



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**IDENTIFICACIÓN, PATOGENICIDAD Y SENSIBILIDAD A  
FUNGICIDAS DE HONGOS ASOCIADOS A LA MUERTE DE  
RAMAS EN LIMÓN PERSA (*Citrus latifolia* Tanaka) EN  
SINALOA**

---

Por:

**Perla Rubí Núñez García**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE PRODUCTOS AGRÍCOLAS PARA  
ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de tesis de la C. Perla Rubí Núñez García, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.




---

M. C. José Armando Carrillo Fasio  
Director de Tesis




---

Dr. Juan Manuel Tovar Pedraza  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. José Benigno Valdez Torres  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Carlos Alfonso López Orona  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Identificación, Patogenicidad y Sensibilidad a Fungicidas de Hongos Asociados a la Muerte de Ramas de Limón Persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en Sinaloa” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial de la autora Perla Rubí Núñez García, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del director(a) de tesis.



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pablo Wong Gonzalez', written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong Gonzalez  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a CONACYT por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de posgrado.

A CIAD, A.C., por abrirme sus puertas y apoyarme para concluir satisfactoriamente mis estudios de posgrado.

A M.C. José Armando Carrillo Fasio por haber confiado en mí y aceptarme en su equipo de trabajo, por todas las oportunidades y experiencias de las cuales aprendí día a día, y por todas las enseñanzas transmitidas.

A Dr. Juan Manual Tovar Pedraza por su apoyo incondicional durante mi desempeño académico, por solucionar todas las dudas que me surgieron durante el proceso y por la confianza brindada.

A Dr. José Benigno Valdez Torres por apoyarme y guiarme académicamente.

A Dr. Carlos Alfonso López Orona por apoyarme durante mis estudios.

A mis profesores de la maestría por ilustrarme en el mundo de la ciencia.

A Ing. Brissa Darinka Plata Vargas por apoyarme y enseñarme a utilizar los instrumentos del laboratorio de Nematología.

Al Dr. Edgar Humberto Nieto López por su apoyo durante al análisis de datos en la prueba de sensibilidad.

A Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero por su contribución con los análisis moleculares y por compartir sus conocimientos conmigo.

A Dra. Kamila Câmara Correia por su contribución durante de los análisis filogenéticos.

A Dra. Alma Rosa Solano Báez por el apoyo brindado durante la identificación morfológica de los aislados.

A M.C. Juan Luis Pérez Mora por su apoyo en la búsqueda de huertos de limón Persa en Sinaloa.

A mi compañera M.C. Rita Judith Salazar Mesta por apoyarme durante el desarrollo de mi proyecto y hacerme compañía en los días de soledad en el laboratorio.

A Gregorio Gonzales Torres por su apoyo diario durante el desarrollo de mi proyecto.

## **DEDICATORIA**

**A MI FAMILIA POR APOYARME INCONDICIONALMENTE,  
MOTIVARME Y NO DEJARME CAER ANTE LA ADVERSIDAD.**

## CONTENIDO

<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	5
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	10
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	18
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	19
3.1. Los Cítricos ( <i>Citrus</i> spp.) .....	19
3.1.1. Taxonomía.....	19
3.2. Importancia Económica de los Cítricos.....	20
3.2.1. Importancia Económica de los Cítricos en Sinaloa.....	20
3.3. Enfermedades en Cítricos.....	21
3.3.1. Enfermedades Fúngicas de la Madera por Botryosphaeriaceae.....	21
3.3.2. <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	22
3.3.3. Muerte Descendente de las Ramas de Cítricos por <i>Lasiodiplodia</i> spp...	23
3.4. Identificación Morfológica de <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	24
3.5. Control de <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	26
3.5.1. Control Químico.....	26
3.5.1.1. Fungicidas metil benzamidazol carbamatos (MBC).....	26
3.5.1.2. Fungicidas inhibidores de la quinona (QoI).....	27
3.5.1.3. Fungicidas inhibidores de la succinato hidrogenasa (SDHI).....	28
3.5.1.4. Fungicidas anilo pirimidinas (AP).....	28
3.5.1.5. Fungicidas cloronitrilos.....	29
3.5.2. Control con Extractos Vegetales.....	29
3.5.2.1. Extractos vegetales.....	29
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	31
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	32
5.1. Objetivo General.....	32
5.2. Objetivos Específicos.....	32
<b>6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO</b> .....	33
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	34
7.1. Recolección de Material Biológico.....	34
7.2. Aislamiento de los Hongos.....	35
7.3. Identificación.....	36
7.3.1. Morfológica.....	36

## CONTENIDO (continuación)

7.3.2. Molecular .....	36
7.3.2.1. Filogenia.....	38
7.4. Pruebas de Patogenicidad.....	40
7.5. Sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Lasiodiplodia</i> spp. a Fungicidas.....	40
7.6. Análisis estadístico de la prueba de patogenicidad.....	41
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
8.1. Estudio de Campo.....	43
8.2. Recolecta de Muestras y Aislamiento de los Hongos.....	43
8.3. Identificación Morfológica.....	43
8.4. Análisis Filogenéticos.....	46
8.5. Distribución de las Especies de <i>Lasiodiplodia</i> .....	47
8.6. Patogenicidad y Virulencia en Ramas.....	48
8.7. Prueba de Sensibilidad a Fungicidas.....	50
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>10. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Síntomas de muerte descendente en árboles de limón Persa. (A) árbol sano, (B) presencia de exudación de goma en el tronco principal o en ramas primarias y secundarias, (C) agrietamiento visible con exposición de tejidos internos, (D) y (E) muerte descendente (Valle de la Paz <i>et al.</i> , 2019a).....	23
2	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> . (A) y (B) Asca, (C) y (D) Ascosporas, (E) e (I) Capa conidiógena con células conidiógenas y paráfisis, (F) Paráfisis hialina, (G) Conidios inmaduros, (H) Desarrollo de conidios, (J) y (K) Conidios estriados maduros con paredes oscuras (Phillips <i>et al.</i> , 2013).....	25
3	Síntomas de muerte descendente en limón Persa ( <i>Citrus latifolia</i> ) asociado con Botryosphaeriaceae en Sinaloa. (A) Árbol con ligero amarillamiento foliar. (B) Árbol con muerte descendente de ramas y severa defoliación. (C) Árbol con muerte de ramas, frutos y hojas. (D) Picnidios en la superficie del tronco.....	35
4	Morfología de aislados de <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (A–D), <i>L. brasiliense</i> (E–H), <i>L. jatrophicola</i> (I–L) y <i>L. subglobosa</i> (M–P) asociados a síntomas de muerte descendente de ramas de limón Persa en Sinaloa, México. A, E, I, M) Colonias en PDA después de 7 días de crecimiento a 28°C en oscuridad continua. (B, F, J, N) Picnidios. (C, G, K, O) Conidios inmaduros. (D, H, L, P) Conidios maduros. Barras de escala: B, F, J, N = 50 µm; C, D, G, H, K, L, O, P= 10 µm.....	45
5	Árbol filogenético de las especies de <i>Lasiodiplodia</i> inferido de una alineación concatenada de alineación de secuencias ITS, <i>EF1-α</i> y <i>BT2</i> . Los valores bootstrap por el método de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud se muestran en las ramas respectivas <i>Diplodia mutila</i> (CMW7060) y <i>Diplodia seriata</i> (CBS112555) se usaron como grupos externos.....	46
6	Árbol filogenético de las especies de <i>Barriopsis</i> inferido de una alineación concatenada de secuencias ITS, <i>EF1-α</i> y <i>BT2</i> . Los valores bootstrap por el método de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud se muestran en las ramas respectivas. <i>Phaeobotryon aplospora</i> (CFCC 53776) se usó como grupo externo.....	47
7	Sitios de recolección de muestras de tejidos infectados con géneros de la familia Botryosphaeriaceae en huertos de limón Persa distribuidos en el estado de Sinaloa. Los círculos representan la frecuencia de la asociación de cada especie con limón Persa que mostraron síntomas de muerte descendente de ramas en cada huerto muestreado, n es el número de aislados analizados en cada población.....	48



## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
8	Síntomas desarrollados en ramas de árboles jóvenes de limón Persa ( <i>Citrus latifolia</i> ), inoculados artificialmente con <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> y <i>Barriopsis thailandica</i> . 30 días después de la inoculación. (A-B) Ramas inoculadas con <i>B. thailandica</i> , sin presencia de necrosis ni exudaciones gomosas. (C) Rama inoculada con <i>L. pseudotheobromae</i> produciendo exudaciones gomosas. (D) Rama con síntomas de necrosis y gomosis. (E) Rama con necrosis alrededor del sitio de inoculación y en los haces vasculares. ....	49
9	Patogenicidad y virulencia de nueve aislados de Botryosphaeriaceae asociados a la muerte descendente del limón Persa ( <i>Citrus latifolia</i> ) en huertos comerciales de Sinaloa, México. Los datos representan la longitud promedio de lesiones internas a los 30 días después de la inoculación con discos de PDA colonizados con micelio colocados en heridas de las ramas. Error estándar 98.94%.....	50
10	Valores de concentración efectiva de tiofanato-metíl, pyraclostrobin, boscalid pyrimethanil, clorotalonil, y extracto vegetal que inhiben el 50% del crecimiento micelial (CE <sub>50</sub> ) para ocho aislados de <i>Lasiodiplodia</i> spp. obtenidos de tres huertos comerciales de limón Persa en Sinaloa, México.....	51

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro</b>		<b>Página</b>
1	Principales países productores de cítricos (en toneladas) en el mundo (FAO, 2022). .....	15
2	Superficie (ha), producción (ton) e ingresos (millones de pesos) de la citricultura en México en 2019 y 2020 (SIAP, 2022).....	20
3	Superficie (ha), producción (ton), rendimiento (ton/ha) e ingresos (miles de miles de pesos) de las variedades de limón cultivadas en Sinaloa en el año 2020 (SIAP 2021). .....	21
4	Nombres de los genes o regiones amplificadas, los marcadores utilizados, su secuencia, los fragmentos (pb), la temperatura de fusión y referencia.....	38
5	Número de acceso de GenBank de secuencias de ADN de Botryosphaeriaceae incluidos en el estudio filogenético.....	39
6	Fungicidas y concentraciones utilizadas para la prueba de sensibilidad in vitro con ocho aislados de Lasiodiplodia spp. obtenidos de tejidos enfermos de limón Persa. ....	41
7	Análisis estadístico para la prueba de patogenicidad.....	42
8	Análisis de varianza (ANOVA).....	49
9	Resumen del modelo ANOVA.....	49
10	Comparación de medias con el método de Tukey con confianza de 95%.....	49

## RESUMEN

El limón Persa (*Citrus latifolia* Tan.), es un cítrico ampliamente cultivado en varios estados de México. En Sinaloa, se han observado comúnmente árboles de dicho cítrico con síntomas de canchales en tronco, gomosis en ramas; así como, muerte descendente de ramas y brotes. Los objetivos de este estudio fueron identificar las especies de *Lasiodiplodia* asociadas con estos síntomas, determinar su patogenicidad y virulencia en árboles de limón Persa; además de, estimar su sensibilidad *in vitro* a diferentes fungicidas y a un extracto vegetal. En 2021, se recolectaron muestras sintomáticas de limón Persa en tres huertos comerciales y se obtuvieron 18 aislados fúngicos de la familia Botryosphaeriaceae. Para la identificación, se eligieron 9 aislados representativos, realizándose caracterización morfológica, análisis filogenéticos basándose en datos de secuencia de ADN de la región espaciadora transcrita interna (ITS) y parte de los genes del factor de elongación de la traducción 1- $\alpha$  (*EFL- $\alpha$* ) y  $\beta$ -tubulina (*BT2*). Los análisis de secuencia se llevaron a cabo usando los métodos de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud. Se lograron identificar cinco especies de la familia Botryosphaeriaceae, incluyendo a *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. brasiliense*, *L. jatrophicola* y *Barriopsis thailandica*. *Lasiodiplodia jatrophicola* se reporta por primera vez en asociación a cítricos en el mundo, aunque la especie más frecuentemente aislada en este estudio fue *L. pseudotheobromae* (62.5%). La patogenicidad en árboles jóvenes de limón Persa usando el método de inoculación con disco micelial mostró que todas las especies de *Lasiodiplodia* identificadas fueron capaces de reproducir los síntomas de necrosis y gomosis en ramas. Sin embargo, *B. thailandica* no causó síntomas en las ramas, encontrándose únicamente como hongo saprofito. Por otra parte, *L. pseudotheobromae* y *L. jatrophicola* fueron las especies más virulentas en comparación con el resto. Entretanto, los resultados de la prueba de sensibilidad *in vitro* con ocho aislados de *Lasiodiplodia* spp. mostraron valores de concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial ( $CE_{50}$ ) que variaron de 0.0018-0.0162, 0.66-69.59, 56.72-299.21, 0.332-13.766, 448.71-1418.82 y 24.88-126.38  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a los fungicidas tiofanato-metíl, pyraclostrobin, pyrimethanil, clorotalonil, boscalid y al extracto vegetal, respectivamente. Lo anterior indicó que los aislados de *Lasiodiplodia* spp. fueron más sensibles a los fungicidas sistémicos tiofanato-metíl y pyraclostrobin, así como al fungicida de contacto clorotalonil.

**Palabras clave:** *Citrus latifolia*, *Lasiodiplodia* spp, morfología, análisis filogenéticos, patogenicidad, sensibilidad.

## ABSTRACT

Persian lime (*Citrus latifolia* Tan.) is a widely cultivated citrus fruit in various states of Mexico. In Sinaloa, Persian lime trees have been commonly observed with symptoms of cankers in the trunk, as well as gummosis and dieback of branches. The aims of this study were to identify the *Lasiodiplodia* species associated with these symptoms, determine their pathogenicity and virulence in Persian lime, as well as to estimate its *in vitro* sensitivity to different fungicides and to a plant extract. In 2021, symptomatic samples of Persian lime were collected in three commercial orchards and 18 fungal isolates of the Botryosphaeriaceae family were obtained. For identification, nine representative isolates were chosen, to perform morphological characterization and phylogenetic analyzes on DNA sequence data of the internal transcribed spacer region (ITS) and part of the translation elongation factor 1- $\alpha$  (EF1-  $\alpha$ ) and  $\beta$ -tubulin (BT2). Sequence analyzes were carried out using the Maximum Parsimony and Maximum Likelihood methods. Five species of the Botryosphaeriaceae were identified, including *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, *L. brasiliense*, *L. jatrophicola*, and *Barriopsis thailandica*. *Lasiodiplodia jatrophicola* is reported for the first time in association with citrus in the world, although the most frequently isolated species in this study was *L. pseudotheobromae* (62.5%). Pathogenicity in young Persian lime trees using the mycelial disk inoculation method showed that all identified *Lasiodiplodia* species were capable of reproducing the symptoms of necrosis and gummosis on branches. However, *B. thailandica* does not produce symptoms on the branches, being found only as a saprophytic fungus. On the other hand, *L. pseudotheobromae* and *L. jatrophicola* were the most virulent species. Meanwhile, the results of the *in vitro* sensitivity tests with eight isolates of *Lasiodiplodia* spp. showed effective concentration values that inhibited 50% of mycelial growth (EC<sub>50</sub>) that varied from 0.0018-0.0162, 0.66-69.59, 56.72-299.21, 0.332-13.766, 448.71-1418.82 and 24.88-126.38  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , to the fungicides thiophanate-methyl, pyraclostrobin, pyrimethanil, chlorothalonil, boscalid, and the plant extract, respectively. This indicates that the isolates of *Lasiodiplodia* spp. were more sensitive to the systemic fungicides thiophanate-methyl and pyraclostrobin, as well as to the contact fungicide chlorothalonil. All the information generated in this study will serve as a basis for programming integrated management strategies for the dieback of Persian lime branches in orchards in Sinaloa, Mexico.

**Keywords:** *Citrus latifolia*, *Lasiodiplodia*, morphology, phylogenetic analysis, pathogenicity, sensitivity

## 1. INTRODUCCIÓN

Las especies de cítricos de mayor importancia económica mundial son: naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), mandarina (*C. reticulata* Blanco), toronja (*C. paradisi* Macf.), limón mexicano (*C. aurantifolia* (Christm) Swingle), limón italiano (*C. limon* (L.) Burm F.) y limón Persa (*C. latifolia* Tanaka). Estas especies se consideran de alto valor nutritivo, ya que poseen un equilibrado contenido de agua, azúcares, ácidos, sales minerales y vitaminas; representando una rica fuente de vitaminas C, B1 y B2, así como hierro y calcio, los cuales son esenciales para la nutrición humana (Palacios, 1978; Morin, 1985).

