



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

“ESPECIES DE *BACILLUS* COMO ALTERNATIVA DE CONTROL BIOLÓGICO CONTRA EL AGENTE CAUSAL DE LA GOMOSIS EN LIMA PERSA (*Citrus x latifolia* Tanaka) DE LA REGIÓN CITRÍCOLA JOACHÍN, VER.”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

TERESA DE JESÚS LIRA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. BEATRIZ GUTIÉRREZ RIVERA

TIERRA BLANCA, VER., A 13 DE NOVIEMBRE DEL 2023

COMITÉ TUTORIAL



DRA. BEATRIZ GUTIÉRREZ RIVERA (DIRECTORA)
PROFESOR INVESTIGADOR INSTITUTO
TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA

<https://orcid.org/0000-0002-9446-9218>

beatriz.gutierrez@itstb.edu.mx



DRA. ANA LINE VÁZQUEZ LARIOS (ASESORA)
PROFESOR INVESTIGADOR INSTITUTO
TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA

<https://orcid.org/0000-0001-5211-7962>

ana.vazquez@itstb.edu.mx



DRA. PAULA NATALIA ROBLEDO NARVÁEZ
(ASESORA)

PROFESOR INVESTIGADOR INSTITUTO
TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA

<https://orcid.org/0000-0003-4468-4726>

p.robledo@itstb.edu.mx



DR. FRANCISCO HERNANDEZ ROSAS (ASESOR)

PROFESOR INVESTIGADOR COLEGIO DE
POSTGRADUADOS CAMPUS CÓRDOBA

<https://orcid.org/0000-0003-3718-3245>

fhrosas@colpos.mx



M.C ANGEL CÁRDENAS CÁGAL (ASESOR)

COLEGIO DE POSTGRADUADOS CAMPUS
CÓRDOBA

<https://orcid.org/0000-0002-6173-6877>

cagal.angel@colpos.mx



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA

ORDEN DE IMPRESIÓN

FECHA: 06 DE NOVIEMBRE DE 2023
DEPENDENCIA: SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
OFICIO NÚM: OFICIO No. ITSTB/SPeI/036
ASUNTO: ORDEN DE IMPRESIÓN


C. TERESA HERNANDEZ LIRA
CANDIDATA A MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE

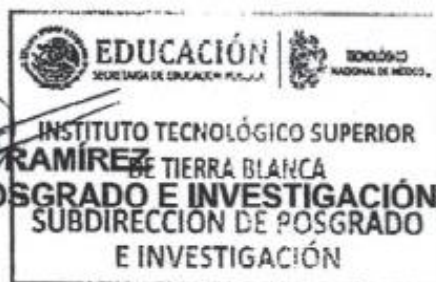
De acuerdo con los requisitos para la obtención del grado de los lineamientos para la operación de los estudios de posgrado de los Institutos Tecnológicos, dependientes del Tecnológico Nacional de México y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo respecto a su trabajo profesional titulado:

"Especies de Bacillus como alternativa de control biológico contra el agente causal de la gomosis en lima persa (*Citrus x latifolia tanaka*) de la región citrícola Joachín, Ver."

Comunico a Usted, que tienen la autorización, para que proceda a la impresión de su trabajo de tesis.

ATENTAMENTE


DRA. KARINA BUSTOS RAMÍREZ
SUBDIRECTORA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



c.c.p. Archivo



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA

DICTAMEN DE LA COMISION DICTAMINADORA

Tierra Blanca, Ver., a 31/octubre/2023

DRA. KARINA BUSTOS RAMIREZ
SUBDIRECTOR DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

Los que suscriben, miembros de la comisión revisora, una vez concluido y analizado los contenidos de la Tesis de Maestría que presenta el C.:

Teresa de Jesús Lira Hernández

Con el título de:

“Especies de Bacillus como alternativa de control biológico contra el agente causal de la gomosis en lima persa (Citrus x latifolia Tanaka) de la región citrícola Joachín, Ver.”

Determinan que es aceptada, como requisito parcial para la obtención del grado de Maestría en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología.

ATENTAMENTE

PRESIDENTE	Dra. Beatriz Gutiérrez Rivera
SECRETARIO	Dra. Ana Line Vázquez Larios
VOCAL	Dra. Paula Natalia Robledo Narvéez
VOCAL SUPLENTE	Dra. Elizabeth del C. Varela Santos



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE TIERRA BLANCA

FORMATO DE ASIGNACIÓN DE FECHA DE ACTO DE RECEPCIÓN PROFESIONAL

FECHA: 08 DE NOVIEMBRE DE 2023
DEPENDENCIA: SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
OFICIO NÚM: OFICIO No. ITSTB/SPeI/008
ASUNTO: ACTO DE RECEPCIÓN PROFESIONAL

C. TERESA HERNANDEZ LIRA
CANDIDATA A TÍTULO DE MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
PRESENTE

Por medio de la presente le informo, la fecha, hora y lugar en que se desarrollara su acto examen de grado:

Fecha: martes 14 de noviembre de 2023

Hora: 11:00 a.m

Lugar: Sala de Titulación del Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca

Cuyo jurado queda de la siguiente forma:

Presidenta: Dra. Beatriz Gutierrez Rivera
Secretaria: Dra. Ana Line Vazquez Larios
Vocal: Dra. Paula Natalia Robledo Narvaez
Vocal Suplente: Dra. Elizabeth del Carmen Varela Santos

Sin más por el momento quedo a tus apreciables órdenes.

ATENTAMENTE

DRA. KARINA BUSTOS RAMIREZ
SUBDIRECTORA DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

c.c.p. Departamento de Servicios e Investigaciones para su elaboración correspondiente.
c.c.p. Archivo




CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la ciudad de Tierra Blanca Veracruz el día 31 del mes de octubre del año 2023 (la) que suscribe Teresa de Jesús Lira Hernández del programa de maestría en Ciencia de los Alimentos y Biotecnología del TecNM/ Superior de Tierra Blanca, manifiesta que es la autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Beatriz Gutiérrez Rivera y cede los derechos del trabajo titulado "Especies de Bacillus como alternativa de control biológico contra el agente causal de la gomosis en lima persa (*Citrus x latifolia* Tanaka) de la región citrícola Joachín, Ver". Al Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, graficas o datos sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo.

