosis en la región citrícola del Estado de Colima. Acosta *et al.* (2012) menciona que la gomosis o pudrición del pie de los cítricos ha sido una de las enfermedades más importantes ya que anualmente produce la muerte de muchos árboles de cítricos de pie franco e

injertados, por este patógeno en lima Persa. Estos antecedentes fueron considerados en Morelos para recomendar a los productores de cítricos la aplicación de Fosetil Aluminio y Metalaxil, pero sin éxito en el control de esta enfermedad.

Valle *et al.* (en proceso de publicación), en el 2015 realizó la identificación y el reporte de otras especies ocasionando la gomosis y muerte descendente en árboles de lima Persa en el estado de Morelos, tales como *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*, dichas especies son miembros de la familia Botryosphaeriaceae (Botryosphaerales, Dothideomycetes, Ascomycota), son cosmopolitas y se encuentran en una diversidad de hospedantes monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas (Abdollahzadeh *et al.*, 2010).

La muerte descendente es una enfermedad importante en lima Persa en el estado de Morelos, con incidencias de 40 a 70% (Valle *et al.*, 2015). El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro* diversos fungicidas químicos y uno biológico en la inhibición micelial de *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia citricola*.

3.2. Materiales y métodos

Dos cepas identificadas molecularmente con número de acceso GenBank *Lasiodiplodia theobromae* KY284587 y *Lasiodiplodia citricola* KY271187, las cuales fueron aisladas de tallo principal de árboles de lima Persa de los municipios de Tlaltizapán y Jantetelco respectivamente, del Estado de Morelos, México, fueron utilizadas para este estudio. Estas cepas mostraron la producción de goma y muerte descendente en árboles de 8 años de edad. El trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

El método que se utilizó fue por envenenamiento del medio donde los fungicidas fueron diluidos en el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), los tratamientos evaluados se especifican en el Cuadro 3.1.

Cada tratamiento fue diluido en 100 mL de medio PDA (BD Bioxon®) previamente esterilizado en autoclave, el PDA sin fungicida se utilizó como control (Cuadro 3.1). Aproximadamente 15 mL de medio con fungicida fue vertido en cada caja Petri. En el centro de cada caja Petri se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro con medio de cultivo y micelio de tres días de edad, previamente purificados por el método de punta de hifa. Las cajas se incubaron a 28 °C.

El diámetro de las colonias se evaluó cada 24 h con un vernier digital, hasta que el testigo (sin fungicida) llenó la caja completamente.

Se usó un diseño experimental completamente al azar, con 28 tratamientos (tres dosis de nueve fungicidas y un testigo sin fungicida) y cinco repeticiones. Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de medias con la prueba Tukey ($\alpha \leq 0.05$) mediante SAS V. 9.1.

3.3. Resultados y Discusión

Lasiodiplodia theobromae fue muy sensible a todas las dosis de los fungicidas pues no presentó crecimiento micelial en comparación con el testigo absoluto quien llenó la caja Petri a las 120 horas después de la siembra de los tratamientos. De manera similar *Lasiodiplodia citricola* fue muy sensible los fungicidas Ziram, Carbendazim, Thiram, Tiofanato metílico, Tiabendazol, Iprodiona, *Trichoderma harzianum* y Benomilo, quienes inhibieron completamente el crecimiento micelial. El tratamiento con Cyprodinil + fludioxonil presentaron crecimiento a partir de las 48 horas después de la siembra de los tratamientos, alcanzando un diámetro máximo de 1.9 cm,

Cuadro 3. 1. Fungicidas evaluados *in vitro* sobre *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia citricola*, aislado de lima Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) con síntomas de gomosis y muerte descendente de las zonas cítricas de Tlaltizapán y Jantetelco municipios del Estado de Morelos. México.

Grupo químico	Ingrediente activo (i. a.)	Modo de acción	% i.a.	Formulación	Tratamientos		
					Dosis (g/100 mL agua)		
					alta	media	baja
Ditiocarbamato	Ziram	C	76	GD	0.4	0.35	0.3
Benzimidazol	Carbendazim	S	50	WG	0.19	0.15	0.11
Ditiocarbamato	Thiram	C	80	GD	0.19	0.15	0.11
Benzimidazol	Tiofanato metílico	S	70	PH	0.1	0.08	0.06
Benzimidazol	Tiabendazol	S	60	WP	0.29	0.24	0.19
Anilino- pirimidinas/ Fenilpirroles	Cyprodinil + fludioxonil	C y S	37.5	WP	0.39	0.31	0.23
Dicarboximidas	Iprodiona	C	50	PH	0.58	0.39	0.19
Biofungicida	<i>Trichoderma harzianum</i>	C	1 x 10 ⁸ UFC/g	PH	0.58	0.39	0.19
Benzimidazol	Benomilo	S	50	PH	0.09	0.075	0.06
-----	Testigo absoluto	-----	-----	-----	0	0	0