En la actualidad, alrededor de 140 países producen cítricos en el mundo; siendo China, Brasil, EE.UU. India, México, España, Italia, Nigeria y Argentina los principales productores (Cuadro 1). Para el año 2020, según datos de la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), se alcanzó una producción mayor a 158 millones de toneladas de fruta cítrica. La naranja es la especie citrícola más importante, con una producción mundial de 75.4 millones de toneladas, sobresaliendo Brasil como el principal productor de este cítrico, con una aportación de 22.2% del total mundial. Por otra parte, los limones, limas acidas (limón mexicano y limón Persa) y lima dulce tuvieron una producción total de 21.3 millones de toneladas, siendo México el segundo productor mundial de limones, aportando 13.5% a la producción mundial (FAO, 2022).

**Cuadro 1.** Principales países productores de cítricos (en toneladas) en el mundo (FAO, 2022).

País	Naranja	Limones y limas	Mandarina	Toronja	Otros	Total
<b>China</b>	7,500,000	2,687,796	23,120,000	4,950,000	5,867,158	44,124,954
<b>Brasil</b>	16,707,897	1,585,215	1,026,638	81,859	0	19,401,609
<b>India</b>	9,854,000	3,717,000	0	0	408,000	13,979,000
<b>México</b>	4,648,620	2,879,023	530,368	490,834	333,880	8,882,725
<b>EE.UU</b>	4,766,350	983,390	856,380	518,000	24,687	7,148,807
<b>España</b>	3,343,960	1,100,470	2,172,180	79,790	0	6,696,400
<b>Egipto</b>	3,157,960	319,054	968,047	1,767	5,482	4,452,310
<b>Turquía</b>	1,333,975	1,188,517	1,585,629	238,012	2609	4,348,742
<b>Italia</b>	1,772,770	473,280	660,280	5,460	28,270	2,940,060
<b>Resto</b>	22,373,056	6,419,757	7,681,385	2,976,910	7,065,271	46,516,379
<b>Mundial</b>	<b>75,458,588</b>	<b>21,353,502</b>	<b>38,600,907</b>	<b>9,342,632</b>	<b>13,735,357</b>	<b>158,490,986</b>

En México, Michoacán el principal estado productor de limón Persa (SIAP, 2021). Por otra parte, en Sinaloa en los últimos 10 años se ha incrementado el hectareaje de plantación de limón Persa, según estadísticas de SIAP (2021) alcanzando una superficie de siembra de 1529 ha distribuidas entre los municipios de Culiacán, Salvador Alvarado, Guasave, Elota y Ahome; logrando un volumen de producción de 21.3 miles de ton.

En México, durante 2020 hubo una reducción de 16.5% de la superficie total sembrada de limoneros (SIAP, 2021), ocasionado por factores abióticos y bióticos; Valle de la Paz *et al.* (2019a) mencionaron que al menos el 6% de la pérdida anual de los árboles es ocasionada por factores bióticos; siendo las plagas y enfermedades la principal causa, reduciendo la productividad y calidad de los frutos y muchas veces causando la muerte de los árboles.

Los factores bióticos, pueden afectar diferentes órganos de los árboles: raíces, tallo, ramas, hojas, flores y fruto (Agrios, 2005). Las enfermedades causadas por hongos que afectan a los tallos y ramas del limón, ocasionan grandes pérdidas económicas alrededor del mundo. Estas enfermedades se atribuyen a genérenos de la familia Botryosphaeriaceae, principalmente a *Lasiodiplodia*, estos fitopatógenos penetran a la planta principalmente a través de aberturas naturales o por heridas realizadas durante la poda, a través de las cuales invaden el sistema vascular y en consecuencia obstruyen los vasos xilemáticos, causando síntomas de necrosis, canchales, amarillamiento foliar y muerte descendente de las ramas (Leyva *et al.* 2021). Estos síntomas son muy similares a los ocasionados por la gomosis de los cítricos causada por *Phytophthora* spp. por lo que, anteriormente, la muerte descendente por *Lasiodiplodia* spp. no era considerada como una enfermedad relevante. No fue sino hasta a década pasada cuando las especies de la familia Botryosphaeriaceae adquirieron importancia como patógenos de los cítricos y otros cultivos frutales como la vid (*Vitis* spp.), debido a los estudios realizados en diferentes partes del mundo (Valle de la Paz *et al.*, 2019a; Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Polanco-Florián *et al.*, 2019).

*Lasiodiplodia* spp. están asociadas a la gomosis y muerte descendente de ramas de cítricos, incluyendo a la naranja dulce, el limón agrio, la mandarina, la lima dulce (Al-Sadi *et al.*, 2013) y al limón Persa (Valle de la Paz *et al.*, 2019a; Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Polanco-Florián *et al.*, 2019).

Debido a la necesidad de una correcta identificación del agente causal de la enfermedad para su correcto control se plantea este estudio, donde, los objetivos fueron identificar y determinar la patogenicidad y sensibilidad a fungicidas de las especies de Botryosphaeriaceae asociadas a los



síntomas de muerte descendente de ramas de limón Persa en huertos comerciales en Sinaloa, México.

## 2. ANTECEDENTES

A nivel mundial, existen diversos reportes de *Lasiodiplodia* spp. y otros miembros de la familia Botryosphaeriaceae como los causantes de enfermedades en árboles de cítricos, por mencionar algunos, Al-Sadi *et al.* (2013) reportaron a *L. hormozganensis*, *L. iraniensis* y *L. theobromae* como agentes causantes de la muerte descendente de ramas en *Citrus* spp. en Omán y en los Emiratos Árabes Unidos. Posteriormente, Adesemoye *et al.* (2014) aislaron e identificaron cuatro géneros de la familia Botryosphaeriaceae (*Dothiorella* spp., *Diplodia* spp., *Lasiodiplodia* spp. y *Neofusicoccum* spp.) obtenidos de árboles de naranja dulce, limón, limón Persa, toronja y otros cítricos (*Citrus* spp.) con síntomas de gomosis, canchros y muerte descendente de ramas en California, EE. UU. Así mismo, Guajardo *et al.* (2018) indican a la especie *L. theobromae* causando síntomas de cancro en el tronco, muerte descendente de ramas, gomosis y necrosis vascular en limón (*Citrus limon*) en Chile. Más adelante, Ahmed *et al.* (2020), reportaron a *L. pseudotheobromae* ocasionando síntomas de necrosis vascular, gomosis y canchros en el tronco de *Citrus reticulata* en Pakistán. En este mismo año, Berraf-Tebbal *et al.* (2020) registraron a *L. mitidjana* y *L. mediterránea* causando cancro y muerte descendente en ramas de naranja dulce (*Citrus sinensis*) en Argelia. También en el año 2020, Esparghman *et al.* Observaron canchros y muerte descendente de ramas en *Citrus* spp. en Irán identificando a las especies *L. citricola* y *L. theobromae* como agentes causales.

Los reportes existentes en México, en el cultivo de limón Persa, datan del año 2019: iniciando, Valle de la Paz *et al.* (2019a) reportaron a *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. citricola* y 13 aislados más pertenecientes a *Lasiodiplodia* causando muerte descendente en cítricos en Morelos. Posteriormente, Bautista-Cruz *et al.* (2019) identificaron mediante análisis filogenéticos multilocus a seis especies de *Lasiodiplodia* (*L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *L. brasiliense*, *L. subglobosa*, *L. citricola* y *L. iraniensis*) afectando a limón Persa en huertos distribuidos en Puebla y Veracruz; además, de comprobar que todas las especies de *Lasiodiplodia* identificadas pueden causar síntomas de gomosis, canchros del tallo y muerte descendente, aunque *L. pseudotheobromae*, *L. iraniensis* y *L. subglobosa* fueron más virulentas en comparación con las otras especies aisladas. Más tarde, Polanco-Florián *et al.*, (2019) registraron únicamente a la especie *L. theobromae* causando síntomas de muerte descendente en arboles de cítricos en Nuevo León y Tamaulipas.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

#### 3.1. Los Cítricos (*Citrus* spp.)

Los cítricos son frutas con sabor de ácido a agridulce, muy jugosas y aromáticas, originarias de las regiones tropicales y subtropicales de Asia. Gracias a la hibridación natural entre diferentes especies de cítricos, con el paso del tiempo, nuevas especies se han creado y dispersado por el mundo adaptándose a diferentes regiones de clima cálido (Nicolosi *et al.*, 2000).

La característica que permite que los cítricos se cultiven en todo el mundo es su delicioso sabor y propiedades curativas, pues además de los frutos, las flores y hojas tienen usos en la medicina y en la cocina; siendo su principal uso en la farmacéutica, ya que aportan a la formación de glóbulos rojos, colágeno, huesos, dientes, y, porque promueven la absorción del hierro de los alimentos y la resistencia a las infecciones; sin embargo, su principal característica es la presencia de ácido ascórbico, conocido como vitamina C (Stampella *et al.*, 2018).

Por su parte el limonero Persa es un árbol con frutos grandes y redondos, que alcanzan hasta los 66 mm (calibre 110), cuya principal característica es la producción de jugo con alto grado de acidez, su pulpa está dividida entre 9 y 12 gajos. Contiene vitaminas C y B; además, de proporcionar calcio, fósforo y hierro, así mismo, se le atribuye el alivio de algunas enfermedades respiratorias e inflamaciones de la garganta por sus propiedades anti-bacteriales y antivirales (SIAP, 2021).

##### 3.1.1. Taxonomía

Clase: Angiospermae; subclase: Dicotyledoneae; orden: Sapindales; familia: Rutaceae; género: *Citrus*

Los cítricos cuentan con más de 145 especies, entre las que se destacan la naranja (*Citrus sinensis*), mandarina (*Citrus reticulata*), limón (*Citrus limon*), lima (*Citrus aurantifolia*) y la toronja (*Citrus paradisi*), los cuales se cultivan en más de 135 países (USDA, 2019).

### 3.2. Importancia Económica de los Cítricos

Las zonas citrícolas en el mundo continúan expandiéndose, alcanzando una cobertura mundial de 20 millones de hectáreas (FAO, 2021). Por su parte, México tiene una superficie de 572,234 ha dedicadas a la citricultura (Cuadro 2), de las cuales 207,838 ha están sembrada con limón (SIAP, 2021). México es el segundo productor mundial de limones con 2.85 millones de ton, solo superado por la India con 3.5 millones de ton en producción de este cítrico (FAO, 2021). La exportación mexicana del limón tiene como destino 28 países, aunque los mayores volúmenes adquiridos son por EE.UU. y Países Bajos con 757 y 21 mil ton, respectivamente (SIAP, 2021). En México los estados con mayor producción de limones son Michoacán (28%) y Veracruz (27.6%) (SIAP, 2021).

**Cuadro 2.** Superficie sembrada (ha), producción (ton) e ingresos (millones de pesos) de la citricultura en México en 2019 y 2020 (SIAP 2021).

<b>Cultivo</b>	<b>Ciclo</b>	<b>Superficie sembrada</b>	<b>Producción Anual</b>	<b>Ingresos económicos</b>
<b>Limón</b>	2019	171,608	2,187,257	8,989,670
	2020	207,838	2,851,427	18,766,498
<b>Naranja</b>	2019	334,849	4,533,427	6,727,470
	2020	343,244	4,648,620	13,975,111
<b>Toronja</b>	2019	18,050	424,678	642,847,950
	2020	21,151	490,834	1,603,877

#### 3.2.1. Importancia Económica de los Cítricos en Sinaloa

En Sinaloa, un total de 3,666 ha son dedicadas a la citricultura (limón, naranja y toronja), de las cuales 1,912 ha están plantadas por arboles perennes de limón (SIAP, 2021). El limón Persa cubre aproximadamente el 80% de la superficie total sembrada y el resto está dedicada a limón agrio, generando un ingreso total de 180 millones de pesos, 89% es generado por el cultivo de limón Persa (SIAP, 2021). En el Cuadro 3 se describen los valores establecidos para cada variedad de limón cultivada en cuanto a producción e ingresos generados en el estado de Sinaloa durante el año 2020.

**Cuadro 3.** Superficie (ha), producción (ton), rendimiento (ton/ha) e ingresos (miles de miles de pesos) de las variedades de limón cultivadas en Sinaloa en el año 2020 (SIAP 2021).

<b>Cultivo</b>	<b>Superficie</b>	<b>Producción anual</b>	<b>Rendimiento</b>	<b>Valor de producción</b>
<b>Limón Persa</b>	1529.9	21,348.49	18.63	157,139.25
<b>Limón agrio</b>	383	3,517.87	9.19	23,760.69
<b>Total</b>	1912.9	24,866.36		180,899.93

### 3.3. Enfermedades en Cítricos

Como cualquier cultivo intensivo, los cítricos, pueden ser afectados por una gran variedad de enfermedades causadas por factores abióticos o bióticos. Los factores abióticos pueden ser exceso o bajas temperaturas, humedad, luz, nutrientes, etc. Dentro de los factores bióticos se encuentran los virus, las bacterias, hongos, nematodos, insectos, entre otros (Agrios, 2005).

En México, las enfermedades bióticas que se consideran de importancia económica en los cítricos son: gomosis (*Phytophthora parasitica*), antracnosis en flor y fruto (*Colletotrichum* spp.), exocortis (Citrus exocortis viroid), mancha grasienta (*Cercospora citri*), roña (*Sphaceloma citri*), fumagina (*Capnodium* sp.), mohos del fruto (*Penicillium digitatum* y *P. italicum*), huanglongbing o HLB (*Candidatus liberibacter*) y la muerte de ramas (varios géneros de hongos) (Velázquez *et al.* 2013).

#### 3.3.1. Enfermedades Fúngicas de la Madera por Botryosphaeriaceae

La familia Botryosphaeriaceae tiene una distribución casi cosmopolita, exceptuando las regiones polares. Incluye en total 17 géneros y 110 especies identificadas con base en características morfológicas y moleculares, abarcando hongos de morfología muy variable que son patógenos, necrotróficos o saprófitos, especialmente en plantas leñosas (Phillips *et al.*, 2013). Los más comunes son: *Botryosphaeria* spp., *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Lasiodiplodia* spp., *Neofusicoccum* spp. y *Neoscytalidium* spp. (Luo *et al.*, 2019). Estos fitopatógenos penetran a la planta principalmente por las heridas de la poda o aberturas naturales, a través de las cuales invaden el sistema vascular y en consecuencia obstruyen los vasos xilemáticos (Leyva-Mir *et al.*, 2021). Los síntomas característicos causados por miembros de la familia Botryosphaeriaceae son la

muerte descendente de ramas, brotes o cordones, formación de canchales y eventualmente la muerte del árbol (Al-Sadi et al., 2013; Adesemoye *et al.*, 2014; Bautista-Cruz *et al.*, 2019).

### **3.3.2. *Lasiodiplodia* spp.**

Las especies de *Lasiodiplodia*, principalmente se distribuyen en zonas de clima tropical y subtropical, se ubican dentro del grado de parasitismo como saprofitos facultativos; es decir, son microorganismos que viven siendo parásitos en la madera; sin embargo, también tiene la facultad de ser latentes bajo ciertas condiciones ambientales y climáticas, encontrándose comúnmente como endófitos en tejidos sanos de la planta, convirtiéndose en patógeno cuando el hospedante está debilitado o estresado (Picos-Muñoz *et al.*, 2015). Su principal vía de entrada a los árboles es a través de heridas ya sean mecánicas o producidas por algún insecto; este hongo tiene la capacidad de colonizar el sistema vascular, avanzar por delante de los síntomas visibles y de sobrevivir en tejido muerto del árbol (Xiao *et al.*, 2017).

El reporte más antiguo encontrado sobre *Lasiodiplodia* spp., fue realizado por Álvarez (1976) afectando el cultivo de cacao (*Theobroma cacao* L.). Picos- Muñoz *et al.* (2015), indican que las especies de *Lasiodiplodia* son muy comunes en los trópicos, causando varias enfermedades en las plantas, tanto en las etapas de cultivo como en poscosecha y que su actividad celulítica permite la penetración y colonización en 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 las enfermedades causadas por *Lasiodiplodia* spp. 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 (Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

Estudios realizados por Phillips *et al.* (2013), indicaron que, debido a la presencia cosmopolita y el amplio rango de hospedantes de este hongo, existen varias especies crípticas afectando las plantaciones cítricas. Varela-Fuentes *et al.* (2013), lo describieron como el agente causal de la muerte de plantas de naranjo agrio injertadas en diferentes especies de cítricos en viveros; así como, afectando árboles de limón mexicano y limón Persa, causando muerte descendente de ramas, gomosis en tallos o necrosis de las raíces; y de la pudrición del pedúnculo en frutos de naranja.

### 3.3.3. Muerte Descendente de las Ramas de Cítricos por *Lasiodiplodia* spp.

La muerte descendente por *Lasiodiplodia* spp. es un término propuesto por Úrbez-Torres (2011), y agrupa al cancro causado por *Botryosphaeria* spp. (Bot canker, en inglés), esto debido a que, en los últimos años, los nombres de las dos enfermedades se han empleado indistintamente y existe confusión para diferenciar un padecimiento de otro.