Tierra Blanca, Veracruz, a 31 de octubre del 2023


Teresa de Jesús Lira Hernández

Nombre y firma

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS

C. Teresa de Jesús Lira Hernández estudiante en el programa de Maestría en Ciencia de los Alimentos y Biotecnología del Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca, Veracruz, como autora de la tesis presentada y registrada para la obtención del título de Maestro en Ciencias con el título: "Especies de *Bacillus* como alternativa de control biológico contra el agente causal de la gomosis en lima persa (*Citrus x latifolia* Tanaka) de la región citrícola Joachín, Ver". Dirigida por: Dra. Beatriz Gutiérrez Rivera.

Declaro que:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con lo establecido por el artículo 168 de la ley federal de derechos de autor.

Del mismo modo, asumo frente al TecNM/Superior de Tierra Blanca cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis.

Tierra Blanca, Veracruz, a 31 de octubre del 2023



Teresa de Jesús Lira Hernández

Nombre y firma

Dedicatoria

A mi pequeña Sofía y a mis padres
por su incondicional apoyo durante esta etapa de mi vida.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 805106 otorgada para mis estudios en el programa de Maestría en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología del Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca.

A los miembros de mi comité tutorial la Dra. Ana Line Vázquez Larios, Dra. Paula Natalia Robledo Nárvaez, Dr. Francisco Hernández Rosas y el M.C. Ángel Cárdenas Cágal, por todo el apoyo brindado, por los consejos y las sugerencias realizadas durante el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Beatriz Gutiérrez Rivera por darme la confianza y apoyo para desarrollar esta investigación, así como brindarme todas las facilidades para trabajar tanto en laboratorio como en campo, compartiendo experiencias, conocimientos y su tiempo para poder concluir de la mejor manera esta meta, muchas gracias doctora.

A mis compañeras de generación Monse y Xanat, por ser cómplices en este viaje de más de dos años.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Ivonne, Rigoberto y Luis, por su apoyo incondicional, por los consejos, por todas las experiencias, momentos y tan bonitas vivencias.

Agradezco a mi familia por brindarme todo el apoyo para logra alcanzar cada una de mis metas y a mi Dios, por siempre guiar mis pasos y darme la fortaleza para continuar mi camino.

Índice general

Resumen	16
Abstract	18
1. Introducción	20
2. Marco teórico	22
2.1. Lima persa	22
2.2. Clasificación taxonómica	22
2.3. Características del cultivo	23
2.4. Producción nacional y estatal de lima persa	24
2.5. Producción Municipal	25
2.6. Factores que afectan la producción de lima persa	26
2.6.1. Nutrición	27
2.6.2. Portainjertos	27
2.6.3. Suministro de agua	27
2.6.4. Poda	27
2.6.5. Plagas y enfermedades	27
2.7. Enfermedades de lima persa	28
2.8. Muerte descendente	28
2.9. Lasiodiplodia spp.	29
2.9.1. Ciclo de vida de <i>Lasiodiplodia</i> spp.	30
2.10. Control biológico	31
2.11. Mecanismos de acción de los ACB contra los fitopatógenos	32
2.12. Bacillus como agentes de control biológico	34
2.13. Principales mecanismos de control biológico del género Bacillus	34
2.13.1. Producción de sustancias antimicrobianas	35
2.13.2. Competencia por nutrientes y espacio	36
2.13.3. Respuesta sistémica inducida	36
3. Justificación	38
4. Hipótesis	39
5. Objetivos	39

5.1.	Objetivo general	39
5.2.	Objetivos específicos	39
6.	Metodología	40
6.1.	Diagnóstico de las principales enfermedades del cultivo de lima persa... 40	
6.1.1.	Localización de la región de estudio	40
6.1.2.	Aplicación de encuestas a productores	42
6.2.	Aislamiento e identificación del agente causal de la gomosis	44
6.2.1.	Selección de huertas	44
6.2.2.	Aislamiento de fitopatógenos	44
6.2.3.	Identificación morfológica	45
6.2.4.	Identificación molecular	45
6.3.	Efecto antagónico in vitro de Bacillus spp. sobre los aislados	46
6.3.1.	Cepas de estudio	46
6.3.2.	Pruebas de antagonismo.....	46
6.4.	Patogenicidad de los microorganismos aislados, en plantas de lima persa sanas (postulados de Koch).....	48
6.4.1.	Patogenicidad y virulencia en plantas	48
7.	Resultados y discusión	49
7.1.	Diagnóstico de las principales enfermedades del cultivo de lima persa en la zona de Joachín, Ver	49
7.1.2.	Caracterización del área de estudio.....	49
7.1.3.	El origen y selección del material vegetal	53
7.1.4.	La poda.....	55
7.1.5.	El riego.....	56
7.1.6.	Fertilización.....	57
7.1.7.	Las plagas	58
7.1.8.	Las principales enfermedades	59
7.2.	Aislamiento e identificación del agente causal de la gomosis	62
7.2.1.	Recolección de muestras	62
7.2.2.	Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos	63
7.2.3.	Identificación molecular	66

7.3.	Efecto antagónico in vitro de <i>Bacillus</i> spp. sobre los aislados	68
7.3.1.	Actividad antagónica in vitro de <i>Bacillus</i> spp. vs aislados fúngicos	68
7.4.	Evaluación de patogenicidad de los aislados.....	71
7.4.1.	Prueba de patogenicidad.....	71
7.4.2.	Virulencia de cepas aisladas	73
8.	Conclusiones	76
9.	Bibliografía.....	78
10.	Anexos	92
10.1.	Anexo 1. Cuestionario.....	92
10.2.	Anexo 2. Escala de severidad.....	96

Índice de figuras

Figura 1. Origen de los principales subgrupos varietales de lima y limón..	22
Figura 2. Características del fruto de lima persa..	24
Figura 3. Ciclo de infección de Lasiodiplodia en plantas leñosas.....	31
Figura 4. Los principales mecanismos de acción de los antagonistas de Bacillus contra las enfermedades de los cítricos..	37
Figura 5. Ubicación geográfica del estado de Veracruz y el municipio de Tierra Blanca, México.	41
Figura 6. Localización y delimitación del área de estudio de la zona de producción de lima persa de Joachín, Veracruz.	42
Figura 7. Sexo de los productores de lima persa	50
Figura 8. Edad de los productores de lima persa	50
Figura 9. Antigüedad en el manejo de lima persa.	51
Figura 10. Superficie de lima persa por productor.....	53
Figura 11. Edad de los huertos de lima persa.	54
Figura 12. Sistemas de riego.....	57
Figura 13. Síntomas de “gomosis” en lima persa.....	63
Figura 14. Características morfológicas de Lasiodiplodia spp.....	65
Figura 15. Confrontación in vitro de Bacillus spp. contra patógenos de lima persa.	68
Figura 16. Efecto inhibitorio de tres cepas de <i>Bacillus</i> spp. sobre el crecimiento de cuatro aislados de patógenos de lima persa a los 9 días incubación...	69
Figura 17. Patrones de inhibición en confrontaciones.....	71
Figura 18. Patogenicidad en plantas de lima persa (<i>Citrus x Latifolia</i> Tan.).....	72
Figura 19. Virulencia de cuatro hongos aislados en lima persa (<i>Citrus x latifolia</i> Tan.) evaluadas como la longitud media de la lesión necrótica interna (cm)..	74