S= Fungicida sistémico, **C** = Fungicida de contacto, **GD**= Gránulos dispersables, **WG**= Gránulos dispersables, **PH**= Polvo humectable, **WP**= Polvo mojable.

mientras que el testigo absoluto llenó completamente la caja a las 96 horas después. Aunque *in vitro* las dosis de los fungicidas evaluados lograron una inhibición completa en el crecimiento micelial de *Lasiodiplodia citricola* y *Lasiodiplodia theobromae*, se requiere realizar pruebas de campo para determinar los productos promisorios que puedan lograr un control satisfactorio de la enfermedad causada por estos patógenos, debido a que intervienen otros factores que pueden afectar la efectividad del producto y limitan que los productos entren en contacto con el hongo dentro del hospedero.

Tovar *et al.* (2013), evaluaron *in vitro* la mezcla de cyprodinil + fludioxinil sobre *L. theobromae*, causante de la muerte descendente en varetas de mamey obtuvieron una $EC_{50} = 0.0043 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nath *et al.* (2014), evaluaron *in vitro* la efectividad de mancozeb a 2500 ppm contra *L. theobromae*, causante de la pudrición de frutos de banano después de la cosecha en la región del sur de Gujarat, India, este fungicida inhibió completamente el crecimiento micelial de *L. theobromae*, mientras que *T. harzianum* inhibió el crecimiento micelial de *L. theobromae* en 47.5%, mostrando un antagonismo moderado. Banik y Alabama (1998), reportaron la inhibición del crecimiento micelial de *Botryodiplodia theobromae*, agente causal de la pudrición de frutos de mango, por carbendazim (400 ppm), seguido de captan (450 ppm), tiofanato metílico (450 ppm), Ziram (600 ppm) y clorotalonil (650 ppm). Yadav y Majumdar (2004), reportaron la efectividad de carbendazim y mancozeb contra *L. theobromae* (aislado de guayaba). Muhammad *et al.* (2005), observaron una inhibición significativa del crecimiento micelial de *L. theobromae* por carbendazim y tiofanato-metílico cuando se usa a 1 ppm o más del ingrediente activo. Varela *et al.* (2013), reportaron en cítricos, la aplicación de benomilo y compuestos a base de oxiclورو de cobre contra *L. theobromae* en las distintas etapas del cultivo. Li *et al.* (1995), evaluaron fungicidas contra *L. theobromae* y *Botryosphaeria dothidea* causantes de gomosis en duraznos y albaricoque, encontraron que metil-tiofanato inhibió el crecimiento micelial, la germinación de conidios y controló el desarrollo de la enfermedad en árboles de albaricoque. Da Silva *et al.* (2012), evaluaron la sensibilidad de *L. theobromae* hacia dos grupos de fungicidas, concluyendo que un 91.6 % de 120 aislados provenientes de huertos de papaya fueron sensibles a los ingredientes activos del grupo de carbamatos del tipo metil benzimidazol (benomilo y tiabendazol). En el grupo de fungicidas del tipo inhibición por demetilación (Imazalil, procloraz, tebuconazol) se encontró gran variabilidad en cuanto al grado de sensibilidad de los aislados analizados, concluyendo que *L. theobromae* es menos sensible a este grupo de fungicidas. Bester *et al.* (2007), evaluaron diez fungicidas *in vitro*, para observar la eficacia en la inhibición micelial de las cuatro especies más comunes o patógenas de Botryosphaeriaceae en Sudáfrica, *Botryosphaeria obtusa*, *Neofusicoccum australe*, *N. parvum* y *Lasiodiplodia theobromae*. Iprodiona, pyrimethanil, acetato de cobre y

amonio, kresoxim-metilo y boscalid fueron ineficaces para inhibir el crecimiento micelial a las concentraciones más altas ensayadas (20 µg / mL para el acetato de cobre y amonio, 5 µg / mL para otros productos evaluados). Benomilo, tebuconazol, cloruro de manganeso, procloraz y flusilazol fueron los fungicidas más efectivos con valores de EC₅₀ para las diferentes especies que oscilaron entre 0.36-0.55, 0.07-0.17, 0.07-1.15 y 0.04-0.36 µg / mL, respectivamente. Rehana *et al.* (2014), realizaron estudios comparativos de seis fungicidas (Carbendazim, Gemstar, Nativo, Score, Tecto y Tilt), cada uno se evaluó en siete concentraciones (1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm, 10000 ppm, 20000 ppm y 30000 ppm), todos los fungicidas a altas concentraciones resultaron efectivos en inhibir el crecimiento de *L. theobromae*, en el caso de Carbendazim y Tecto (tiabendazol) resultaron ser casi en todas las dosis evaluadas efectivos en la inhibición del crecimiento micelial, excepto en 1 ppm y 10 ppm respectivamente.