La muerte descendente de los cítricos ocasionada por *Lasiodiplodia* spp es una enfermedad con gran importancia económica, debido a que las pérdidas de producción alrededor del mundo se estiman en 10 a 30% (Pérez *et al.*, 2021). En México no se han estimado las pérdidas económicas causadas por estos patógenos en especies cítricas, pero, en limón Persa, se ha determinado una incidencia de 31 a 100% y una severidad de 30 a 100% en el estado de Morelos (Valle de la Paz *et al.*, 2019a). En Sinaloa la muerte descendente de los cítricos se encuentra ampliamente distribuida, principalmente en el norte del estado, donde las condiciones climáticas permiten un buen desarrollo de estos patógenos (Pérez *et al.*, 2021).

Cuando la enfermedad se presenta en árboles, los síntomas observados son gomosis, tizón en las hojas, agrietamiento de tallos, muerte descendente de ramas; así como, canchros en las ramas y tronco principal (Figura 1). La corteza se ablanda en la periferia del botón y se produce una necrosis del tallo de color marrón en toda la superficie infectada, el patógeno avanza hacia otros órganos de la planta, en las hojas, se presentan manchas en etapas más avanzadas de la enfermedad, provocando su senescencia y con ello la muerte descendente (Pérez *et al.*, 2021; Valle de la Paz *et al.*, 2019a; Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Polanco-Florián *et al.*, 2019).



**Figura 1.** Síntomas de muerte descendente en árboles de limón Persa. (A) árbol sano, (B) presencia de exudación de goma en el tronco principal o en ramas primarias y secundarias, (C) agrietamiento visible con exposición de tejidos internos, (D) y (E) muerte descendente (Valle de la Paz *et al.*, 2019a).

### 3.4. Identificación Morfológica de *Lasiodiplodia* spp.

Las especies de *Lasiodiplodia* son separadas por el tamaño y forma de los conidios, en general, son hongos formadores de ascocarpos color café oscuro a negro, agregado, con pared gruesa de color café oscuro e hialino en capas internas, de 250-400  $\mu\text{m}$  de diámetro; las ascosporas son biseriadas, hialinas, aseptadas de 30\_35  $\times$  11\_14  $\mu\text{m}$ ; el conidiomata es estromatico, simple o agregado, inmerso en el hospedante y una vez maduro emerge de este, de color café oscuro, unilocular, pared gruesa o delgada de color marrón, con frecuencia setoso, de hasta 5 mm de ancho, ostiolo central, papillado; paráfisis hialinas, cilíndricas, septadas, ocasionalmente ramificadas con los extremos redondeados hasta de 55  $\mu\text{m}$  de largo y 3-4  $\mu\text{m}$  de ancho (Figura 2) (Phillips *et al.*, 2013).





**Figura 2.** *Lasiodiplodia theobromae*. (A) y (B) Asca, (C) y (D) Ascosporas, (E) e (I) Capa conidiógena con células conidiógenas y paráfisis, (F) Paráfisis hialina, (G) Conidios inmaduros, (H) Desarrollo de conidios, (J) y (K) Conidios estriados maduros con paredes oscuras (Phillips et al., 2013).

En la fase asexual, el género *Lasiodiplodia* se distingue principalmente por la presencia de picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en conidios maduros. Las colonias que forma en medio de cultivo son moderadamente densas, con micelio aéreo, inicialmente blancas tornándose gris-olivo a los siete días y con el tiempo se tornan a color negro; la exposición a la luz por más de 16 horas favorece la formación de picnidios (Al-Sadi *et al.*, 2013).

### 3.5. Control de *Lasiodiplodia* spp

#### 3.5.1. Control Químico

El uso de fungicidas para controlar la muerte descendente por especies de la familia Botryosphaeriaceae se ha reportado en muy pocos estudios (Niekerk *et al.*, 2006).

Debido a que las especies de la familia Botryosphaeriaceae penetran a los árboles de cítricos principalmente por heridas de poda (Leavitt, 1990), existen varios trabajos dirigidos a la aplicación de fungicidas para proteger estos sitios (Varela-Fuentes *et al.* 2013).

3.5.1.1. Fungicidas metil benzamidazol carbamatos (MBC). Los fungicidas clasificados dentro de la clase MBC inhiben la formación de la beta-tubulina, interrumpiendo así la mitosis y por tanto la división celular. Su modo de acción es por unión a los microtúbulos celulares. Estos se clasifican en dos grupos: bencimidazoles (carbendazim, tiabendazol, benomil) y tiofanatos (metil-tiofanato) (FRAC, 2021).

Valle de la Paz *et al.* (2019b), evaluaron la sensibilidad *in vitro* de *L. theobromae* ante el tiofanato metil, concluyendo que el hongo es altamente sensible a este fungicida, dado que no presentó crecimiento micelial en ninguna dosis evaluada (0.1, 0.08, 0.06 g/100 mL agua); sin embargo, esto pudo deberse a que las concentraciones utilizadas fueron las recomendaciones del fabricante para su uso en campo. Por su parte, Yang *et al.* (2021), determinaron que de 224 aislados de *L. theobromae* obtenidos de mango en China, el 28% fue sensible, 10% fue resistente, 25% fue altamente resistente a carbendazim con una concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial ( $CE_{50}$ ) que osciló entre 0.001-1, 48.89-98.63 y 102.1-898.60  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente; mientras, que 63% restante creció de forma normal. Similarmente, la susceptibilidad *in vitro* de *L. theobromae* ante tiofanato metil se evaluó por Cavalcante *et al.* (2014) en Brasil, cuyos resultados fueron que de 109 aislados de *L. theobromae* el 79.8% fue sensible con una  $CE_{50}$  media de 1.87  $\mu\text{g/mL}$ , mientras que el 20.2% de los aislados se denominó resistentes a tiofanato metil con una  $CE_{50}$  superior a 300  $\mu\text{g/mL}$ .

En condiciones de campo, Rolshausen *et al.* (2010), determinaron que el tiofanato metil al 1% fue el fungicida que presentó mayor control sobre *Botryosphaeria* spp., disminuyendo la incidencia de este patógeno en alrededor del 80% en el cultivo de uva (*Vitis* spp.). La sensibilidad de *Botryosphaeria* spp. ante el tiofanato metil, también se evaluó en un estudio realizado por Amponsah *et al.* (2012), donde este fungicida se aplicó a dosis de 40 g ia/L y se redujo significativamente la incidencia de *Neofusicoccum luteum* en un 83%.

3.5.1.2. Fungicidas inhibidores de la quinona (QoI). Los fungicidas QoI son altamente efectivos para inhibir la esporulación, la germinación de esporas y el crecimiento del micelio de los patógenos fúngicos objetivos. Su modo de acción es unirse al llamado sitio externo de quinona del citocromo b en el complejo bc<sub>1</sub> (complejo III) de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria, bloqueando la transferencia de electrones del citocromo b al citocromo c<sub>1</sub> y, en última instancia, lleva a una interrupción de la síntesis de tri-fosfato de adenosina (Bartlett *et al.*, 2002; Liang *et al.*, 2019). Sin embargo, los hongos pueden evitar parcialmente los efectos tóxicos *in vitro* de los fungicidas QoI mediante la activación de la oxidasa alternativa (AOX) ubicada en la membrana mitocondrial, pero, para los hongos en las plantas, la AOX es inhibida por los metabolitos secundarios de las plantas, como los flavonoides (Wood y Hollomon, 2003). Por este motivo se debe de agregar un inhibidor de la AOX al medio de cultivo artificial, el ácido salicilhidroxámico (SHAM), es un inhibidor de la AOX, este se incluye de forma rutinaria en un medio artificial para suprimir la AOX (Malandrakis *et al.*, 2006; Walker *et al.*, 2009; Duan *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2019). La concentración de SHAM utilizada, generalmente es de 100 µg/mL, este reducirá la concentración efectiva para los valores de la inhibición del 50% (CE<sub>50</sub>) para el fungicida QoI probado, como lo demostraron los valores de CE<sub>50</sub> de azoxistrobin con y sin SHAM contra *Ascochyta rabiei* (Wise *et al.*, 2008) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Duan *et al.*, 2012).

Debido a la aplicación extensiva de esta clase de fungicidas con un solo sitio de acción (Sun *et al.*, 2015), muchos patógenos de plantas como *Botrytis cinerea* (Xiao *et al.*, 2017), *Cercospora beticola* (Birla *et al.*, 2012) y *Sclerotinia sclerotiorum* (Liang *et al.*, 2015) han desarrollado resistencia al piraclostrobin. En un estudio realizado por Fan *et al.* (2019), se determinó la sensibilidad a piraclostrobin en aislados de *Botryosphaeria* sp. obtenidos de huertos de manzanas que nunca habían estado expuestos a este fungicida, por lo que se concluyó que los de CE<sub>50</sub> oscilaron entre

0.7 y 7.13  $\mu\text{g/mL}$ . Por su parte, Pitt *et al.* (2012), evaluaron la sensibilidad *in vitro* de piraclostrobin contra los agentes causales de la muerte descendente de la vid (*Neofusicoccum parvum*, *Botryosphaeria dothidea*, *Diplodia seriata* y *Lasiodiplodia theobromae*) en Australia para las cuales, la concentración media del fungicida resultó en 0.86  $\mu\text{g/mL}$ . Más adelante, Yang *et al.* en el 2021 señalaron que de 224 aislados de *L. theobromae* probados *in vitro* con piraclostrobin, solo el 43% fue sensible, mientras que el 57% restante se clasificó como resistente o altamente resistente con  $\text{CE}_{50}$  que oscilaron entre 0.13 y 1525.43  $\mu\text{g/mL}$ .

3.5.1.3. Fungicidas inhibidores de la succinato hidrogenasa (SDHI). Los fungicidas de la clase SDHI, clasificados como carboxamidas, inhiben la enzima succinato ubiquinona reductasa, también conocida como complejo II, en la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna. Dentro de la clase carboxamidas se encuentran los fungicidas boscalid, carboxin, sedaxane, fluxapyroxad, fluopiram, entre otros (FRAC, 2021). Un estudio realizado por Froelichyguido (2019), donde evaluó la concentración efectiva de los fungicidas boscalid y fluopiram para el patógeno *Botryosphaeria obtusa*, aislado del tizón de ramas de durazno, reportaron que este patógeno en base a los valores de  $\text{CE}_{50}$  fue resistente a estos fungicidas con valores iguales o superiores a 56.819  $\mu\text{g/mL}$  siendo ineficaces para su control. De manera similar, Pitt *et al.* (2012) evaluaron la eficacia *in vitro* de boscalid para el control de los agentes causales del cancro de la vid por Botryosphaeriaceae en Australia, donde el fungicida resultó ineficaz para controlar a los aislados de *L. theobromae*, *D. seriata*, *B. dothidea* y *N. parvum*.

Sin embargo, el fungicida Boscalid, es ampliamente utilizado por los citricultores para el control de diversas enfermedades fúngicas, debido que su uso está aprobado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) para la exportación de fruta cítrica (EPA, 2022).

3.5.1.4. Fungicidas anilo pirimidinas (AP). Los fungicidas AP inhiben la síntesis de aminoácidos y proteínas afectando la metionina, ubicándose entre ellos a los fungicidas ciprodinil, mepanipirim y pyrimethanil (FRAC, 2021). Pitt *et al.* (2012) reportaron que los fungicidas ciprodinil y pyrimethanil son, en gran medida, ineficaces para inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de los agentes causales del cancro de la vid por Botryosphaeriaceae (*L. theobromae*, *D. seriata*, *B. dothidea* y *N. parvum*) aislados en Australia, utilizando dosis inferiores a 5  $\mu\text{g/mL}$ . En un estudio

realizado por Amponsah *et al.* (2012), indicaron que pyrimethanil fue ineficaz para controlar el crecimiento micelial *in vitro* de las especies *Neofusicoccum australe*, *N. luteo* y *Diplodia mutila* aisladas de vid en Nueva Zelanda. Por su parte, Tovar-Pedraza *et al.* (2013) indicaron que el fungicida pyrimethanil fue eficaz para controlar el crecimiento micelial *in vitro* de *L. theobromae* en mamey (*Pouteria sapota*) con una CE<sub>50</sub> media de 1.8 µg/mL.

No obstante, el fungicida pyrimethanil, es utilizado por los citricultores para el control de diversas enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, dado que, su uso está aprobado por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) para la exportación de fruta cítrica (EPA, 2022).

3.5.1.5. Fungicidas cloronitrilos. Clorotalonil es un fungicida de acción multisitio dentro de las células del hongo; este se adhiere a los grupos –SH de las moléculas de los aminoácidos, bloqueando así muchos procesos metabólicos importantes de las células fúngicas; uno de estos es la producción de ATP vía ciclo de Krebs, ya que clorotalonil se acopla con el agente reductor glutatión (FRAC, 2021). Un estudio realizado por Pitt *et al.* (2012) aislaron a los agentes causales del cancro por Botryosphaeriaceae de la vid en Australia, señalando que el clorotalonil es efectivo para inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *L. theobromae*, *D. seriata*, *B. dothidea* y *N. parvum* con una CE<sub>50</sub> < 2 mg/L. Simultáneamente, Amponsah *et al.* (2012), indicaron que el fungicida clorotalonil fue eficaz para controlar a las especies *Neofusicoccum australe*, *N. luteo* y *Diplodia mutila* con valores medios de CE<sub>50</sub> de 3.8, 7.8 y 0.2 mg/L respectivamente, aisladas de vid en Nueva Zelanda. En este mismo sentido, Tovar-Pedraza *et al.* (2013), indican que el fungicida clorotalonil fue eficaz para inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de *L. theobromae*, aislada de zapote mamey en Guerrero, México.

### **3.5.2. Control con Extractos Vegetales**

3.5.2.1. Extractos vegetales. En los últimos años el uso de fungicidas de síntesis química ha aumentado la preocupación del consumidor y su uso es cada vez más restrictivo debido a problemas secundarios como efectos cancerígenos en humanos, toxicidad residual, contaminación ambiental

y la resistencia adquirida de los patógenos a los grupos químicos; por lo que hoy en día se requiere de nuevas alternativas de manejo para controlar a los fitopatógenos y que tengan bajo impacto ambiental, tal como es el uso de fungicidas de origen natural (Céspedes *et al.*, 2014). Sin embargo, estos productos no garantizan la erradicación del organismo fitopatógeno, dado que una aplicación deficiente o inadecuada del fungicida puede no controlar al hongo (Céspedes *et al.*, 2014). Un estudio realizado por Faruk-Hansan *et al.* (2020), donde evaluó extractos de plantas (*Centella asiatica*, *Cassia alata*, *Datura metel*, *Coccinia grandis*, *Psidium guajava* y *Azadirachta indica*) contra el patógeno *L. theobromae* señaló que *D. metel* y *C. alata* mostraron la inhibición más alta con 50 µg de extracto/disco, inhibiendo el 75.25 y 69.31% del crecimiento micelial *in vitro*, respectivamente, mientras que la inhibición más baja del crecimiento de micelio fue del 35.65% por el extracto de la hoja de *A. indica*.

#### 4. HIPÓTESIS

1. La muerte descendente de ramas de limón Persa en huertos comerciales en Sinaloa es causada por al menos dos especies de *Lasiodiplodia*.
2. Los aislados obtenidos de *Lasiodiplodia* spp. presentan diferente nivel de virulencia.
3. Las especies de *Lasiodiplodia* tienen alta sensibilidad *in vitro* a los fungicidas tiofanato-metílico y pyraclostrobin.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. Objetivo General

Identificar, caracterizar patogénicamente y determinar la sensibilidad *in vitro* a fungicidas en los hongos causantes de la muerte descendente de ramas de árboles de limón Persa en Sinaloa.

### 5.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar morfológica y molecularmente al agente causal de la muerte descendente de ramas de limón Persa en huertos comerciales en Sinaloa, México.
2. Verificar la patogenicidad y determinar la virulencia de hongos asociados a la muerte descendente de ramas de limón Persa en Sinaloa, México.
3. Determinar la sensibilidad *in vitro* a fungicidas de diferentes clases químicas en los hongos asociados a la muerte descendente de ramas de limón Persa en Sinaloa, México.



## **6. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

Una de las limitantes en la producción de limón Persa en Sinaloa, es la enfermedad causada por hongos fitopatógenos conocida como muerte descendente de ramas. Un primer paso para el control de esta enfermedad es la identificación correcta del agente causal.