Índice de tablas

Tabla 1. Principales productos agroalimentarios exportados en México, 2022 (SIAP, 2022).	25
Tabla 2. Principales municipios productores de lima persa del estado de Veracruz (SIAP, 2023).	26
Tabla 3. Tipos de antagonismo de los agentes de control biológico (Pal and McSpadden, 2006).	33
Tabla 4. Número de productores entrevistados en la región citrícola Joachín	43
Tabla 5. Localización de las huertas de lima persa muestreadas en la región de estudio.	44
Tabla 6. Patrones empleados por productores de la región citrícola Joachín	55
Tabla 7. Plagas presentes en la zona citrícola Joachín	59
Tabla 8. Enfermedades predominantes en la región citrícola Joachín.	60
Tabla 9. Identidad máxima encontrada en las secuencias de las cepas Las1 (ZIM3), Las (ZIIM1), Las3 (ZIIM3) y colle (ZIIM3), en el GenBank	67
Tabla 10. Escala de severidad por tratamientos	73

Resumen

El limón persa o lima persa es uno de los cítricos de mayor importancia económica del país, debido a que es uno de los principales productos agrícolas de exportación. Sin embargo, este cultivo se ve afectado por diversos factores que disminuyen la producción, entre ellos destaca las enfermedades de origen fúngico. Para realizar un control efectivo de las enfermedades, es importante identificar el agente causal de la enfermedad y buscar nuevas alternativas más efectivas y amigables con el medio ambiente, como lo es el control biológico. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el antagonismo *in vitro* de *Bacillus* autóctonos sobre el agente causal de la enfermedad de mayor impacto en lima persa de la región de Joachín, Veracruz. Para ello, se caracterizó aspectos de la producción de lima persa en un espacio de 7 km de radio a partir de la ubicación de la localidad de Joachín, mediante encuestas a productores y visita en campo. Se obtuvo, entre otros, que la enfermedad de mayor impacto negativo en la región citrícola Joachín fue “gomosis”. Para la identificación del agente causal, se tomó muestras de plantas con síntomas de la enfermedad y mediante pruebas morfológicas y moleculares se determinó que tres cepas correspondían a *Lasiodiplodia* sp. y una cepa a *Colletotrichum* sp. Estas cuatro cepas se evaluaron por antagonismo *in vitro* con especies de *Bacillus* identificadas como *Bacillus subtilis* (Bs1 y Bs2) y una cepa de *Bacillus velezensis* (Bv). Los resultados mostraron que la cepa Bs2 presentó los valores más altos de inhibición de 66.69 y 61.78% para las cepas Las1 y Las3 (*Lasiodiplodia* sp.), mientras que la cepa Bs1 fue más eficiente contra *Colle* (*Colletotrichum* sp.) con un 46.6% y Las2 (*Lasiodiplodia* sp.) en un 49.7%. Así también, se observó baja actividad antagónica de Bv (*Bacillus velezensis*) sobre los cuatro aislados fitopatógenos. Finalmente, para corroborar la patogenicidad de los fitopatógenos aislados de tallos y ramas, se realizó la inoculación de discos con crecimiento micelial de los hongos en el tallo de plantas de lima persa sanas. Posterior a tres meses, se observaron síntomas característicos de “gomosis” en plantas inoculadas con las cepas Las1, Las2 y Las3, identificadas como *Lasiodiplodia* sp. y a su vez, mostraron el mismo grado de virulencia en plantas, al no presentar diferencias

significativas en la longitud de las lesiones necróticas del tejido vascular de las plantas inoculadas. Y a partir de las cuales, los microorganismos fueron re-aislados y se corroboró su identificación, cumpliendo así con los postulados de Koch. Por lo que se puede concluir que *Lasiodiplodia* sp. es el agente causal de la “gomosis” en lima persa de la zona citrícola Joachín y que una alternativa de control de la enfermedad puede ser el uso de las cepas de *Bacillus subtilis* (Bs1 y Bs2).

Abstract

The Persian lemon or Persian lime is one of the most economically important citrus fruits in the country, because it is an export product. This crop is affected by various factors that decrease the production, including fungal diseases. For effective disease control, it is important to identify the causal agent of the disease and seek new, more effective and environmentally friendly alternatives, such as biological control. Therefore, the objective of this study was to evaluate the in vitro antagonism of autochthonous *Bacillus* on the causal agent of the disease with the greatest impact on Persian lime in the region of Joachín, Veracruz. To do this, aspects of Persian lime production were characterized in a space of 7 km radius from the location of the town of Joachín, through surveys of producers and a field visit. It was found, among others, that the disease with the greatest negative impact in the Joachín citrus region was “gummosis.” To identify the causal agent, samples were taken from plants with symptoms of the disease and through morphological and molecular tests it was determined that three strains corresponded to *Lasiodiplodia* sp. and a strain to *Colletotrichum* sp. These four strains were evaluated for in vitro antagonism with *Bacillus* species identified as *Bacillus subtilis* (Bs1 and Bs2) and a strain of *Bacillus velezensis* (Bv). The results showed that the Bs2 strain presented the highest inhibition values of 66.69 and 61.78% for the Las1 and Las3 strains (*Lasiodiplodia* sp.), while the Bs1 strain was more efficient against Colle (*Colletotrichum* sp.) with 46.6%. and Las2 (*Lasiodiplodia* sp.) by 49.7%. Likewise, low antagonistic activity of Bv (*Bacillus velezensis*) was observed on the four phytopathogenic isolates. Finally, to corroborate the pathogenicity of the phytopathogens isolated from stems and branches, the inoculation of discs with mycelial growth of the fungi was carried out on the stem of healthy Persian lime plants. After three months, characteristic symptoms of “gummosis” were observed in plants inoculated with the strains Las1, Las2 and Las3, identified as *Lasiodiplodia* sp. and in turn, they showed the same degree of virulence in plants, not presenting significant differences in the length of the necrotic lesions of the vascular tissue of the inoculated plants. And from which, the microorganisms were re-isolated and their identification was corroborated, thus

complying with Koch's postulates. Therefore, it can be concluded that *Lasiodiplodia* sp. is the causal agent of “gummosis” in Persian lime from the Joaquín citrus area and that an alternative to control the disease may be the use of *Bacillus subtilis* strains (Bs1 and Bs2).