3.4. Conclusiones

1. *Lasiodiplodia theobromae* fue altamente sensible a las tres dosis de los fungicidas Ziram, Carbendazim, Thiram, Tiofanato metílico, Tiabendazol, Cyprodinil + fludioxonil, Iprodiona, *Trichoderma harzianum*, Benomilo, con inhibición total del crecimiento micelial.

2. *Lasiodiplodia citricola* fue muy sensible a las tres dosis de los fungicidas Ziram, Carbendazim, Thiram, Tiofanato metílico, Tiabendazol, Iprodiona, *Trichoderma harzianum* y Benomilo y fue moderadamente sensible a las dosis de Cyprodinil + fludioxonil.

3.5. Literatura citada

- Abdollahzadeh J, Javadi A, Goltapeh EM, Zare R, Phillips AJL. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Irán. 2010. *Persoonia* 25:1–10.
- Acosta, P. J. A., Ortiz, G. C. F., Zaldívar, C. J. M., Rodríguez, C. M., Bautista, M. C. C., and Castillo, A. C. C. 2012. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 28(3):245-258.
- Banik AK, SI Kaiser KM, Dhua RS. 1998. Evaluation of some systemic and non systemic fungicides against *Botryodiplodia theobromae*, the cause of dieback disease of mango. *J. Soil & Crops*, 8: 199-222.
- Bester, W., Crous, P. W. y Fourie, P. H. 2007. Evaluation of fungicides as potential grapevine pruning wound protectants against *Botryosphaeria* species. *Australasian Plant Pathology*. January 2007, Volume 36, Issue 1, pp 73–77.
- CESVMOR. 2010. (Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos). Situación actual de la citricultura en el Estado de Morelos. En: *Monitor Agrícola* 14:5-13.
- Da Silva A, Brainer R, Michereff S, da Silva M and Saraiva M. 2012. Sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* from Brazilian papaya orchards to MBC and DMI fungicides. *European Journal of Plant Pathology* 132:489-498.
- Fawcett, H. S. 1936. *Citrus Diseases and Their Control*. McGraw-Hill, New York. 2a. Ed.
- Frezzi, M. J. 1950. *Las especies de Phytophthora en la Argentina*. Min. Agric. Y Ganad. Buenos Aires, Argentina.
- Li HY, Cao RB and Mu YT. 1995. *In vitro* inhibition of *Botryosphaeria dothidea* and *Lasiodiplodia theobromae*, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop Protection* 14:187-191.

- Muhammad AK, Lodhi AM, Saleem S. 2005. Chemical control of *Lasiodiplodia theobromae* the causal agent of mango decline in Sindh. Pak. J. Bot. 37: 1023-1030.
- Nath K, Solanky KU, Kumawat GL. 2014. Effective approaches of potential bioagent, phytoextract, fungicide and cultural practice for management of banana fruit rot disease. J Plant Pathol Microb 5: 246. doi:10.4172/2157-7471.1000246
- Rehana N. Syed, Nobel Mansha, Muhammad A. Khaskheli, Muhammad A. Khanzada, Abdul M. Lodhi. 2014. Chemical control of stem end rot of mango caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Pak. J. Phytopathol., Vol. 26 (02) 2014. 201-206. ISSN: 2305-0284 (En línea) <http://www.pakps.com>
- Phillips, J. L., Alan, Slippers Bernard, Groenewald, J. Z., and Crous, P. W. 2013b. Plant pathogenic and endophytic Botryosphaerales known from culture. Studies in Mycology 76:84.
- Schwentenius Rinderman, Rita y Gómez Cruz, Manuel Ángel. 2005. Lima Persa. Tendencias en el mercado. Universidad Autónoma Capingo- Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial- Programa Integración Agricultura Industrial (PIAI-CIESTAAM). ISBN: 968-02-0167-8. Impreso en México. Imprenta Universitaria UACH. 152 pp.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2017. México es 2º productor mundial de este cítrico. En línea: <http://www.gob.mx/siap/articulos/limon-casi-2-44-millones-de-toneladas-en-201> Consultado en línea el 14 de junio de 2017.
- Tovar Pedraza, J. M., Mora Aguilera, J. A., Nava Díaz, C., Téliz Ortiz, D., Villegas Monter, A. y Leyva Mir. S. G. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stearn) grafts in Mexico. Rev. Fitotec. Mex. Vol. 36 (3): 233 - 238, 2013.
- Valle, de la P. M., Guillén, S. D., Alia, T. I., López, M. V., Juárez, L. P., Martínez, F. E., Hernández, A. M., and Ariza, F. R. 2015. Incidencia y severidad de la gomosis (*Phytophthora* sp.) en lima Persa, en Morelos, México. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología 33:S180.