Una vez caracterizado e identificado al agente causal, se debe seleccionar la o las estrategias de control adecuado del hongo fitopatógeno, y así aumentar la rentabilidad del cultivo reduciendo daños ocasionados por la enfermedad.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Recolección de Material Biológico

Durante el periodo de junio a agosto de 2021, se recolectó el material vegetal enfermo de árboles de limón Persa de tres huertas comerciales distribuidas en el estado de Sinaloa. Las muestras presentaban los siguientes síntomas: pudrición del tallo, ramas secas, frutos con pudrición, canchros y gomosis en la corteza de las ramas, amarillamiento del follaje y muerte descendente de ramas (Figura 3). Las muestras recolectadas se transportaron en bolsas de polietileno etiquetadas con los siguientes datos de: nombre de la huerta, tipo de material y portainjerto, predio, tabla, fecha y nombre del colector.

La recolección de ramas sintomáticas de los árboles de limón Persa se realizó dividiendo al estado dos en zonas:

- a. Norte: Ahome y Salvador Alvarado.
- b. Centro: Culiacán, Navolato y Elota.



**Figura 3.** Síntomas de muerte descendente en limón Persa (*Citrus latifolia*) asociado con *Botryosphaeriaceae* en Sinaloa. (A) Árbol con ligero amarillamiento foliar. (B) Árbol con muerte descendente de ramas y severa defoliación. (C) Árbol con muerte de ramas, frutos y hojas. (D) Picnidios en la superficie del tronco.

## 7.2. Aislamiento de los Hongos

Las muestras de tejido vegetal se observaron bajo el microscopio estereoscópico para detectar la presencia de estructuras fúngicas (picnidios), a partir de los cuales se realizaron cortes finos de las estructuras cuando había presencia. Posteriormente, se procedió a recolectar fragmentos de ramas de 4–5 mm de longitud, del margen entre el tejido necrótico y sano, los cuales se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% por 2 min, se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron sobre papel secante estéril. Los fragmentos se colocaron en placas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y se incubaron a 27 °C en completa oscuridad por 72 h. De los hongos desarrollados se realizaron purificaciones por punta de hifa con la finalidad de

obtener cultivos puros (Bautista-Cruz *et al.*, 2019).

Una vez obtenidos los aislamientos de los hongos purificados, se procedió a inducir la presencia de estructuras fungosas (picnidios), para lo cual se colocaron trozos de acículas de pino esterilizadas sobre las placas de medio de cultivo PDA, posteriormente, se colocó un disco de PDA con desarrollo fungoso del aislado a una distancia de 5 cm, dejando incubar a 28 °C, se observó diariamente hasta la presencia de las estructuras fungosas, las que fueron analizadas y caracterizadas, considerando el tipo de cuerpo fructífero y morfología de los conidios (Phillips *et al.*, 2013)

Los hongos aislados y purificados se conservaron en tubos con medio de cultivo PDA y se cubrieron con aceite mineral esterilizado (Crous *et al.*, 2006).

### 7.3. Identificación

#### 7.3.1. Morfológica

La identificación morfológica de los aislados se realizó usando de las claves y descripciones taxonómicas de Phillips *et al.* (2013), basado en las características morfológicas de la fase asexual de los hongos como son: micelio: sumergido o superficial, ramificado, septado, café oscuro, conidióforos: hialinos, simples, a veces septados, rara vez ramificado, cilíndricos, surgen de las capas internas de las células que revisten los lóculos, conidios: hialinos cuando son jóvenes, luego se vuelven bicelulares, café oscuro con estrías longitudinales, de paredes gruesas, oblongo a elipsoide, recto, ampliamente redondeado en el ápice, base truncada.

#### 7.3.2. Molecular

El ADN genómico de cada aislado fúngico, se extrajo de acuerdo con el método de bromuro de cetil-trimetil-amonio (CTAB) descrito por Doyle (1991). Los aislados se cultivaron en medio PDA

por 6 días a 27 °C en completa oscuridad. Posteriormente, el micelio aéreo se raspó directamente con ayuda de una espátula estéril y se colocó en microtubos para centrifuga de 2mL, el micelio se suspendió en 800 mL de solución CTAB al 2% y se maceró con pistilos estériles. Los microtubos se pasaron por el vortex y se incubaron a 70°C durante 15 min y se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se recolectó y se le agregaron 300 µL de cloroformo, se mezcló y posteriormente se centrifugó durante 10 min. Nuevamente el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se le agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol, esto se mezcló por inversión, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se decantó y se agregó etanol al 70%, se agitó en un vortex y se centrifugó nuevamente durante 10 min a 12,000 rpm, para por último decantar el sobrenadante. La pastilla de ADN<sub>g</sub> resultante se dejó secar por 1 h dentro de la campana de flujo laminar, posteriormente se re-suspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas.

La integridad del ADN<sub>g</sub> se corroboró por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, teñido con bromuro de etidio, utilizando el buffer de corrida TAE 1 X, por 45 min a 90 Volts. La concentración se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Madison, WI) y el ADN se almacenó a -4°C.

El ADN de cada aislado se utilizó como templado para la amplificación por PCR de la región y de los genes de interés con los marcadores descritos en el Cuadro 4. La mezcla de reacción para la amplificación por PCR se preparó con un volumen final de 25 µL: 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.2 mM dNTP; 0.8 µM de cada primer; 0.5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen®) y 4 ng de DNA. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad C1000 (Bio-Rad Laboratories, EE. UU.) con las siguientes condiciones: un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 2 min seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 s; alineamiento a 55 °C para la región ITS, 54 °C para el gen *EF-1α* y 58 °C para el gen *BT2* durante 30 s; extensión a 72 °C por 1 min; y un paso final de extensión a 72 °C durante 10 min (Cuadro 4).

Del producto de PCR se utilizaron 4 uL para electroforesis en gel de agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio, con el buffer de corrida TAE 1 X, por 45 min a 90 volts. El producto se visualizó bajo luz ultravioleta.

Finalmente, los productos de PCR se purificaron con el kit de purificación de PCR QIAquick (Qiagen, Valencia, CA) y se secuenciaron por MacroGen (MacroGen Inc., Seúl, Corea) en ambas direcciones con los mismos iniciadores que se usaron para las reacciones de PCR.

**Cuadro 4.** Nombres de los genes o regiones amplificadas, los marcadores utilizados, su secuencia, los fragmentos (pb), la temperatura de fusión y referencia.

Gen o región	Marcador	Secuencia	Fragmento (pb)	Tm (°C)	Referencia
<b>ITS</b>	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	~ 315	55	White <i>et al.</i> , 1990
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG			
<b>EF-1<math>\alpha</math></b>	EF1-688F	CGGTCACTTGATCTACAAGTGC	~ 300	54	Alves <i>et al.</i> , 2008
	EF1-1251R	CCTCGAACTCACCAGTACCG			
<b>BT2</b>	Bt2A	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC	~ 495	58	Glass y Donaldson, 1995
	Bt2B	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC			

7.3.2.1. Filogenia. Las secuencias obtenidas se ensamblaron utilizando el paquete Staden (Staden *et al.* 1998). Las secuencias tipo y los aislados de las referencias de las especies de *Lasiodiplodia* de cada locus analizado se descargaron en la base de datos de secuencias del GenBank y se combinaron con las secuencias recién generadas. Se realizaron múltiples alineaciones de secuencias para cada locus de forma independiente utilizando MEGA 7.0.14 (Kumar *et al.* 2016), y se realizaron ajustes manuales cuando fue necesario. La alineación de cada locus se realizó con SequenceMatrix v.1.8 (Vaidya *et al.* 2011) para construir la matriz concatenada.

La filogenia para cada locus (ITS, *EF-1 $\alpha$*  y *BT2*) y la matriz concatenada se infirieron bajo el criterio de Máxima Verosimilitud (ML) y Máxima Parsimonia (MP).

Los análisis se realizaron en RAxML-HPC2 (Stamatakis, 2014) implementando en el portal CIPRES Science Gateway. Las búsquedas del árbol se realizaron bajo el modelo GTRGAMMA con 1000 seudoréplicas.

Las secuencias generadas se depositaron en la base de datos del GenBank (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Número de acceso de GenBank de secuencias de ADN de Botryosphaeriaceae incluidos en el estudio filogenético.

Especie	Código de aislado	Hospedante	Origen	Número de acceso de GenBank		
				ITS	EF-1 $\alpha$	BT2
<i>Barriopsis archontophoenicis</i>	MFLU 20 0523	<i>Camellia sinensis</i>	Taiwán	MT876524	MT897877	Desconocido
<i>B. archontophoenicis</i>	MFLUCC 141164	<i>Archontophoenix aleandreae</i>	Tailandia	KX235306	KX235305	Desconocido
<i>B. iraniana</i>	IRAN1448C	<i>Mangifera indica</i>	Irán	FJ919663	FJ919652	Desconocido
<i>B. iraniana</i>	IRAN1449C	<i>Olea</i> sp.	Irán	FJ919665	FJ919654	Desconocido
<i>B. stevensiana</i>	CBS 174 26	Desconocido	Desconocido	EU673330	EU673296	Desconocido
<i>B. tectonae</i>	GZCC19 0266	Desconocido	China	MZ781424	MZ781491	MZ852497
<i>B. tectonae</i>	MFLUCC 12 0381	<i>Tectona grandis</i>	Tailandia	KJ556515	KJ556516	KJ556517
<i>B. thailandica</i>	CCLF359	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>B. thailandica</i>	MFLUCC 14 1190	Desconocido	Tailandia	KY115675	KY115676	Desconocido
<i>Diplodia mutila</i>	CMW7060	<i>Fraxinus excelsior</i>	Países bajos	CMW7060	AY236955	AY236904
<i>D. seriata</i>	CBS112555	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	AY259094	AY573220	Desconocido
<i>Lasiodiplodia avicenniae</i>	CMW41467	<i>Avicennia marina</i>	Sudáfrica	KP860835	KP860680	KP860758
<i>L. avicenniae</i>	LAS199	<i>Avicennia marina</i>	Sudáfrica	KU587957	KU587947	KU587868
<i>L. brasiliense</i>	CCLF353	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>L. brasiliense</i>	CMM4015	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	JX464063	JX464049	Desconocido
<i>L. brasiliense</i>	CMW35884	<i>Adansonia madagascariensis</i>	Madagascar	KU887094	KU886972	KU887466
<i>L. cinnamomi</i>	CFCC 51997	<i>Cinnamomum</i> sp.	China	MG866028	MH236799	MH236797
<i>L. cinnamomi</i>	CFCC 51998	<i>Cinnamomum</i> sp.	China	MG866029	MH236800	MH236798
<i>L. gravistriata</i>	CMM4564	<i>Anacardium humile</i>	Brasil	KT250949	KT250950	Desconocido
<i>L. gravistriata</i>	CMM4565	<i>Anacardium</i> sp.	Brasil	KT250947	KT266812	Desconocido
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1502C	<i>Juglans</i> sp.	Irán	GU945347	GU945335	KU887517
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1520C	<i>Salvadora persica</i>	Irán	GU945348	GU945336	KU887516
<i>L. jatrophiicola</i>	CCLF352	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>L. jatrophiicola</i>	CMM3610	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234544	KF226690	KF254927
<i>L. mediterranea</i>	BL1	<i>Quercus ilex</i>	Italia	KJ638312	KJ638331	Desconocido
<i>L. mediterranea</i>	BL101	<i>Vitis</i> sp.	Italia	KJ638311	KJ638330	Desconocido
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	EF622077	EF622057	EU673111
<i>L. pseudotheobromae</i>	CCLF354	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>L. pseudotheobromae</i>	CCLF355	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>L. pseudotheobromae</i>	CCLF356	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>L. pseudotheobromae</i>	CCLF357	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>L. pseudotheobromae</i>	CCLF358	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>L. pseudotheobromae</i>	CGMCC 3-18047	<i>Pteridium</i> sp.	China	KX499876	KX499914	KX499989
<i>L. subglobosa</i>	CCLF351	<i>Citrus latifolia</i>	México	-----	-----	-----
<i>L. subglobosa</i>	CMM3872	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234558	KF226721	KF254942
<i>L. subglobosa</i>	CMM4046	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234560	KF226723	KF254944
<i>L. thailandica</i>	B0041	<i>Phyllanthus acidus</i>	Tailandia	KM006433	KM006464	Desconocido
<i>L. thailandica</i>	B0421	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido	Desconocido
<i>L. theobromae</i>	CBS111530	Desconocido	Desconocido	EF622074	EF622054	KU887531
<i>L. theobromae</i>	CBS164.96	Fruta en la costa de arrecifes de coral	Nueva guinea	AY640255	AY640258	KU887532
<i>L. viticola</i>	UCD2553AR	<i>Vitis</i> sp.	U. S. A.	HQ288227	HQ288269	HQ288306
<i>L. viticola</i>	USD2604MO	<i>Vitis</i> sp.	U. S. A.	HQ288228	HQ288270	HQ288307
<i>Phaeobotryon aplospora</i>	CFCC 53776	<i>Rhus typhina</i>	China	MN215838	MN215873	MN205997

#### 7.4. Pruebas de Patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad de los aislados de *Lasiodiplodia* spp. y del aislado de *B. thailandica* se llevaron a cabo en árboles certificados de limón Persa de un año. Para la inoculación se realizaron heridas en las ramas de limón Persa con un bisturí estéril, se colocó un disco de PDA colonizado (5 mm de diámetro) de 7 días de edad en el área de la herida y se selló con papel Parafilm para evitar la desecación. Con cada aislado fúngico se inocularon tres ramas. Inmediatamente después de la inoculación, cada planta se roció con agua estilada estéril y se cubrió con una bolsa de plástico durante 72 h para mantener la humedad. Los árboles se manejaron agronómicamente durante un mes en invernadero bajo condiciones de luz y temperatura naturales. La virulencia de los aislados se evaluó 30 días después de la inoculación, eliminando la corteza y midiendo la longitud de la lesión vascular con un vernier digital (Bautista-Cruz *et al.*, 2019). Posteriormente, se llevó a cabo el re-aislamiento de los hongos a partir de las ramas sintomáticas con la finalidad de completar los postulados de Koch (Agrios, 2005).

#### 7.5. Sensibilidad *in vitro* de *Lasiodiplodia* spp. a Fungicidas

En este estudio se utilizaron fungicidas comerciales de pyraclostrobin, tiofanato metíl, pirimetanil, clorotalonil, boscalid y un extracto vegetal (*Cinnamomum* spp., *Ricinus* spp., *Azadirachta* spp., quitinasa y lipasa) (Cuadro 7). Las concentraciones evaluadas se basaron en el ingrediente activo para cada uno de los fungicidas.

La sensibilidad *in vitro* se determinó con base en ensayos de inhibición del crecimiento micelial de ocho aislados de *Lasiodiplodia* spp. Para ello, se preparó una solución madre de los fungicidas en agua destilada estéril, agregando únicamente al pyraclostrobin 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de SHAM, y se agregó al medio PDA, después de la esterilización, para obtener las concentraciones indicadas en el Cuadro 7. Placas Petri con medio PDA sin fungicidas sirvieron como testigo. Todas las placas Petri con medio PDA con fungicida se prepararon 24 h antes de usarlas en la prueba y se mantuvieron en oscuridad continua. Para cada aislado, se tomaron discos miceliales de 5 mm de diámetro del



margen con crecimiento activo de una colonia de 5 días de edad y se colocaron en el centro de placas Petri con PDA + fungicida a cada una de las concentraciones a evaluar. Las placas se incubaron durante 3 días a 28°C en oscuridad continua. Para cada aislado, se usaron tres replicas por concentración. El diámetro de la colonia en cada placa Petri se midió de forma perpendicular en dos direcciones y se promedió. El experimento completo se realizando dos veces.

La concentración efectiva que inhibe el 50% del crecimiento micelial (CE<sub>50</sub>) para cada aislado se calculó con una curva de dosis-respuesta ajustada a los datos con una regresión log-logística con el paquete R *ezec* (Kamvar, 2016) usando el modelo LL.3 en el paquete R *drc* (Ritz *et al.*, 2015). La normalidad de los datos de ambos experimentos para cada fungicida se verifico con la prueba de Shapiro-Wilk (Mora-Aguilera *et al.*, 2021).

El modelo log-logístico corresponde a la función:

$$f(x, (b, c, d, e)) = c + \frac{d - c}{(1 + \exp(b(\log(x) - \log(e))))}$$

**Cuadro 6.** Fungicidas y concentraciones utilizadas para la prueba de sensibilidad in vitro con ocho aislados de *Lasiodiplodia* spp. obtenidos de tejidos enfermos de limón Persa.