1. Introducción

El estado de Veracruz es el principal productor de lima persa (*Citrus x latifolia*. Tan) en México, contabilizándose en el 2022 una superficie de 52,990 ha y una producción de 858,602 t, lo que representó el 53.9% de la producción nacional y un valor de la producción de 6,082,435 millones de pesos. Dentro de los 12 municipios productores de lima persa del estado de Veracruz, se encuentra el municipio de Tierra Blanca con una superficie sembrada de 1,420 ha y una producción de 17608 t. Sin embargo, el rendimiento de 12.44 t/ha reportado en este municipio, se encuentran por debajo de la media estatal de 16.43 t/ha. (SIAP, 2023). Dentro de los factores que influyen en la producción y calidad de lima persa se encuentra el tipo de patrón empleado, las condiciones ambientales, la nutrición, el suministro de agua y el manejo de plagas y enfermedades (Oke *et al.*, 2013).

Debido a que en el estado de Veracruz prevalecen condiciones cálido-húmedas, propicia el desarrollo de enfermedades principalmente de origen fúngico que provocan la disminución del rendimiento y pueden ocasionar la muerte del árbol (Curti-Díaz *et al.*, 2000).

Dentro de las especies de hongos que afectan a los cítricos, se ha reportado al género *Lasiodiplodia* como los agentes causales de muerte descendente y gomosis en un amplio rango de especies de cítricos, así también en otras especies de frutales tropicales perenes (Adesemoye *et al.* 2014; Al-Sadi *et al.*, 2013; Coutinho *et al.*,2017). *Lasiodiplodia* spp. se caracterizan por causar síntomas como muerte regresiva de las ramas, canchales en tallo, exudación goma, lesiones necróticas, pudrición del cuello, descomposición de semillas y frutos, coloración amarillenta del follaje, y finalmente la muerte de la planta (Coutinho *et al.*, 2017).

En México se ha reportado a *Lasiodiplodia* spp. como el agente causal de diversas enfermedades que afectan a cultivos de zarzamora (*Rubus subgenus Eubatus*), vid (*Vitis vinifera* L.), zapote mamey (*Pouteria sapota*), naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) y mango (*Mangifera indica* L.) (Contreras *et al.*, 2019; Úrbez *et al.*, 2008; Tovar *et al.*, 2012; Polanco *et al.*, 2019; Sandoval-Sánchez *et al.*,2013). Así

también, existen reportes que asocian a *Lasiodiplodia* spp. a muerte descendente o gomosis en lima persa (Valle-de la Paz *et al.*, 2019; Bautista *et al.*, 2019).

Para el control de enfermedades se han empleado principalmente plaguicidas sintéticos, sin embargo, los residuos de estos productos se movilizan contaminando el ambiente circundante afectando a otros organismos y, provocando con ello un severo impacto al medioambiente que genera contaminación de suelos y la pérdida de biodiversidad (Gálves *et al.*, 2018). Una alternativa para limitar la aplicación de estos productos y disminuir la presencia del patógeno en el cultivo de forma ambientalmente amigable, es el uso de agentes de control biológico (ACB) (Vinchira y Moreno, 2019). En el caso de las bacterias, especies del género *Bacillus* han sido ampliamente estudiadas debido a la abundancia, diversidad, ubicuidad en diversos agroecosistemas y capacidad para esporular, lo que facilita su uso como agente de control, además de destacar por sus características metabólicas de producir lipopéptidos, enzimas líticas, δ -endotoxinas, sideróforos e inducir la respuesta sistémica de la planta (Valenzuela *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

En el año 2022 la zona citrícola Joachín, perteneciente a la Cuenca del Papaloapan, citricultores reportaron en las huertas de lima persa un aumento en la incidencia en el decaimiento de árboles, muerte descendente en ramas, formación de canchales y exudado de goma, lo que finalmente provocaba la muerte del árbol en huertas. Siendo esta enfermedad asociada por los mismos productores como “gomosis”. Sin embargo, en la región no existen reportes de la identificación de microorganismos asociados a esta enfermedad, por lo que el diagnóstico de enfermedades se ha dado de forma empírica por parte de los productores y técnicos. Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar el agente causal de la enfermedad denominada “gomosis”, corroborar la patogenicidad de los aislados en plantas de lima persa, así como evaluar el efecto antagónico *in vitro* de tres cepas de *Bacillus* autóctonos sobre *Lasiodiplodia* sp.

2. Marco teórico

2.1. Lima persa

El limón persa (*Citrus x latifolia* Tanaka ex Q.Jiménez), también es conocido como limón sin semilla, lima Persa, lima Tahití o lima Bearss. Esta es una especie de lima triploide, lo que le confiere la particularidad de esterilidad o fertilidad muy reducida y falta de semillas en los frutos. Su origen taxonómico descende de la mezcla de cuatro taxas del género citrus (*C. micrantha*, *C. medica*, *C. reticulata* y *C. maxima*) (figura1). (Curk *et al.*, 2016; Ollitrault *et al.*, 2020).

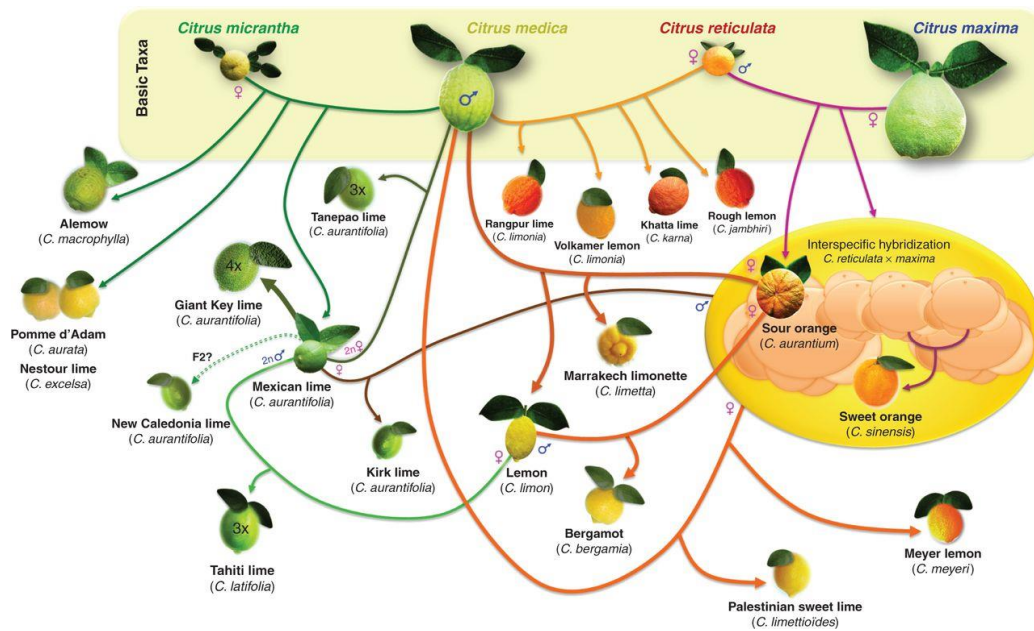


Figura 1. Origen de los principales subgrupos varietales de lima y limón. Adaptada de (Curk *et al.*, 2016).