- Varela FSE, Orozco SM, Torres ARI y Silva AGL. 2013. Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas 428 p.
- Vidales, F. J. A. 1982. Etiología de la gomosis de los cítricos en Tecomán, Colima y búsqueda de fuentes de resistencia. 1982 abril. Tesis de maestría. Chapingo, México.
- Yadav RK, Majumdar VL. 2004. Efficacy of plant extracts, biological agents and fungicides against *Lasiodiplodia theobromae* incited die back of guava (*Psidium guajava*). J. Mycol. Pl. Pathol. 34: 415-417.



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado



Cuernavaca, Mor., a 25 de septiembre de 2018.

M. en C. JOSÉ EDUARDO BAUTISTA RODRÍGUEZ
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: **Muerte descendente (*Lasiodiplodia* sp. Pat.) en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka), en el Estado de Morelos**, que presenta: **M.C. MAIREL VALLE DE LA PAZ**, mismo que fue desarrollado bajo mi dirección y que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor 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

DR. DAGOBERTO GUILLEN 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

Jefatura de programas educativos de posgrado



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Mor., a 25 de septiembre de 2018.

M. en C. JOSÉ EDUARDO BAUTISTA RODRÍGUEZ
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: **Muerte descendente (*Lasiodiplodia* sp. Pat.) en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka), en el Estado de Morelos**, que presenta: **M.C. MAIREL VALLE DE LA PAZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLEN SÁNCHEZ**, que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor 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

DR. IRÁN ALÍA TEJACAL
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



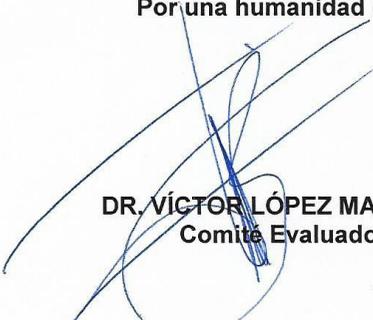
Cuernavaca, Mor., a 25 de septiembre de 2018.

M. en C. JOSÉ EDUARDO BAUTISTA RODRÍGUEZ
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: **Muerte descendente (*Lasiodiplodia* sp. Pat.) en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka), en el Estado de Morelos**, que presenta: **M.C. MAIREL VALLE DE LA PAZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLEN SÁNCHEZ**, que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor 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


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

Jefatura de programas educativos de posgrado



Cuernavaca, Mor., a 25 de septiembre de 2018.

M. en C. JOSÉ EDUARDO BAUTISTA RODRÍGUEZ
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: **Muerte descendente (*Lasiodiplodia* sp. Pat.) en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka), en el Estado de Morelos**, que presenta: **M.C. MAIREL VALLE DE LA PAZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLEN SÁNCHEZ**, que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor 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.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

DR. PORFIRIO JUÁREZ LÓPEZ
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

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Mor., a 25 de septiembre de 2018.

M. en C. JOSÉ EDUARDO BAUTISTA RODRÍGUEZ
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: **Muerte descendente (*Lasiodiplodia* sp. Pat.) en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka), en el Estado de Morelos**, que presenta: **M.C. MAIREL VALLE DE LA PAZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLEN SÁNCHEZ**, que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor 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.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

DR. EDGAR MARTÍNEZ FERNÁNDEZ
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

Jefatura de programas educativos de posgrado



FACULTAD DE CIENCIAS
AGROPECUARIAS

Cuernavaca, Mor., a 25 de septiembre de 2018.

M. en C. JOSÉ EDUARDO BAUTISTA RODRÍGUEZ
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: **Muerte descendente (*Lasioidiplodia* sp. Pat.) en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka), en el Estado de Morelos**, que presenta: **M.C. MAIREL VALLE DE LA PAZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLEN SÁNCHEZ**, que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor 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.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

DRA. MARIAN HERNÁNDEZ ARENAS
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



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

Jefatura de programas educativos de posgrado



Cuernavaca, Mor., a 25 de septiembre de 2018.

M. en C. JOSÉ EDUARDO BAUTISTA RODRÍGUEZ
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: **Muerte descendente (*Lasiodiplodia* sp. Pat.) en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka), en el Estado de Morelos**, que presenta: **M.C. MAIREL VALLE DE LA PAZ**, mismo que fue desarrollado bajo la dirección del **DR. DAGOBERTO GUILLEN SÁNCHEZ**, que servirá como requisito parcial para obtener el grado de **Doctor 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

DR. RAFAEL ARIZA FLORES
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

RECTORIA
2017-2023