Fungicida	Empresa	Ingrediente activo (i.a)	% de i.a	Concentraciones (µg mL <sup>-1</sup> )
Headline	Syngenta	pyraclostrobin	23.6	0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5 y 10
Cercobin M	BASF	tiofanato-metíl	70	0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50
Scala 60 SC	Bayer CropScience	pirimetanil	54.6	0.1, 0.5, 1, 5, 10 y 50
Cantus	Basf	boscalid	50	1, 5, 10, 50 y 100
Econil 720	Gurpo LUCAVA	clorotalonil	52	1, 5, 10, 50, 100, 500
Extrac	FORMULABAGRO	extracto vegetal	90	100, 500, 1000, 2500, 5000
Bacter				

## 7.6. Análisis Estadístico de la Prueba de Patogenicidad

Los experimentos se establecieron bajo un diseño de dos factores, Región y Aislado, con el factor Aislado anidado en el factor Región (Gavilánez-Luna, 2021). Para cada uno de los tratamientos se realizaron tres replicas (Cuadro 6). Las diferencias de virulencia (longitud de lesión interna) de los

diferentes aislados de *Lasiodiplodia* spp. y *B. thailandica* se determinaron mediante un análisis de varianza y las medias se compararon con la prueba LSD, al 5% de probabilidad usando el paquete estadístico Minitab 19.

**Cuadro 7.** Análisis estadístico para la prueba de patogenicidad.

<b>Región</b>	<b>Aislado</b>		<b>Replica</b>		
<b>Norte</b>	A1	X	X	X	X
	...	X	X	X	X
	A5	X	X	X	X
<b>Centro</b>	A6	X	X	X	X
	...	X	X	X	X
	A14	X	X	X	X

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Estudio de Campo

Durante el muestreo en las huertas de limón Persa se realizó un recorrido por toda el área detectando árboles con síntomas de muerte descendente: gomosis, amarillamiento foliar, presencia de estructuras fúngicas (picnidios), canchales en el tallo y muerte descendente de ramas, posteriormente se procedió a seleccionar 10 árboles al azar ubicados en distintas zonas de la huerta, una vez seleccionados los árboles, se tomaron fragmentos de los tallos sintomáticos, estos fueron puestos en bolsas de polietileno, se rotularon y fueron transportados a las instalaciones de CIAD en una hielera para su posterior procesamiento en el laboratorio.

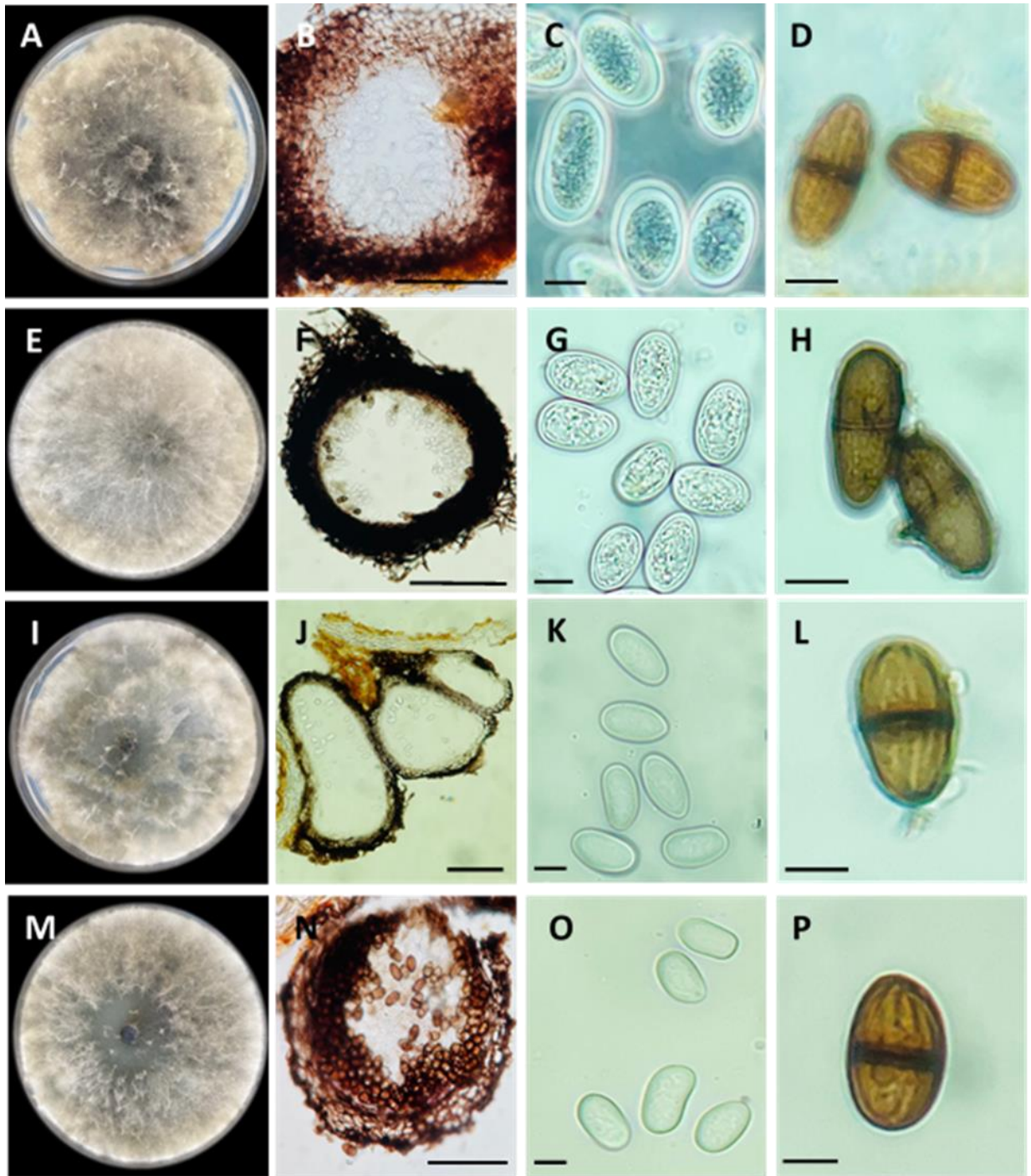
### 8.2. Recolecta de Muestras y Aislamiento de los Hongos

En este estudio se obtuvieron un total de 18 aislados fúngicos de la familia Botryosphaeriaceae a partir de tejidos sintomáticos de limón Persa, recolectados en tres huertas comerciales, distribuidas en los municipios de Ahome, Navolato y Elota en el estado de Sinaloa. Con base en la morfología de las colonias, se utilizó una submuestra de 9 aislamientos representativos (tres por huerto) para los análisis morfológicos y filogenéticos, prueba de patogenicidad y virulencia, así como las pruebas de sensibilidad a fungicidas.

### 8.3. Identificación Morfológica

De los aislados seleccionados, solo ocho de ellos fueron identificados morfológicamente con el apoyo de las claves y descripciones taxonómicas descritas por Phillips *et al.* (2013).

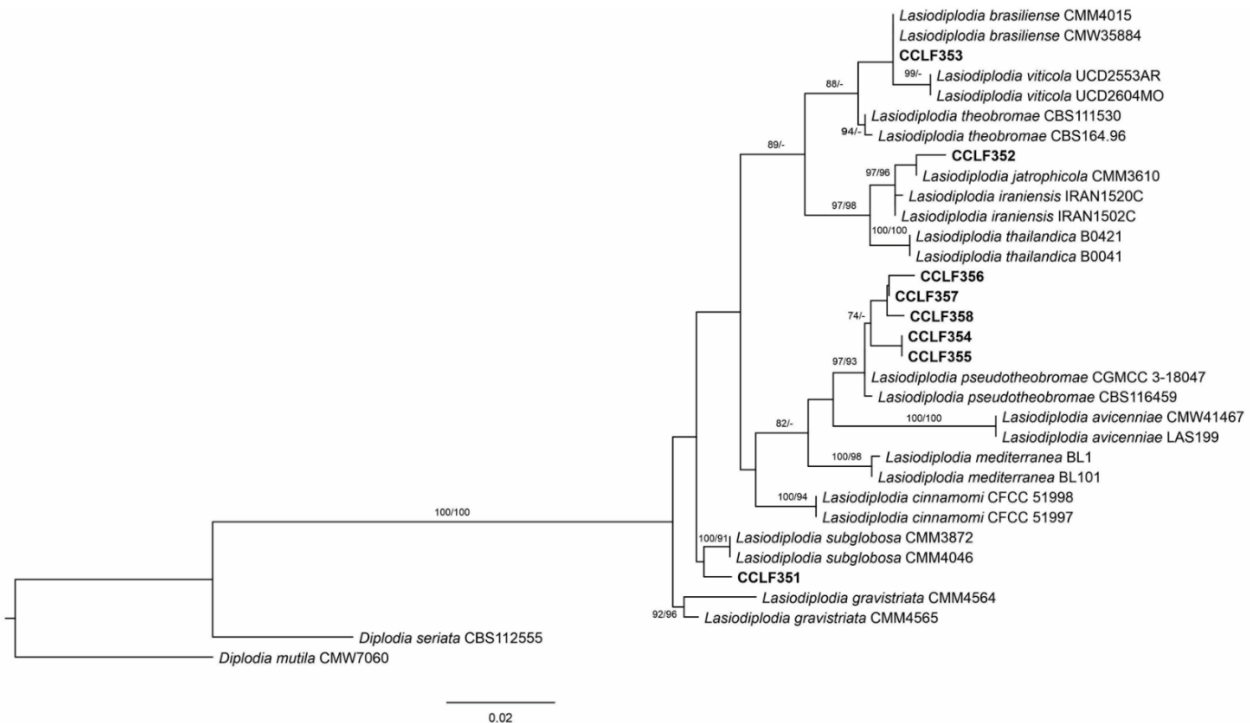
Los ocho aislados fueron observados bajo el microscopio estereoscópico, donde se identificaron colonias con crecimiento de micelio inicialmente blanco, pasando a gris ahumado, gris olivo, azul pizarra oscuro y finalmente negro. La presencia de picnidios desarrollados sobre las acículas de pino, se observó después de transcurrir 30 días de incubación. Los conidios producidos, formados por una sola célula fueron de forma ovalada, hialinos y de doble pared en su inmadurez. En la madurez los conidios mostraron una coloración café oscura, bi-celulares y con estriaciones longitudinales (Figura 4). Estas características coinciden con las estructuras reproductivas asexuales del género *Lasiodiplodia*, concordando con lo reportado por Phillips *et al.* (2013).



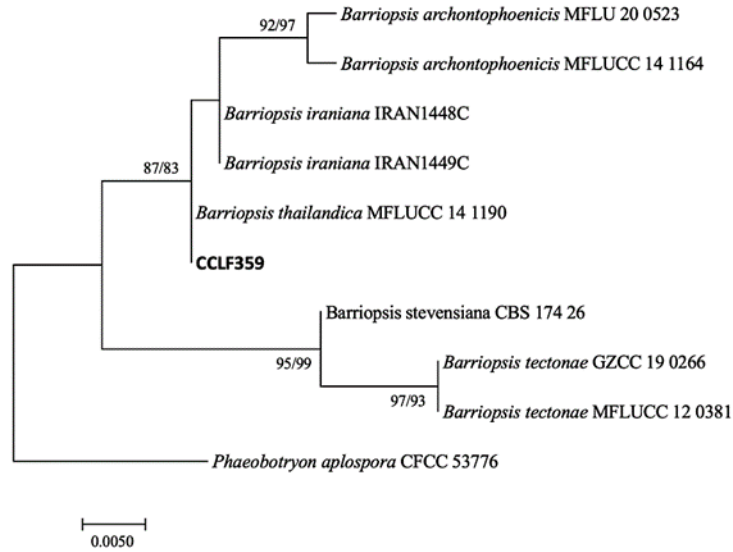
**Figura 4.** . Morfología de aislados de *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (A–D), *L. brasiliense* (E–H), *L. jatroficolae* (I–L) y *L. subglobosa* (M–P) asociados a síntomas de muerte descendente de ramas de limón Persa en Sinaloa, México. A, E, I, M) Colonias en PDA después de 7 días de crecimiento a 28°C en oscuridad continua. (B, F, J, N) Picnidios. (C, G, K, O) Conidios inmaduros. (D, H, L, P) Conidios maduros. Barras de escala: B, F, J, N = 50 µm; C, D, G, H, K, L, O, P= 10 µm.

## 8.4. Análisis Filogenéticos

Los nueve aislados de las especies de la familia Botryosphaeriaceae se identificaron con base en análisis filogenéticos de la región ITS y parte de los genes *EF-1α* y *BT2*. Los conjuntos de datos combinados permitieron distinguir a cuatro especies de *Lasiodiplodia* y una de *Barriopsis* (Figura 5). El primer clado con un aislado (CCLF353) agrupó para *L. brasiliense*, el segundo con un aislado (CCLF352) alineó para *L. jatrophicola*, el tercero con cinco aislados (CCLF356, CCLF357, CCLF358, CCLF354 y CCLF355) agruparon para *L. pseudotheobromae* y el cuarto clado con un aislado (CCLF351) agrupó para *L. subglobosa* (Los valores bootstrap y clados filogenéticos se muestran en la Figura 5). Por otra parte, el aislado CCLF359 se agrupó con el clado de *Barriopsis thailandica* con alto valor bootstrap (Figura 6).



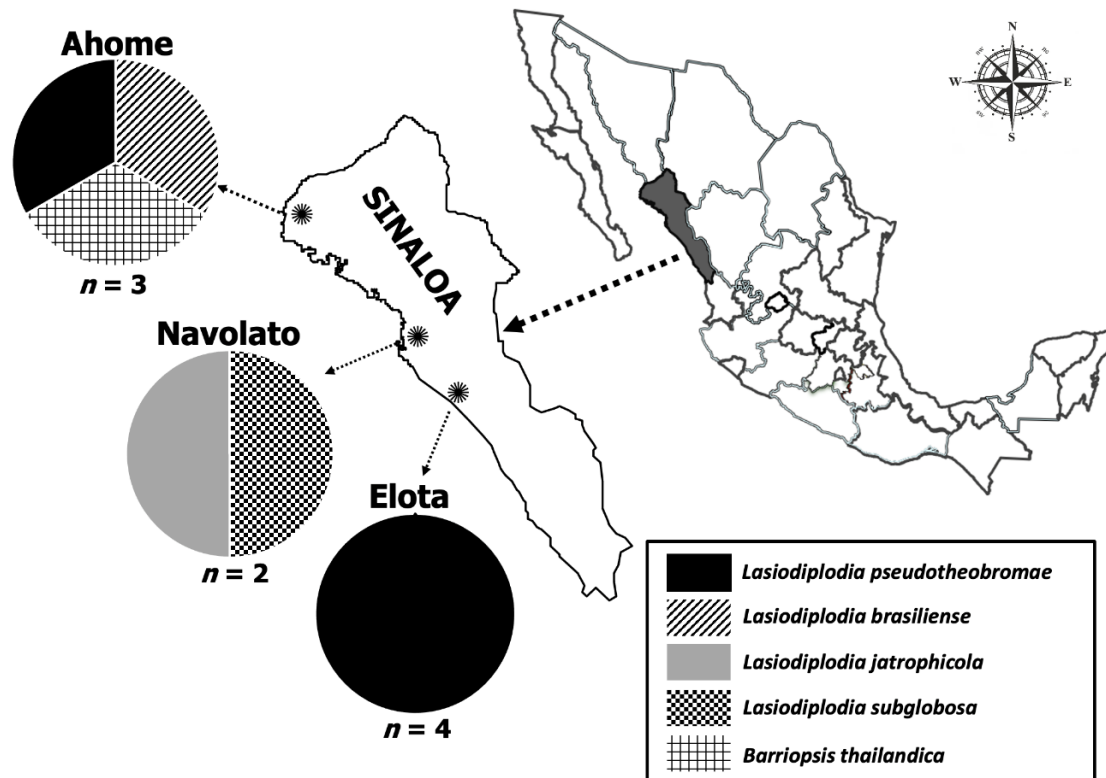
**Figura 5.** Árbol filogenético de las especies de *Lasiodiplodia* inferido de una alineación concatenada de alineación de secuencias ITS, *EF1-α* y *BT2*. Los valores bootstrap por el método de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud se muestran en las ramas respectivas *Diplodia mutila* (CMW7060) y *Diplodia seriata* (CBS112555) se usaron como grupos externos.



**Figura 6.** Árbol filogenético de las especies de *Barriopsis* inferido de una alineación concatenada de secuencias ITS, *EF1- $\alpha$*  y *BT2*. Los valores bootstrap por el método de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud se muestran en las ramas respectivas. *Phaeobotryon aplospora* (CFCC 53776) se usó como grupo externo.

### 8.5. Distribución de las Especies de *Lasiodiplodia*

*Lasiodiplodia pseudotheobromae* fue la especie más frecuentemente aislada (55.5%) de las ramas enfermas de limón Persa, seguida por las especies *L. brasiliense*, *L. subglobosa*, *L. jatrophiicola* y *Barriopsis thailandica* (11.1% cada una). La distribución de las especies de Botryosphaeriaceae varió entre las tres huertas distribuidas en el estado de Sinaloa, México (Figura 7). *L. pseudotheobromae* se encontró en dos de las huertas, entretanto, *L. brasiliense*, *L. subglobosa*, *L. jatrophiicola* y *B. thailandica* se encontraron únicamente una huerta.