Esta a su vez, se clasifica en la familia Rutaceae, subfamilia Aurantioideae, tribu Citraeae, subtribu Citrinae, género Citrus y la especie *Citrus x latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez. (Martínez *et al.*, 2020).

2.2. Clasificación taxonómica

La información taxonómica de lima persa se describe a partir de información del banco de datos de plantas del Jardín Botánico de Missouri. (Missouri Botanical Garden, 2023).

Reino: Plantae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Rosanae

Orden: Sapindales

Familia: Rutaceae

Género: Citrus

Especie: *Citrus* x *latifolia* Tanaka ex

Q. Jiménez

2.3. Características del cultivo

Los árboles de lima persa se caracterizan por tener poca altura y generalmente depende del portainjertos seleccionado. Tienen un hábito de crecimiento desordenado de consistencia leñosa, con pocas espinas. Su copa es redonda, densa y simétrica, y pueden crecer hasta una altura de 6 a 7 metros. Sin embargo, para facilitar las labores culturales, los árboles se mantienen de tamaño mediano o pequeño, mediante la selección de patrones o el uso de podas (Martínez *et al.*, 2020).

Los frutos son esféricos-oblongos, color verde, cascara delgada que puede presentar rugosidad, Los frutos tienen entre 10 y 12 lóculos de color amarillo verdoso, muy ácidos y aromáticos. Su peso promedio oscila entre 70 y 90 g, pero pueden llegar a obtenerse frutos de más de 100 g (Figura 2). Los frutos se caracterizan por la ausencia de semillas debido a la partenocarpia y el carácter triploide de la especie (Martínez *et al.*, 2020). Tiene hojas elípticas ovoides de color verde ligeramente dentadas, en cuanto a las flores estas son pequeñas de color blanco que brotan en racimos (Jackson, 1991).

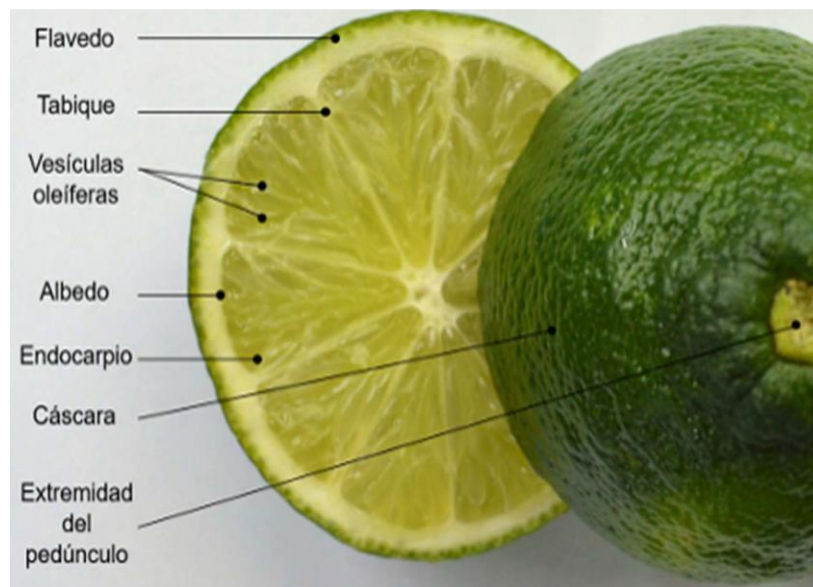


Figura 2. Características del fruto de lima persa. Adaptado de Murcia *et al.*,2020.





























2.4. Producción nacional y estatal de lima persa

México ocupa el segundo como productor de limones a nivel mundial, además de ser uno de los principales productos agroalimentarios exportados de nuestro país, siendo el principal mercado de exportación Estados Unidos, seguido de Países Bajos y Reino Unido (Tabla 1) (SIAP, 2022).

Para el caso específico de lima persa, en el año 2022 se reportó una producción nacional de 1,592,350.73 toneladas para este cítrico, lo que representó el 52.3% de la producción total de limón en el país (SIAP, 2023).

Dentro de los principales estados productores de lima persa destacan los estados de Oaxaca, Yucatán y Veracruz. Siendo este último, el mayor productor a nivel nacional de lima persa, quién en el 2022 aportó el 53.9% la producción a nivel nacional, teniendo una participación en superficie sembrada de lima persa de 52,990 ha, con una producción de 858,602.78 t y cuyo valor se reportó en \$6,082,435.75 de pesos (SIAP, 2023).

Tabla 1. Principales productos agroalimentarios exportados en México, 2022 (SIAP, 2022).