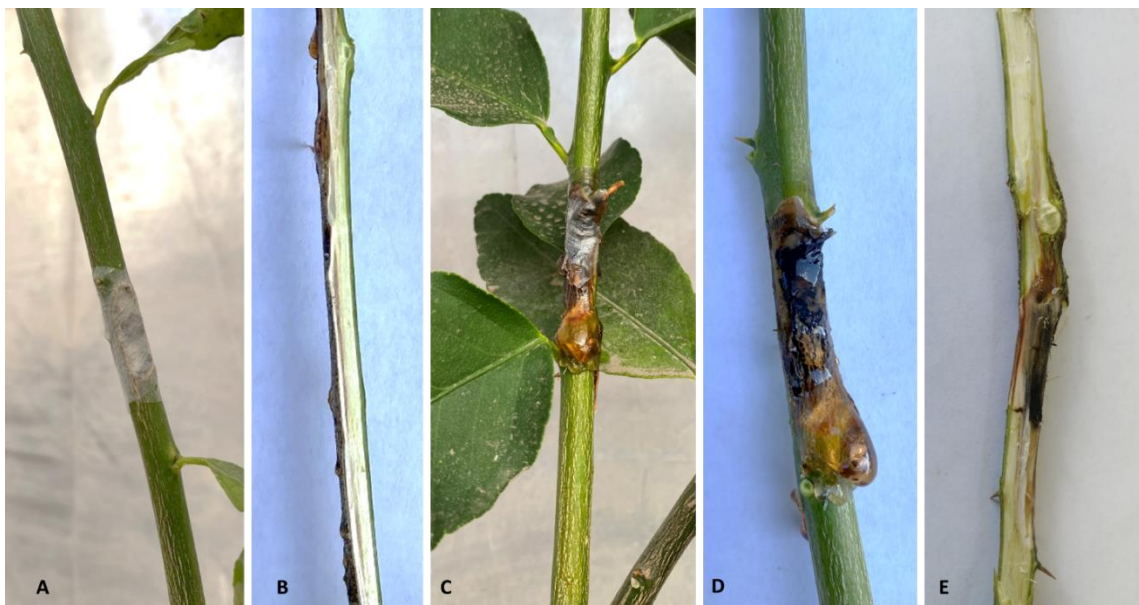


**Figura 7.** Sitios de recolección de muestras de tejidos infectados con géneros de la familia Botryosphaeriaceae en huertos de limón Persa distribuidos en el estado de Sinaloa. Los círculos representan la frecuencia de la asociación de cada especie con limón Persa que mostraron síntomas de muerte descendente de ramas en cada huerto muestreado, n es el número de aislados analizados en cada población.

### 8.6. Patogenicidad y Virulencia en Ramas

Treinta días después de la inoculación, se realizó la observación correspondiente de las ramas inoculadas, donde encontramos que no todos los aislados inoculados fueron patogénicos en las plantas jóvenes de limón Persa. Los ocho aislados de *Lasiodiplodia* spp. indujeron exudaciones gomosas y lesiones necróticas alargadas que se extendían hacia ambos lados desde el sitio de inoculación en las ramas inoculadas. Sin embargo, el aislado de *Barriopsis thailandica* no causó síntomas en las ramas inoculadas (Figura 8). Todos los aislados de Botryosphaeriaceae se recuperaron a partir de las ramas inoculadas (re-aislamiento), cumpliendo con los postulados de Koch. En la Figura 9 se muestran las longitudes de las medias de las lesiones causadas por *Lasiodiplodia* spp. y *Barriopsis thailandica*.





**Figura 8.** Síntomas desarrollados en ramas de árboles jóvenes de limón Persa (*Citrus latifolia*), inoculados artificialmente con *Lasiodiplodia pseudotheobromae* y *Barriopsis thailandica*. 30 días después de la inoculación. (A-B) Ramas inoculadas con *B. thailandica*, sin presencia de necrosis ni exudaciones gomosas. (C) Rama inoculada con *L. pseudotheobromae* produciendo exudaciones gomosas. (D) Rama con síntomas de necrosis y gomosis. (E) Rama con necrosis alrededor del sitio de inoculación y en los haces vasculares.

**Cuadro 8.** Análisis de Varianza (ANOVA).

Fuente	GL	SC	Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Aislado	8	1468.31		98.94%	1468.31	183.539	209.80	0.000
Error	18	15.75		1.06%	15.75	0.875		
Total	26	1484.06		100.00%				

**Cuadro 9.** Resumen del modelo ANOVA.

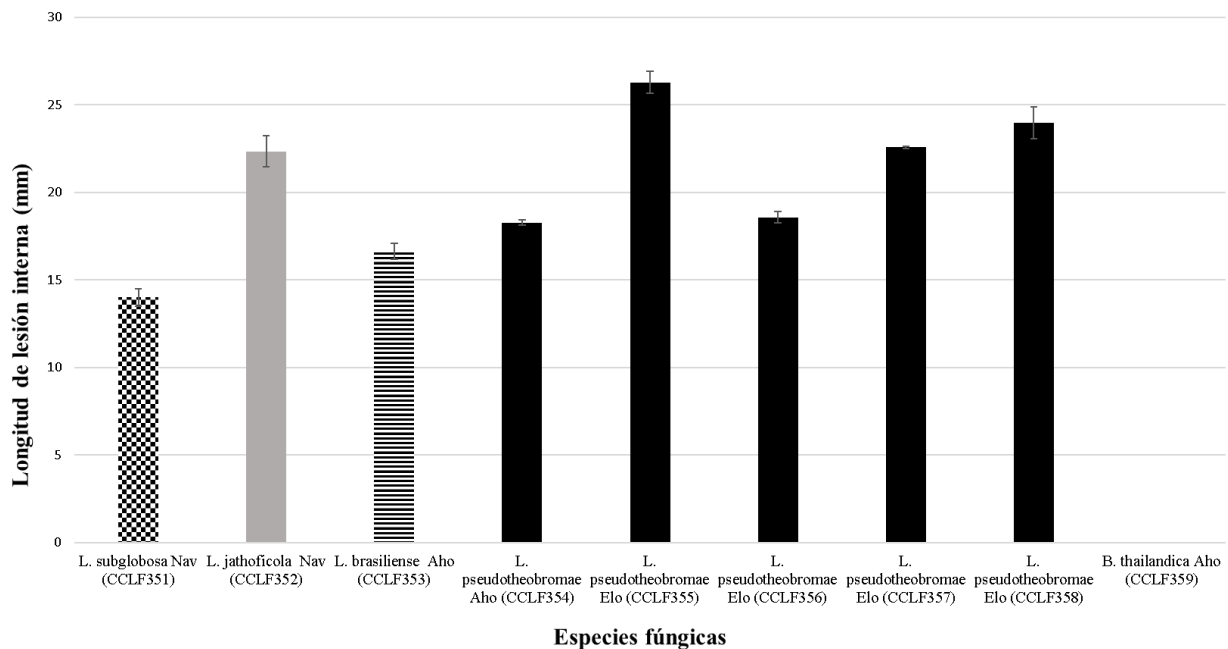
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)	AICc	BIC
0.935315	98.94%	98.47%	35.43	97.61%	95.81	95.02

**Cuadro 10.** Comparación de medias con el método de Tukey con confianza de 95%.

Aislado	N	Media	Agrupación
<i>L. pseudotheobromae</i> Elo (CCLF355)	3	26.2667	A
<i>L. pseudotheobromae</i> Elo (CCLF358)	3	23.9667	A B
<i>L. pseudotheobromae</i> Elo (CCLF357)	3	22.5667	B
<i>L. jatroficolica</i> Nav (CCLF352)	3	22.3333	B
<i>L. pseudotheobromae</i> Elo (CCLF356)	3	18.5667	C

<i>L. pseudotheobromae</i> Aho (CCLF354)	3	17.9333	C D
<i>L. brasiliense</i> Aho (CCLF353)	3	15.6333	D E
<i>L. subglobosa</i> Nav (CCLF351)	3	14.0000	E
<i>B. thailandica</i> Aho (CCLF359)	3	-0.0000	F

La prueba de Tukey para la comparación de medias arroja seis grupos de medias diferentes entre sí en los aislados comparados, existiendo diferencia de patogenicidad entre los aislados obtenidos de la misma huerta de muestro, inclusive siendo la misma especie identificada.

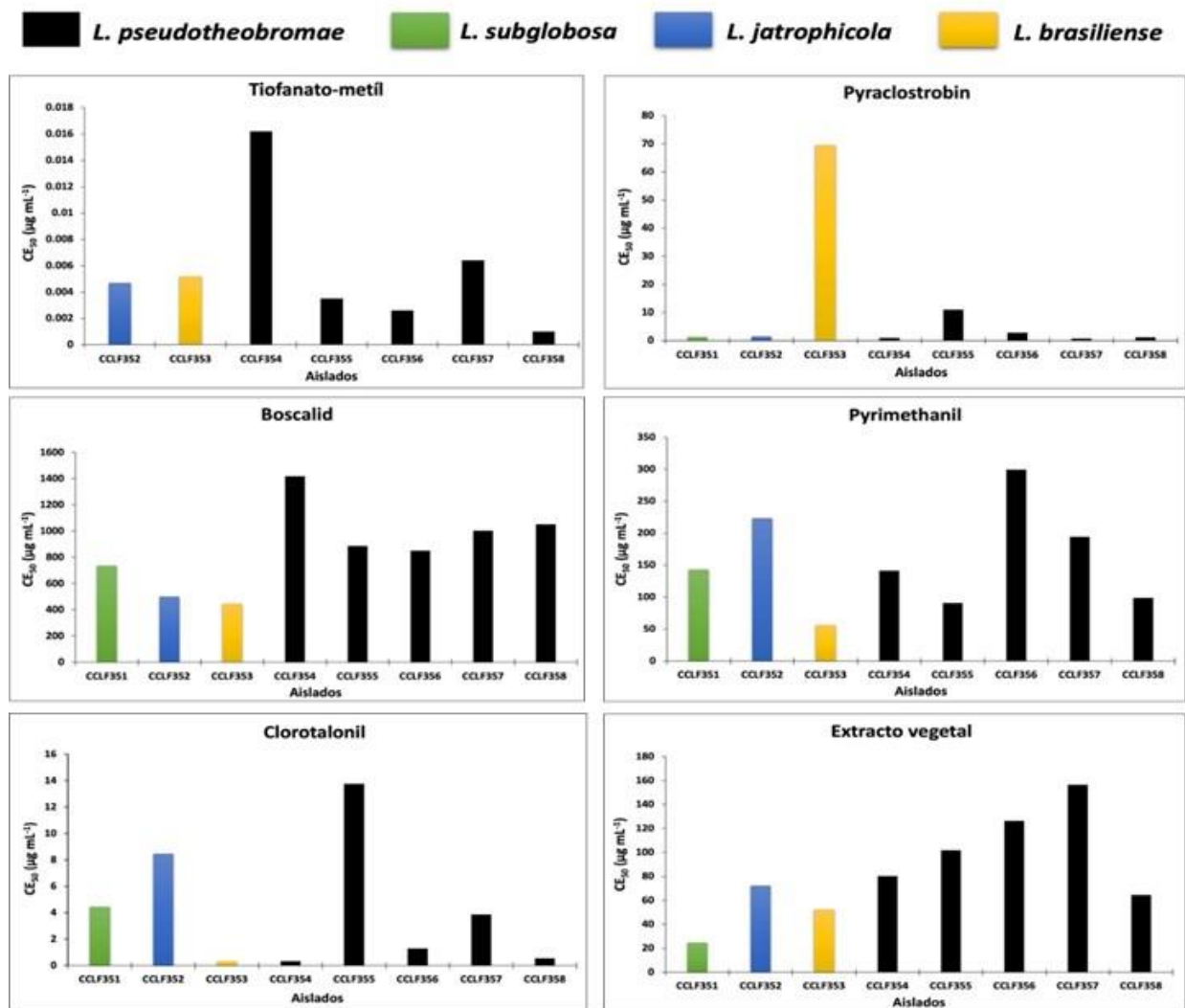


**Figura 9.** Patogenicidad y virulencia de nueve aislados de Botryosphaeriaceae asociados a la muerte descendente del limón Persa (*Citrus latifolia*) en huertos comerciales de Sinaloa, México. Los datos representan la longitud promedio de lesiones internas a los 30 días después de la inoculación con discos de PDA colonizados con micelio colocados en heridas de las ramas. Error estándar 98.94%.

### 8.7. Prueba de Sensibilidad a Fungicidas

El fungicida tiofanato-metíl fue el que causó la mayor inhibición del crecimiento micelial de los ocho aislados de *Lasioidiplodia* spp., con valores de CE<sub>50</sub> que oscilaron entre 0.0018-0.0162 µg

mL<sup>-1</sup>, mostrando que todos los aislados evaluados durante el estudio fueron altamente sensibles a este fungicida (Figuras 10). Los valores de CE<sub>50</sub> para los fungicidas clorotalonil, piraclostrobin, pyrimethanil y boscalid, variaron de 0.3327-13.7663, 0.66-69.59, 56.72-299.21 y 448.7-1418.8 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figura 10). Por otra parte, el extracto vegetal analizado durante la prueba de sensibilidad, resultó con valores de CE<sub>50</sub> con rango de 24.88-126.38 µg mL<sup>-1</sup> (Figura 10).



**Figura 10.** Valores de concentración efectiva de tiofanato-metil, piraclostrobin, boscalid pyrimethanil, clorotalonil, y extracto vegetal que inhiben el 50% del crecimiento micelial (CE<sub>50</sub>) para ocho aislados de *Lasiodiplodia* spp. obtenidos de tres huertos comerciales de limón Persa en Sinaloa, México.

## 9. DISCUSIÓN

En este estudio se muestran los primeros hallazgos sobre especies de la familia Botryosphaeria que infectan a árboles de limón Persa en Sinaloa, México. Con base en análisis filogenéticos con secuencias combinadas de la región ITS, y parte de los genes *EF1- $\alpha$*  y *BT2*, se distinguieron cuatro especies de *Lasiodiplodia* y una del género *Barriopsis*, asociadas a la muerte descendente de ramas. Estas especies incluyeron a *Lasiodiplodia subglobosa*, *L. brasiliense*, *L. jatrofiphicola*, *L. pseudotheobromae* y *Barriopsis thailandica*. No se realizó una caracterización morfológica detallada, debido a que las especies de Botryosphaeriaceae son crípticas, y solo debe utilizarse para complementar los resultados de la filogenia del ADN (Phillips *et al.*, 2013; Bautista-Cruz *et al.*, 2019).

En general, los resultados obtenidos en nuestro estudio en árboles de limón Persa en Sinaloa, México, muestran gran similitud con los resultados obtenidos por Bautista-Cruz *et al.* (2019), Tibpromma *et al.* (2017) y Correia *et al.* (2016), ya que identificaron al menos tres de las mismas especies de *Lasiodiplodia*. Sin embargo, no se encontró la presencia de algunas de las especies mayormente reportadas en cítricos, tales como: *L. theobromae* (Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Valle de la Paz *et al.*, 2019a; Polanco-Florián *et al.*, 2019; Al-Sadi *et al.*, 2013), *L. citrícola* (Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Valle de la Paz *et al.*, 2019a) y *L. iraniensis* (Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Al-Sadi *et al.*, 2013).

*Lasiodiplodia pseudotheobromae* fue la especie más frecuentemente aislada de plantas de limón Persa con síntomas de muerte descendente, y se encontró en dos de los huertos analizados durante el estudio en Sinaloa. Estos resultados coinciden con lo reportado por Bautista-Cruz *et al.* (2019), quienes aislaron a 6 especies de *Lasiodiplodia* afectando a limón Persa en huertos comerciales distribuidos en los estados de Puebla y Veracruz, siendo *L. pseudotheobromae* la especie más frecuentemente encontrada. Similarmente, Valle de la Paz *et al.* (2019a), también registraron la presencia de esta especie causando síntomas de muerte descendente en limón Persa en huertos ubicados en el estado de Morelos. Cabe resaltar que el hongo *L. pseudotheobromae* también se ha asociado con enfermedades en otras especies de cítricos, como naranja agria en Surinam (Alves *et al.*, 2008), especies de *Citrus* en Irán (Abdollahzadeth *et al.*, 2010), limón en Turquía (Awan *et al.*, 2016) y mandarina en Paquistán (Ahmet *et al.*, 2020). Por otra parte, los resultados de la prueba de

patogenicidad revelaron que los aislados de *L. pseudotheobromae* fueron más virulentos en las ramas de limón Persa en comparación con los aislados de *L. jatrophiicola*, *L. subglobosa* y *L. brasiliense*. Coincidiendo con lo reportado por Bautista-Cruz *et al.* (2019), quienes indicaron que *L. pseudotheobromae* fue más virulenta que *L. brasiliense*, sin embargo, nuestros resultados difieren en la patogenicidad de *L. subglobosa*, ya que ellos reportan mayor patogenicidad de *L. subglobosa* que de *L. pseudotheobromae*. Por lo que se sugiere un estudio de patogenicidad con un número mayor de aislados de diversas especies de *Lasiodiplodia* con la finalidad de resolver esta incertidumbre.