	Producto	Exportaciones de México (mdd)	Principales destinos de las exportaciones de México					
			1°		2°		3°	
			País	mdd	País	mdd	País	mdd
	Cerveza	5,675	Estados Unidos	4,824	Chile	115	Guatemala	80
	Berries	3,553	Estados Unidos	3,420	Canadá	29	Japón	15
	Aguacate	3,478	Estados Unidos	2,813	Canadá	207	Japón	172
	Tequila ^a	3,283	Estados Unidos	2,864	Reino Unido	38	Colombia	35
	Jitomate ^a	1,967	Estados Unidos	1,958	Canadá	7	Japón	3
	Carne de bovino	1,962	Estados Unidos	1,825	Japón	69	Canadá	61
	Picantes	1,144	Estados Unidos	1,084	Canadá	53	Reino Unido	1
	Carne de porcino	1,016	Japón	601	Estados Unidos	187	China	157
	Galletas dulces	952	Estados Unidos	885	Canadá	32	Guatemala	8
	Confitería	891	Estados Unidos	778	Guatemala	20	Colombia	17
	Azúcar	698	Estados Unidos	595	Marruecos	40	Canadá	16
	Chocolate	664	Estados Unidos	541	Canadá	47	Guatemala	12
	Limón	663	Estados Unidos	631	Países Bajos	14	Reino Unido	4
	Nuez	639	Estados Unidos	584	China	26	Países Bajos	8
	Ganado bovino	634	Estados Unidos	633	Belice	0.1	Guatemala	0.1
	Brócoli, col y coliflor	557	Estados Unidos	544	Canadá	12	Japón	0.9
	Pepino	468	Estados Unidos	451	Canadá	17	Guatemala	0.2
	Café verde	433	Estados Unidos	233	Bélgica	41	Italia	22
	Lechuga	403	Estados Unidos	401	Canadá	2	Belice	0.3
	Mango	399	Estados Unidos	329	Canadá	49	Japón	9
	Fórmula infantil	354	Estados Unidos	54	República Dominicana	37	Perú	29
	Espárrago	353	Estados Unidos	353	Japón	0.1	Belice	0.1
	Cereal tostado	340	Estados Unidos	256	Guatemala	19	El Salvador	14
	Jugo de naranja	337	Estados Unidos	196	Japón	69	Países Bajos	39
	Uva	332	Estados Unidos	323	Japón	4	Guatemala	1
	Frituras	309	Estados Unidos	275	Emiratos Árabes Unidos	8	Puerto Rico	5
	Cebolla	276	Estados Unidos	265	España	3	Guatemala	2
	Camarón	275	Estados Unidos	243	Japón	14	China	10

2.5. Producción Municipal

Dentro de los municipios productores de lima persa del estado de Veracruz se encuentra el municipio de Tierra Blanca quién ocupa el doceavo lugar en producción a nivel estatal (tabla 2) con una producción de 17608 t y acuerdo a los datos reportados por el SIAP, en los últimos 10 años, la superficie de siembra ha aumentado en un 61%. Sin embargo, el rendimiento de 12.44 t/ha reportado en este municipio en el 2022, se encuentran por debajo de la media estatal de 16.43 t/ha. (SIAP, 2023).

Tabla 2. Principales municipios productores de lima persa del estado de Veracruz (SIAP, 2023).

Rank	Municipio	Superficie			Producción (t)	Rendimiento (t/ha)	Valor Producción (miles de Pesos)
		Sembrada	Cosechada	Siniestrada			
1	Martínez de la Torre	15,579.00	15,579.00	0.00	273,466.00	17.55	2,007,695.80
2	Aztlán	5,768.00	5,768.00	0.00	103,824.00	18.00	674,856.00
3	San Rafael	4,556.00	4,556.00	0.00	81,041.40	17.79	525,960.93
4	Tlapacoyan	3,757.00	3,757.00	0.00	74,346.00	19.79	481,821.00
5	Benito Juárez	3,900.00	3,900.00	0.00	46,800.00	12.00	257,400.00
6	Papantla	1,878.00	1,878.00	0.00	28,170.00	15.00	182,872.32
7	Cotaxtla	1,631.00	1,621.00	0.00	27,446.00	16.93	295,401.87
8	Carillo Puerto	1,345.35	1,334.80	0.00	23,847.51	17.87	117,488.39
9	Cuitláhuac	1,233.64	1,215.00	0.00	21,576.14	17.76	122,968.70
10	Misantla	1,124.00	1,122.00	0.00	20,949.80	18.67	135,126.21
11	Nautla	1,279.00	1,279.00	0.00	19,185.00	15.00	128,539.50
12	Tierra Blanca	1,420.00	1,415.00	0.00	17,608.00	12.44	122,245.69
13	Paso del Macho	758.05	601.50	0.00	10,610.83	17.64	54,133.88

2.6. Factores que afectan la producción de lima persa.

En general, los factores que afectan la producción y a su vez la calidad del fruto de limón persa son diversos, entre ellos se puede mencionar el tipo de patrón empleado, las condiciones ambientales, la nutrición, la poda, el suministro de agua y el manejo de plagas y enfermedades (Oke *et al.*, 2013).

2.6.1. Nutrición

La nutrición de la planta juega un papel muy importante en el desarrollo y producción de frutos. Los desórdenes de nutrientes minerales causan un desarrollo anormal de las plantas, cuando son severos resultan en el decaimiento de las plantas y, una pérdida significativa de rendimiento (Mattos *et al.*, 2020).

2.6.2. Portainjertos

En el caso de los portainjertos empleados en citricultura, se han reportado por diversos autores las características de las diferentes variedades de portainjetos y su efecto en la calidad del fruto, el tamaño de la planta y en el rendimiento de la misma (Cantuarias-Avilés *et al.*, 2010; Berdeja-Arbeu *et al.*, 2016; Curti-Díaz *et al.*, 2012; Hassanzadeh *et al.*, 2019).

2.6.3. Suministro de agua

Otro de los factores que influyen en la producción de cítricos es el suministro de agua, ya que la limitación de agua a la planta afecta el crecimiento y desarrollo de los cítricos y perjudica gravemente los procesos reproductivos, lo que conduce a reducciones en el rendimiento (Vicent *et al.*, 2020). Al someter a la planta a estrés hídrico en las diversas etapas de desarrollo, se observa un decremento en el rendimiento de fruta por árbol debido a la disminución del cuajado, desarrollo anormal y abscisión de la fruta (Romero *et al.*, 2006).

2.6.4. Poda

Las prácticas de poda en la citricultura son importantes en la salud de las plantas para alcanzar un equilibrio aceptable entre el crecimiento vegetativo y reproductivo en los cítricos (Intrigliolo y Rocuzzo, 2011). Ya que un árbol bien formado aprovecha mejor la luz del sol y tiene mejor aireación en el centro del mismo. Estas características hacen al árbol más productivo y con fruta de mejor calidad (Curti- Díaz *et al.*, 2000).

2.6.5. Plagas y enfermedades

Hoy en día, el control de plagas y enfermedades son pasos cruciales para reducir las pérdidas de los cultivos, y en la producción de limón no es la excepción. Por las condiciones cálido-húmedas que prevalecen en Veracruz, se propicia el

desarrollo de enfermedades principalmente de origen fúngico que provocan la disminución del rendimiento, reduce la calidad de la fruta y puede ocasionar la muerte del árbol (Curti-Díaz *et al.*, 2000). Por otra parte, las plagas de los cítricos pueden causar daños directos, al alimentarse de la planta y daños indirectos cuando transmiten patógenos que causan enfermedades (Chien y Chu, 1996), demeritando la producción de frutos y disminuyendo la productividad.

2.7. Enfermedades de lima persa

El cultivo de lima persa (*Citrus x latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez) se ve afectado por numerosas enfermedades bióticas de origen fungoso, bacteriano, y viral, así como por enfermedades abióticas, causadas por desórdenes fisiológicos (Murcia *et al.*, 2020). La frecuencia e intensidad en que se presenta los problemas fitopatológicos en las diversas zonas citrícolas en México, son determinadas en gran medida por las condiciones ambientales prevalecientes en cada región en particular, la especie de cítricos presente, así como por el manejo y atención que los productores dan a sus plantaciones (Rocha y Padrón, 2009).

La producción de los cítricos en las zonas productoras de México, se ven afectadas por alrededor de 50 patógenos que provocan síntomas tales como gomosis, antracnosis, agrietamiento de la corteza, caída de frutos, mancha grasienta, roña, muerte de ramas, entre otros (Orozco *et al.*, 2013).

Dentro de los agentes causales de estas enfermedades se han reportado a gomosis (*Phytophthora* spp.), Mancha gracienta (*Mycosphaerella citri*), muerte descendente (*Lasiodiplodia theobromae*), Huanglongbing (*Candidatus Liberibacter* spp.) y virus de la tristeza de los cítricos (VTC) (Sáenz *et al.*, 2019). Sin embargo, enfermedades como antracnosis (*Colletotrichum* spp.), fumagina (*Capnodium* sp.) y Exocortis (CEVd) son otras de las fitopatologías que afectan a los cítricos, entre ellos, a lima persa. (Rocha y padrón, 2009; Murcia *et al.*, 2020).

2.8. Muerte descendente

Dentro de las enfermedades de origen fúngico que afectan a los cítricos, se encuentra la provocada por *Lasiodiplodia* spp., conocida como muerte

descendente, podredumbre de cuello o muerte regresiva (Sáenz *et al.*, 2019; Polanco *et al.*, 2019).

Esta enfermedad se caracteriza por causar síntomas en cítricos como la exudación de goma del árbol, muerte descendente de ramas, defoliación, necrosis de floema y xilema, frutos podridos con micelio negro, pudrición y canchales o cánceres en la corteza de tallo y ramas. (Flores *et al.*, 2021; Valle-de la Paz *et al.*, 2019). Y que a su vez, coincide con la sintomatología de tizón apical, muerte descendente, cancro en tallos, gomosis y pudrición de fruta reportados por Abdollahzadeh *et al.*,(2010). Simultáneamente, *Lasiodiplodia* spp. se han aislado de diversas especies de cítricos, como lo es en limón 'Eureka', 'Valencia', 'Washington Navel', 'Fuku-moto', pomelo, 'Satsuma', Limón 'Meyer', lima persa (*Citrus x latifolia* tan.), limón mexicano (*Citrus aurantifolia*), limón italiano (*Citrus limon* Burm), naranja valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck), toronja doble rojo (*Citrus paradisi* Macfad) y mandarina (*Citrus reticulata* Blanco) (Adesemoye *et al.*,2014; Varela *et al.*,2013; Valle-de la Paz *et al.*, 2019; Bautista *et al.*, 2019).

Esta enfermedad es incidente en diversos cultivos tropicales afectando tanto en pre y postcosecha, siendo su actividad celulítica la que permite la penetración y colonización a la planta, ya que utiliza el almidón y otros polisacáridos presentes en el sustrato de la madera (Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

2.9. *Lasiodiplodia* spp.

El género *Lasiodiplodia* se ubica dentro del orden Botryosphaerales y en la familia Botryosphaeriaceae. Esta familia pertenece al orden de los Ascomycetes y comprende un rango de hongos morfológicamente diverso que pueden ser patógenos, endófitos o saprofitos, principalmente en huéspedes leñosos. Está ampliamente distribuido, ya que se encuentran en todas las zonas geográficas y climáticas del mundo, con excepción de las regiones polares (Phillips *et al.*,2013).

La principal característica que distingue al género *Lasiodiplodia* de otros géneros cercanos es la presencia de picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en conidios maduros (Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

En condiciones *in vitro*, inicialmente el patógeno presenta un desarrollo micelial de color blanco, tornándose posteriormente de color cenizo oscuro, hasta volverse finalmente negrozco (Moreira-Morrillo *et al.*, 2021).

El micelio se caracteriza por ser sumergido o superficial, ramificado, septado, color marrón oscuro. Presentan una ascomata eustromática, color marrón oscuro a negro, uniloculada con pared pseudoparenquimática gruesa, ostiolada, incrustado en el sustrato y parcialmente erumpente en la madurez. Pseudoparáfisis hialinas, septadas. Las ascosporas se caracterizan por ser irregularmente biseriadas, inicialmente hialinas, tornándose de color marrón oscuro, aseptadas (Phillips *et al.*, 2013).

El conidiomata es estromático, simple o agregado, inmerso en el hospedero y una vez maduro emerge de éste, de color café oscuro, un o multilocular, de pared gruesa o delgada de color marrón, con frecuencia setoso. Ostiolo central, único, papillado. Los conidios son en un principio hialinos y aseptado, convirtiéndose a café oscuro una vez maduros, con la presencia de 1 septo, presentan depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuestos longitudinalmente dando una apariencia estriada, son oblongas a elipsoidales, redondeadas en el ápice. Mientras que la Paráfisis son hialinas, cilíndrico, septadas (Pitt y Hocking, 2009; Phillips *et al.*, 2013).

2.9.1. Ciclo de vida de *Lasiodiplodia* spp.

Lasiodiplodia sobrevive en el suelo y en restos culturales, principalmente en forma de picnidios y/o clamidósporas que actúan como estructuras de resistencia en restos de tejidos infectados y/o en el suelo (figura 3) (Moreira-Morrillo *et al.*, 2021). Mientras que las esporas contenidas en los picnidios son liberadas al medio en condiciones óptimas siendo diseminadas por gotas de lluvia y el viento, principalmente en temporada de lluvias cuando hay mayor desarrollo de esporas. (Vásquez-López *et al.*, 2009). La principal vía de entrada de *Lasiodiplodia* a los hospederos es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, causas naturales o insectos (Ploetz, 2003). Cuando el hongo invade a la planta, este avanza por delante de los síntomas visibles (Shahbaz *et al.*, 2009), posteriormente

se pueden observar lesiones en frutos, brotes y ramillas jóvenes del árbol (Moreira-Morrillo *et al.*, 2021).

La muerte descendente de los frutales puede resultar de la interacción de *Lasiodiplodia* spp. con el estrés hídrico, presencia de heridas en el árbol, alcalinidad del suelo (pH 7.6-8.0), deficiencia nutricional, suelos arcillosos, compactos y escasa materia orgánica (Vásquez-López *et al.*, 2009). Así también, una elevada humedad, altas temperaturas y las lesiones mecánicas de la planta promueven el desarrollo de la enfermedad (Li *et al.*, 2014).