*Lasiodiplodia jatrophiicola* fue descrita por primera vez en Brasil (Machado *et al.*, 2014), donde señalaron que *L. jatrophiicola* es filogenéticamente similar a *L. iraniensis*, pero, *L. jatrophiicola* tiene conidios más grandes y paráfisis más pequeños. Esta especie fúngica se ha registrado previamente en *Jatropha curcas* (Machado *et al.*, 2014), uva de mesa (Correia *et al.*, 2016) *Anacardium occidentale* (Netto *et al.*, 2017) y, nopal (*Nopalea cochenillifera*) en Brasil (Feijo *et al.*, 2019), así como en *Adansonia digitata* en Sudáfrica (Cruywagen *et al.*, 2017), *Caryota mitis* en China (Zhu *et al.*, 2015), y, *Acacia heterophylla* en EE.UU. (Jami *et al.*, 2019). Para nuestro conocimiento, este es el primer reporte mundial de *L. jatrophiicola* infectando árboles de cítricos. En la prueba de patogenicidad, *L. jatrophiicola* fue más virulenta en comparación con *L. subglobosa* y *L. brasiliense*, pero no más que *L. pseudotheobromae*. Los resultados obtenidos por Correia *et al.* (2015) coinciden en que *L. pseudotheobromae* es más virulenta que *L. jatrophiicola*, pero difieren en la virulencia de *L. brasiliense*, ya que ellos señalaron que es más virulenta en comparación con *L. jatrophiicola* cuando la inocularon en brotes verdes desprendidos de uva.

*Lasiodiplodia brasiliense* se reportó previamente por Bautista-Cruz *et al.* (2019) causando síntomas de muerte descendente en limón Persa en Puebla y Veracruz, México. Además, *L. brasiliense* se ha registrado como el agente causal de enfermedades en otros cultivos frutales, incluyendo la papaya en Brasil (Netto *et al.*, 2014), uva de mesa en Brasil (Correia *et al.*, 2016), mango en Perú (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017), entre otros. En nuestro estudio, el aislado de *L. brasiliense* fue más virulento en comparación con *L. subglobosa*, pero menos que *L. pseudotheobromae* y *L. jatrophiicola* en plantas jóvenes de limón Persa. Comparándolo con el estudio realizado por Bautista-Cruz *et al.* (2019), encontramos que nuestros resultados concuerdan en que *L. brasiliense* es menos virulento que *L. pseudotheobromae*; pero difieren en la patogenicidad de *L. subglobosa*, debido a que ellos observaron mayor grado de virulencia de *L.*

*subglobosa* en comparación a *L. brasiliense*.

*Lasiodiplodia subglobosa* se describió por primera vez en Brasil a partir de nueces (Machado *et al.*, 2014). Posteriormente, en Brasil, se reportó en nuez pecana (*Carya illinoensis*) (Poletto *et al.*, 2016) y en cocotero (*Cocos nucifera*) (Coelho *et al.*, 2022). En México, Bautista-Cruz *et al.* (2019) reportaron por primera vez a *L. subglobosa* fuera de Brasil, afectando a árboles de limón Persa indicando que fue la especie menos comúnmente aislada, sin embargo, en su prueba de patogenicidad con árboles jóvenes de limón Persa resultó ser la más virulenta, lo que difiere con los resultados obtenidos durante este estudio, ya que fue la especie con menos grado de virulencia entre las 4 especies aisladas.

*Barriopsis thailandica* se describió por Tibpromma *et al.* (2017) como un hongo saprofito en la corteza en descomposición de *Tactona grandis*, lo cual coincide con lo encontrado en nuestro estudio, debido a que, en la prueba de patogenicidad, los árboles de limón Persa no mostraron síntomas durante el tiempo que duro la prueba.

El complejo de especies de *Lasiodiplodia* representa una potente amenaza para la industria del limón Persa y se necesitan estudios posteriores sobre el impacto y la epidemiología de estos hongos, para desarrollar estrategias de manejo adecuadas y así para reducir el impacto de la enfermedad en la productividad y longevidad de los huertos de limón Persa en Sinaloa, México.

En este estudio, se encontraron especies de *Lasiodiplodia* altamente sensibles al tiofanato-metíl, ya que, el valor máximo obtenido para  $CE_{50}$  fue de  $0.016 \mu\text{g mL}^{-1}$ , indicando una alta efectividad de los fungicidas MBC para el control de los aislados de *Lasiodiplodia* spp. obtenidos de limón Persa en Sinaloa. En otros estudios se han encontrado aislados resistentes o altamente resistentes, como lo indican los autores Yang *et al.* (2021), quienes evaluaron la sensibilidad in vitro a tiofanato-metíl en 224 aislados de *L. theobromae* obtenidos de mango en China, de los cuales solo el 28% se clasificó como sensible con valores de  $CE_{50}$  de  $0.001-1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que, para el resto de los aislados, la  $CE_{50}$  vario entre  $48.89-898.60 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por su parte, Cavalcante *et al.* (2014) en Brasil, aislaron a la especie *L. theobromae* de papaya, determinando que el 79.8% de 109 aislados fueron sensibles al tiofanato-metíl con una  $CE_{50}$  media de  $1.87 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que para el resto de la  $CE_{50}$  media fue  $>300 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

El fungicida clorotalonil, fue eficaz para la inhibición del crecimiento micelial de *Lasiodiplodia* spp., ya que los valores de  $CE_{50}$  fueron  $<13.77 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Los aislados más sensibles fueron *L. brasiliense* (CCLF353) y *L. pseudotheobromae* (CCLF354) obtenidos de un huerto en Ahome; así

como un aislado de *L. pseudotheobromae* (CCLF358) obtenido de un huerto de Elota, cuyos valores de  $CE_{50}$  fueron  $<0.56 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por Pitt *et al.* (2012) y Amponsah *et al.* (2012), quienes aislaron a diferentes géneros de la familia Botryosphaeriaceae de tejidos de vid en Australia y Nueva Zelanda, respectivamente, y determinaron su sensibilidad *in vitro* al fungicida clorotalonil, concluyendo que los aislados fueron sensibles en ambos estudios con valores de  $CE_{50} <2 \text{ mg L}^{-1}$  y  $<2 \text{ mg L}^{-1}$ . Así mismo, Tovar-Pedraza *et al.* (2013), reportaron una  $CE_{50}$  media de  $7.598 \mu\text{g mL}^{-1}$  de clorotalonil en un estudio de sensibilidad *in vitro* con un aislado de *L. theobromae* obtenido de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en Guerrero, México.

Los aislados de *Lasiodiplodia* spp. analizados en este estudio fueron en su mayoría sensibles al fungicida pyraclostrobin, el 87.5% de los aislados presentó valores de  $CE_{50}$  entre los rangos  $0.66$  y  $11.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; mientras que el aislado de *L. brasiliense* tuvo un valor de  $CE_{50}$  de  $69.59 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Con base en la escala de sensibilidad (valores de  $CE_{50} < 10 \mu\text{g mL}^{-1}$  = sensibles;  $10-100 \mu\text{g mL}^{-1}$  = resistentes; y valores  $>100 \mu\text{g mL}^{-1}$  = altamente resistentes) a pyraclostrobin reportada por Yang *et al.* (2021) para aislados de *L. theobromae*, tenemos que el 87.5% de nuestros aislados es sensible y el 12.5% se considera resistente al piraclostrobin. Los resultados de este estudio concuerdan con los obtenidos Pitt *et al.* (2012), quienes evaluaron la sensibilidad *in vitro* a pyraclostrobin de *L. theobromae* obteniendo una  $CE_{50}$  media de  $3.99 \text{ mg L}^{-1}$ . Así mismo, los autores Fan *et al.* (2019), reportan que la especie *B. dothidea* aislada de manzana en China, no tuvo resistencia al pyraclostrobin, obteniendo una  $CE_{50}$  entre  $0.70$  y  $7.13 \mu\text{g mL}^{-1}$  en los 97 aislados evaluados.

El fungicida pyrimethanil, fue ineficaz para inhibir el crecimiento micelial *in vitro* de las especies de *Lasiodiplodia* aisladas de limón Persa en Sinaloa, resultando en una  $CE_{50}$  media de  $156.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; *L. brasiliense* (CCLF353) y dos aislados de *L. pseudotheobromae* (CCLF355 y CCLF358) obtuvieron valores de  $CE_{50}$  entre  $56.7-98.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que el resto de los aislados tuvieron una  $CE_{50}$  superiores a  $141.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Nuestros resultados son consistentes con los obtenidos por Pitt *et al.* (2012) y Tovar-Pedraza *et al.* (2013), quienes evaluaron la sensibilidad de *L. theobromae* al fungicida pyrimethanil, obteniendo  $CE_{50}$  media de  $12.37$  y  $1.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Sin embargo, las concentraciones medias obtenidas en estos estudios son muy inferiores a las registradas en este estudio ( $156.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Por su parte, Amponsah *et al.* (2012), señalan que el crecimiento micelial *in vitro* de las especies *Neofusicoccum australe*, *N. luteum* y *D. mutila*, no se inhibió por el fungicida pyrimethanil, inclusive a concentraciones de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$ .

Los resultados de la prueba de sensibilidad *in vitro* de *Lasiodiplodia* spp. a boscalid, indicaron que este fungicida fue ineficaz para la inhibición del crecimiento micelial de estas especies, debido a que las  $CE_{50}$  oscilaron entre 448.7-1418.83  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con una  $CE_{50}$  media de 862.9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Esto es consistente con lo obtenido por Pitt *et al.* (2012), quienes evaluaron la sensibilidad *in vitro* a boscalid de las especies *L. theobromae*, *D. seriata*, *B. dothidea* y *N. parvum*, obteniendo una  $CE_{50}$  media de 8.14  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , la cual, a pesar de ser muy inferior a la obtenida en este estudio, corrobora la ineficacia de boscalid para el control de hongos de la familia Botryosphaeriaceae, y la resistencia generada por los patógenos hacia este ingrediente activo. Similarmente, Froelichyguido (2019), evaluó los fungicidas boscalid y fluopiram pertenecientes a la clase SDHI, indicando que la  $CE_{50}$  de *Botryosphaeria obtusa* fueron  $>56.819 \mu\text{g mL}^{-1}$  y  $>100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, ambos resultaron ineficaces para el control de este hongo, no obstante, la  $CE_{50}$  mínima encontradas durante este estudio fue en gran medida superior a la encontrada durante el estudio de Froelichyguido (2019), esto puede estar directamente relacionado con la especie probada, o con la resistencia generada por los patógenos, para lo cual se requiere de un estudio más detallado con ambos géneros y un mayor número de aislados evaluados.

El extracto vegetal evaluado en condiciones *in vitro* mostró mayor efecto inhibitor del crecimiento micelial que algunos fungicidas químicos probados durante este estudio. Para esta prueba, las  $CE_{50}$  oscilaron entre 24.8 y 126.3  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , con una  $CE_{50}$  media de 84.94  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . El 62.5% de los aislados obtuvo una  $CE_{50} < 80.33 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mientras que el 37.5% de los aislados restantes, tuvieron una  $CE_{50} > 101.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estos valores de sensibilidad, fueron menores en comparación a los reportados por Langa-Lomba *et al.* (2021), quienes realizaron pruebas de sensibilidad *in vitro* de los patógenos causantes del cancro por Botryosphaeriaceae en vid a dos extractos botánicos de *Urtica dioica* (ortiga) y *Equisetum arvense* (cola de caballo) ambas adicionadas con oligómeros de quitosano (COS), donde las  $CE_{50}$  oscilaron entre 72.6 y 215.2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para COS + ortiga, y, entre 109.4 y 304.1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para COS+ cola de caballo. Esta variabilidad puede deberse a la diferencia de especies y extractos utilizados en ambos casos. Por otra parte, Céspedes *et al.* (2014) evaluaron la sensibilidad de *L. theobromae* diversos de extractos vegetales, indicando que los de mayor efecto fueron los extractos de *Datura metel* y *Cassia alata*, inhibiendo el 75.25 y 69.31% del crecimiento micelial *in vitro*, respectivamente.



## 10. CONCLUSIÓN

Los hallazgos en este estudio representan la primera investigación detallada sobre la filogenia, distribución, patogenicidad y sensibilidad a fungicidas de cuatro especies de *Lasiodiplodia* asociadas con síntomas de muerte descendente de árboles de limón Persa en Sinaloa. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* fue la especie más frecuentemente aislada y con mayor virulencia en comparación con las otras tres especies identificadas durante este estudio (*L. subglobosa*, *L. jatrophiicola* y *L. brasiliense*).

La sensibilidad *in vitro* a los fungicidas evaluados entre las especies de *Lasiodiplodia* fue similar, y se encontró que los fungicidas tiofanato-metíl y piraclostrobin mostraron mayor inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Lasiodiplodia* spp.; sin embargo, no se puede restar la importancia del uso de extractos vegetales, ya que, en este estudio, resultó con mayor efectividad que algunos fungicidas químicos como boscalid y pyrimethanil.

No obstante, se requieren estudios posteriores de la evaluación de la eficacia de los fungicidas en huertos comerciales de limón Persa para el manejo de la enfermedad.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- 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*. 25: 1-10.
- Adesemoye, A.O., Mayorquin, J.S., Wang, D.H., Twizeyimana, M., Lynch, S.C. and Eskalen, A. (2014). Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease*. 98(1): 55-61. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0492-RE>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. 5th ed. San Diego, Elsevier Academic Press.
- Al-Sadi, A.M., Al-Wehaibi, A.N., Al-Shariqui, R.M., Al-Hammadi, M.S., Al-Mahmooli, I.H. and AlGhaithi A.G. (2013). Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, citrus and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease* 97(10): 1363-1369. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0245-RE>
- Álvarez, M.G. (1976). Primer catálogo de enfermedades de plantas mexicanas. *Fitofilo* 71: 169p.
- Alves, A., Crous, P.W., Correia, A. and Phillips, A.J.L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*. 28:1-13.
- Amponsah, N. T., Jones, E., Ridgway, H.J. and Jaspers, M.V. (2012). Evaluation of fungicides for the management of *Botryosphaeria* dieback diseases of grapevines. *Pest Management Science*. 68: 676- 683. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.2309>
- Awan, Q.N., Akgul, D.S., and Unal, G. (2016). First report of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causing postharvest fruit rot of lemon in Turkey. *Plant Disease*. 100(11): 2327. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0512-PDN>
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A., Hamer, M. and Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Management Science*. 58: 649- 696. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.520>
- Bautista-Cruz, M.A., Almaguer-Vargas, G., Leyva-Mir, S.G., Colinas-Leon, M.T., Correia, K.C., Camacho-Tapia, M., Robles-Yerena, L., Michereff, S.J. y Tovar- Pedraza, J.M. (2019). Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of Persian lime in Mexico. *Plant Disease*. 103(6): 1156-1165. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1036-RE>
- Berraf-Tebbal, A., Mahamedi, A.E., Aigoun-Mouhous, W., Špetík, M., Čechová, J., Pokluda, R., Baránek, M. Eichmeier, A. and Alves A. (2020) *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other Botryosphaeriaceae species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *PLOS ONE* .15(5): e0232448. Doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232448>
- Birla, K., Rivera-Varas, V., Secor, G. A., Khan, M. F. R. and Bolton, M. D. (2012). Characterization of cytochrome b from European field isolates of *Cercospora beticola* with quinone outside inhibitor resistance. *European Journal of Plant Pathology*. 134: 475- 488. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0029-y>
- Cavalcante, D.R., Lima, W.G., Martins B.R., Tovar-Pedraza, J.M., Michereff, S. J. and Câmara, S.M. P. (2014). Thiophanate-methyl sensitivity and fitness in *Lasiodiplodia theobromae*

- populations from papaya in Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 140: 251- 259. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0459-9>
- Céspedes, C., Salazar, J., Ariza, A., Yamaguchi, L., Ávila, J. and Aqueveque, P. (2014). Biopesticide from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. *Environmental Research*. 132: 391-406. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.04.003>
- Coelho, I.L., de Assis, T.C., Ferraz, L.G.B., de Souza Freitas, M.T., de Queiroz Balbino, V., dos Santos Viera, W.A., Neves, R.P., Doyle, V.P., Camara, M.P.S., and Laranjeira, D. 2022. *Lasiodiplodia* species diversity associated with coconut leaf blight and stem-end rot in Northeastern Brazil. *European Journal of Plant Pathology*. 162(1): 45-61. (56455). Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02383-9>
- Correia, K.C., Silva, M.A., de Moraes, M.A., Jr., Armengol, J., Phillips, A. J. L., Câmara, M. P. S., and Michereff, S.J. (2016). Phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of table grape in the main Brazilian exporting region. *Plant Pathology*. 65(1):92-103. <https://doi.org/10.1111/ppa.12388>
- Crous P.W., Slippers B., Wingfield M.J., Rheeder J., Marasas W.F., Phellips A.J., and Groenewald J.Z. (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in mycology*, 55: 235-253. Doi: 10.3114/sim.2007.57.01
- Cruywagen, E.M., Slippers, B., Roux, J. and Wingfield, M.J. (2017). Phylogenetic species recognition and hybridisation in *Lasiodiplodia*: A case study on species from baobabs. *Fungal Biology*. 121(4): 420- 436. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.014>
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. *Molecular Techniques in Taxonomy*, 283-293. Doi: 10.1007/978-3-642-83962-7\_18
- Duan, Y. B., Liu, S. M., Ge, C.Y., Feng, X.J., Chen, C.J. and Zhou, M.G. (2012). *In vitro* inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* by mixtures of azoxistrobin, SHAM and thiram. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 103(2): 101- 107. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.04.004>
- Espargham, N., Mohammadi, H. and Gramaje, D. (2020). A Survey of Trunk Disease Pathogens within Citrus Tress in Iran. *Plants*. 9(6): 754. <https://doi.org/10.3390/plants9060754>
- Fan, K., Jie-Wang, Li-fu, Zhang, G.F., Wu, H.B., Feng, C. and Lu-Qu, J. (2019). Baseline Sensitivity and control efficacy of pyraclostrobin against *Botryosphaeria dothidea* isolates in China. *Plant Disease*. 103(7):1458-1463. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1214-RE>
- Faruk-Hasan, Md., Asadul-Islam Md. And Biswanath-Sikdar (2020). PCR and sequencing base detection of gummosis disease on *Citrus aurantifolia* caused by *Lasiodiplodia theobromae* and evaluation of its antagonisms. *Journal of Advances in Microbiology*. 20(3): 77- 90. Doi: 10.9734/JAMB/2020/v20i330230
- Feijo, F.M., Silva, M.J.S., Nascimento, A.D., Infante, N.B., Sobrenho, R.R., Assunção, I. P. and Lima G.S. (2019). Botryosphaeriaceae species associated with the pickly pear cactus, *Nopalea cochenillifera*. *Tropical. plant pathology*. 44: 452–459. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40858-019-00299-8>
- Food and Agricultural Organization (FAO) (2020). Resource document. <http://faostat.fao.org> . Accessed on January 2022.

- FRAC (2021) Available in <https://www.frac.info/frac-teams/exper-t-fora/benzimidazoles/recommendation>
- Froelichyguido, M. H. and Schnabel, G. (2019). Investigation of fungi causing twig blight diseases on peach trees in South Carolina. *Plant Disease*. 103(4): 705-710. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1052-RE>
- Gavilánez-Luna , F. (2021). Diseño y análisis estadísticos para experimentos agrícolas. Ediciones Díaz de Santos. pp. 668
- Glass, N.L and Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:1323-1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Guajardo, J., Riquelme, N., Tapia, L., Larach, A., Torres, C., Camps, R., and Besoain, X. (2018). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing bot gummosis in *Citrus limon* in Chile. *Plant Disease*. 102(4): 818. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1517-PDN>
- Jami, F., Marincowitz, S., Slippers, B., Crous, P.W., Le Roux, J.J., Richardson, D.M., and Wingfield, M.J. (2019). Botryosphaeriaceae associated with *Acacia heterophylla* (La Reunion) and *Acacia koa* (Hawaii). *Fungal Biology*. 123(11): 783-790. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.07.001>
- Kamvar, ZN (2016) eze: interfaz fácil para cálculos de concentración efectivos. Paquete R versión 1.0.1. <https://CRAN.R-project.org/package=eze>
- Kumar, S., Stecher, G. and Tamura, K. (2016). Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 form bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870- 1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Langa-Lomba, N., Buzón-Durán, L., Martín-Ramos, P., Casanoca-Gascón, J., Martín-Gil, J., Sánchez-Hernández, E. and Gonzáles-García, V. (2021). Assessment of conjugate complexes of chitosan and *Urtica dioica* or *Equisetum arvense* extracts for the control of grapevine trunk pathogens. *Agronomy*. 11(5): 976. Doi: <https://doi.org/10.3390/agronomy11050976>
- Leavitt, G. (1990). The occurrence, distribution, effects and control of *Botryodiplodia theobromae* on *Vitis vinifera* in California, Arizona and northern Mexico. (Ph.D. Thesis), University of California, Riverside, California, USA.
- Leyva-Mir, S.G., Bautista-Cruz, M.A., Almaguer-Vargas, G., Colinas-León M.T., Tovar-Pedraza, J.M. y Camacho-Tapia, M. (2021). Efectividad de fungicidas y *Trichoderma* spp. para el control de *Lasiodiplodia* spp. en huertos de limón ‘‘Persa’’ en Veracruz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(2), 345-353. Doi: <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i2.2551>
- Liang, H.J., Di, Y.L., Li, J.L., You, H. and Zhu, F. (2015). Baseline sensitivity of pyraclostrobin and toxicity of Sham to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease*. 99: 267- 273. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-14-0633>
- Liang, H.J., Di, Y., Luo, C., Li, J. and Zhu, F. (2019). Effects of SHAM on the sensitivity of *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* to QoI fungicides. *Plant Disease*. 103 (8): 1884-1888. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-18-2142-RE>
- Luo, Y., Lichtemberg, P.S.F., Niederholzer, F.J.A., Lightle, D.M., Fieltrós, D.G., and Michailides, T.J. (2019). Understanding the Process of Latent Infection of Canker-Causing Pathogens in

Stone Fruit and Nut Crops in California. *Plant Disease*. 103(9): 2374-2384. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-1963-RE>

- Machado, A.R., Pinho, D.B. and Pereira, O.L. (2014). Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity*. 67: 231-247.
- Malandrakis, A.A., Markoglou, A.N., Nikou, D.C., Vontas, J.G. and Ziogas, B.N. (2006). Biological and molecular characterization of laboratory mutants of *Cercospora beticola* resistant to Qo inhibitors. *European Journal of Plant Pathology*. 116: 155- 166. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9052-1>
- Mora-Aguilera, J.A., Ríos-López, E.G., Yáez-Zúñiga, M., Rebollar-Alviter, A., Nava-Díaz, C., Leyva-Mir, S.G., Sandoval-Islas, J.S. and Tovar-Pedraza, J.M. (2020). Sensitivity to MBC fungicides and prochloraz of *Colletotrichum gloeosporoides* species complex isolates from mango orchards in Mexico. *Journals of Plant Diseases and Protection*. 128: 481-491.
- Morin, C.H. (1985). Cultivo de cítricos. IICA. San José de Costa Rica. Pag: 203-228.
- Netto, M.S.B., Assunção, I.P., Lima, G.S.A., Marques, M.W., Lima, W.G., Monteiro, J.H.A., Balbino, V.Q., Michereff, S.J., Phillips, A.J.L., and Câmara, M.P.S. (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*. 67:127-141. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4>
- Netto, M.S.B., Lima, W.G., Correia, K.C., Da Silva, C.F.B., Thon, M., Martins, R.B., Miller, R.N.G., Michereff, S.J., and Camara, M.P.S. (2017). Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Biology* 121(4): 437-451. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006>
- Nicolosi, E., Deng, Z.N., Gentile, A., La-Malfa, S., Continella, G. and Tribulato, E. (2000). Citrus phylogeny and genetic origin important species as investigated by molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 100(8): 1155-1166. Doi.org/10.1007/s001220051419
- Palacios, J. (1978). Citricultura moderna. Editado en Hemisferio Sur. Argentina. Pag. 1-2.
- Pérez, M.J. y Cortez, M.E. (2021). Manual de producción de cítricos en el estado de Sinaloa. Inifap, libro técnico núm, 190p.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76: 51-167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., 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.
- Pitt, W.M., Sosnowski, M.R., Huang, R., Qiu, Y., Steel, C.C. and Savocchia, S. (2012). Evaluation of fungicides for the Management of *Botryosphaeria* canker of grapevines. *Plant Disease*. 96(9): 1303- 1308. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-11-0998-RE>
- Polanco-Florián, L.G., Alvarado-Gómez, O.G., Pérez-González, O., González-Garza, R. y Olivares-Sáenz, E. (2019). Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 10(4). Doi:

<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>

- Poletto, T., Gonzatto, C.M., Muniz, M.E., Blume, E., Poletto, I., and Brioso, P. (2016). First report of stem canker caused by *Lasiodiplodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. *Plant Disease*. 100:1016. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0948-PDN>
- Ritz, C, Baty, F, Streibig, J.C. and Gerhard, D. (2015) Análisis de dosis-respuesta usando R. *PLoS ONE* 10(12):e0146021
- Rolshausen, E.P., Úrbez-Torres, J.R., Rooney-Latham, S., Eskalen, A., Smith, R.J. and Gubler, W.D. (2010). Evaluation of pruning wound susceptibility and protection against fungi associated with grapevine trunk diseases. *American Journal of Enology and Viticulture*. 61: 113- 199.
- Rodríguez-Gálvez, E., Maldonado, E., and Alves, A. (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*. 141:477-489. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0557-8>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) (2021). <https://www.gob.mx/siap>.
- Staden, R., Beal, K.F. and Bonfield, J.K. (1998). The Staden package, 1998. Pages 115-130 in: *Bioinformatics Methods and Protocols*. S. Misener and S.A. Krawetz, eds. Humana, New York.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 30: 1312- 1313. Doi: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stampella, P, Hilgert, N.I. y Pochettino, M.L. (2018). Usos medicinales de los cítricos (Citrus l., Rutaceae) entre los criollos del sur de Misiones (Argentina). *Gaia Scientia*, 12(1). Doi:10.22478/ufpb.1981-1268.2018v12n1.32838
- Sun, H.Y., Wang, C.F., Li, W., Zhang, A.X., Deng, Y.Y. and Chen, H.G. (2015). Characterization of *Rhizoctonia cerealis* sensitivity to thifluzamide in China. *Crop Protection*. 69: 65- 69. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.12.006>
- Tibpromma, S., Hyde, K.D., Jeewon, R., Maharachchikumbura, S.S.N., Liu, J.K., Bhat, D.J., McKenzie, E.H.C., Jones, E.B.G., Camporesi, E., Bulgakov, T.S., Doilom, M., de Azevedo-Santiago, A.L.C.M., Das, K., Manimohan, P., Gibertoni, T.B., Lim, Y.W., Ekanayaka, A.H., Thongbai, B., Lee, H.B., Yang, J.B., Kirk, P.M., Sysouphanthong, P., Singh, S.K., Boonmee, S., Dong, W., Raj, K.N.A., Latha, K.P.D., Phookamsak, R., Phukhamsakda, C., Tennakoon, D.S., Li, J., Dayarathne, M.J., Perera, R.H., Xiao, Y., Wanasinghe, D.N., Senanayake, I.C., Goonasekara, I.D., de Silva, N.I., Mapook, A., Jayawardena, R.S., Dissanayake, A.J., Manawasinghe, I.S., Chethana, K.W.T., Luo, Z.L., Hapuarachchi, K.K., Baghela, A., Soares, A.M., Vizzini, A., Meiras-Ottoni, A., Mesic, A., Dutta, A.K., de Souza, C.A.F., Richter, C., Lin, C.G., Chakrabarty, D., Daranagama, D.A., Lima, D.X., Chakraborty, D., Ercole, E., Wu, F., Simonini, G., Vasquez, G., da Silva, G.A., Plautz, H.L.P. Jr., Ariyawansa, H.A., Lee, H., Kusan, I., Song, J., Sun, J., Karmakar, J., Hu, K., Semwal, K.C., Thambugala, K.M., Voigt, K., Acharya, K., Rajeshkumar, K.C., Ryvarden, L., Jadan, M., Hosen, M.I., Miksyk, M., Samarakoon, M.C., Wijayawardene, N.N., Kim, N.K., Matocec, N., Singh, P.N., Tian, Q., Bhatt, R.P., Jose, R., de Oliveira, V., Tulloss, R.E., Aamir, S., Kaewchai, S., Marathe, S.D., Khan, S., Hongsanant, S., Adhikari, S., Mehmood, T., Bandyopadhyay, T.K., Nguyen, T.T.T., Antonýn, V., Li, W.J., Wang, Y., Indoliya, Y., Tkalcec, Z., Elgorban, A.M., Bahkali, A.H.,

- Tang, A.M.C., Su, H.Y., Zhang, H., Promputtha, I., Luangsaard, J., Xu, J., Yan, J., Kang, J.C., Stadler, M., Mortimer, P.T., Chomnunti, P., Zhao, Q., Phillips, A.J.L., Nontachaiyapoom, S., Wen, T.C. and Karunarathna, S.C. (2017b) Fungal diversity notes 491–602: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal taxa. *Fungal Divers* 83:1–261.
- Tovar-Pedraza, J.M., Mora-Aguilera, J.A., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortiz, D., Vilegas-Monter, A. and Leyva-Mir. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey (*Pouteria sapota* (Jacq) H. E. Moore and Stearn) grafts in Mexico. *Revista fitotecnia Mexicana*. 36(3).
- United States Department of Agriculture (USDA). 2019. Disponible en <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=CITRU2> Consultado en enero del 2022.
- U. S. EPA (U.S. Environmental Protection Agency). (2001, November). Benomyl. Retrieved 28 de January de 2022, from [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/benomyl\\_fs.htm](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/factsheets/benomyl_fs.htm)
- Úrbez-Torres, J.R. (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*. 50, S5- S45.
- Vaidya, G., Lohman, D.J. and Meier, R. (2011). SequenceMatrix: Concatenation software form the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistic* 27: 171- 180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>
- Valle de la Paz M., Guillén-Sánchez D., Alía-Tejacal I., López-Martínez, V., Juárez-López, P., Martínez-Fernández, E., Hernández-Arenas, M.G., Y Ariza-Flores, R. (2019a). Distribution, incidence and severity of the dieback (*Lasiodiplodia* spp.) in Persian lime in Morelos, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol 37, No 3.
- Valle de la Paz M., Guillén-Sánchez D., Alía-Tejacal I., López-Martínez, V., Juárez-López, P., Martínez-Fernández, E., Hernández-Arenas, M.G., Y Ariza-Flores, R. (2019b). Control in vitro de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat)Griff. & Maubl y *L. citrícola* Abdollahz aislados de lima persa (*Citrus latifolia* Tanaka) en Morelos, México. *Acta agrícola y pecuaria*.
- Varela-Fuentes, S.E., Orozco-Santos, M., Torres-Acosta, R.I. y Silva, A.G.L. (2013). Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas 428p.
- Velázquez M.J.J., Manzanilla R.M.A., Robles-Gonzales, M. y Orozco-Santos, M. (2013). Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades del limón mexicano y limón Persa. SAGARPA.
- Walker, A., Auclair, C., Gredt, M. and Leroux, P. (2009). First occurrence of resistance to strobirulin fungicides in *Microdochium nivale* and *Microdochium majus* from French naturally infected wheat grains. *Pest Management Science*. 65: 906- 915. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.1772>
- Wise, K.A., Bradley, C.A., Pasche, J.S., Gudmestad, N.C., Dugan, F.M. and Chen, W. (2008). Baseline sensitivity of *Ascochyta rabiei* to azoxistrobin, pyraclostrobin and boscalid. *Plant Disease*. 92: 295- 300. Doi: <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-2-0295>
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*.
- Wood, P.M. and Hollomon, D.W. (2003). A critical evaluation of the role of alternative oxidase in

the performance of strobirulin and related fungicides acting at the QoI site of Complex III. *Pest Management Science*. 59(5): 499- 511. Doi: <https://doi.org/10.1002/ps.655>

Xiao, T., Xu, Y., Chen, H.Z., Di, H.T., Ji, M.X. and Yang, J.H. (2017). Resistance to QoI fungicides in *Botrytis cinerea* populations for strawberries in hilly area of Jiangsu. *Journal of Fruit Science*. 34: 603- 610.

Yang, Y., Dong, G., Wang, M., Xian, X., Wang, J. and Liang, X. (2021). Multifungicide resistance profiles and biocontrol in *Lasiodiplodia theobromae* from mango fields. *Crop Protection*, 145, 1056.11. Doi:10.1016/j.cropro.2021.10561

Zhu, H., Qin, Q.Q., Liu, L. and Yan, W. (2015). First Report of Leaf Spot of Clustering Fishtail Palm (*Caryota mitis*) Caused by *Lasiodiplodia jatrophiicola* in China. *Plant Disease*. 99(7): 1038. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1065-PDN>