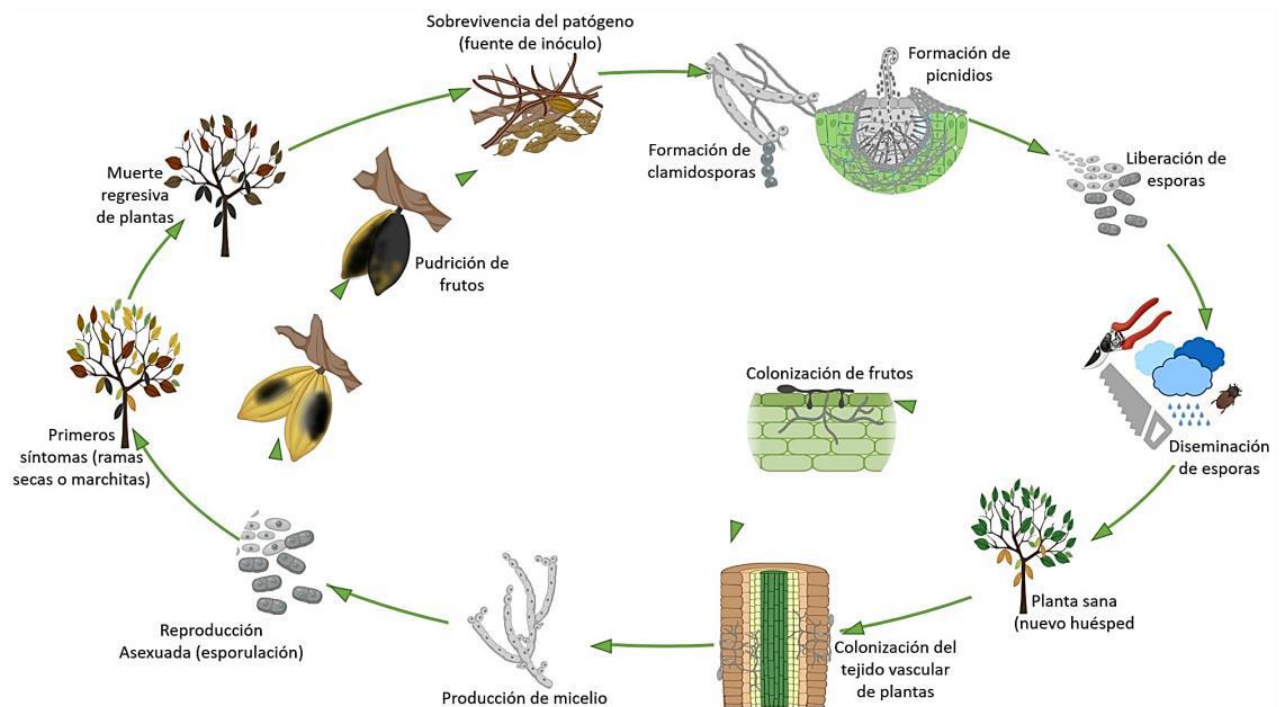


Figura 3. Ciclo de infección de *Lasiodiplodia* en plantas leñosas. Adaptado de Moreira-Morrillo *et al.*, 2021.

2.10. Control biológico

El término “control biológico” o su sinónimo abreviado “biocontrol” se puede definir como el uso de organismos vivos introducidos o residentes, distintos de las plantas hospedantes resistentes a enfermedades, para suprimir las actividades y poblaciones de uno o más patógenos vegetales (Pal y McSpadden, 2006). El biocontrol de enfermedades implica el uso de un organismo u organismos para

inhibir el patógeno y reducir la enfermedad (Chaur,1998). Existen diferentes definiciones de control biológico; sin embargo, la idea básica implica una estrategia para reducir la incidencia o gravedad de enfermedades mediante la manipulación directa o indirecta de microorganismos (Shurtleff y Averre, 1997).

Por otro lado, el organismo vivo o bien el extracto o compuesto derivado de este, que se emplea para el control de plagas y enfermedades que afectan los cultivos agrícolas, se denomina agente de control biológico (ACB). (Chulze, 2023).

Dentro de las características que deben considerarse para la selección y elección de los potenciales agentes de control biológico (ACB) está la tolerancia/resiliencia en condiciones de cambio climático. Esto incluye un aumento de la temperatura (2-5 °C), una elevada concentración de CO₂ (400 ppm real vs. 1.000 ppm) y flujos de condiciones extremas, como inundaciones o sequías (Chulze, 2023). Otras de las particularidades a considerarse es el crecimiento rápido, alta capacidad de reproducción y supervivencia, diferentes niveles de dormancia, estar libres de antagonistas naturales, alta habilidad competitiva y adaptabilidad a la planta tratada (Viera-Arroyo *et al.*,2020), ya que es necesario que el biocontrolador sea capaz de permanecer viable y crecer en el área de la planta susceptible a ser afectada por el fitopatógeno bien sea la rizósfera, la filósfera o la endosfera (Vinchira y Moreno, 2019).

Existen diferentes tipos de microorganismos, como virus, hongos y bacterias que han sido empleados clásicamente para el control biológico de enfermedades, entre los más estudiados y utilizados en productos se encuentran las bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, así como hongos del género *Trichoderma* (Vinchira y Moreno, 2019; Viera-Arroyo *et al.*,2020).

2.11. Mecanismos de acción de los ACB contra los fitopatógenos

El control biológico puede resultar de muchos tipos diferentes de interacciones entre organismos. Los diferentes mecanismos de antagonismo ocurren a través de un espectro de direccionalidad relacionado con la cantidad de contacto entre especies y la especificidad de las interacciones (tabla 3). Por lo anterior, el antagonismo se clasifica en directo cuando resulta del contacto físico entre el

patógeno y el ACB o alguno de sus mecanismos expresados, mientras que el antagonismo indirecto se produce cuando el ACB estimula las vías de defensa de la planta huésped (Pal y McSpadden, 2006).

Tabla 3. Tipos de antagonismo de los agentes de control biológico (Pal y McSpadden, 2006).

Tipo	Mecanismo	Ejemplos
antagonismo directo	Hiperparasitismo/depredación	Micovirus líticos/algunos no líticos <i>Ampelomyces quisqualis</i> <i>Lysobacter enzymogenes</i> <i>Pasteuria penetrans</i> <i>Trichoderma virens</i>
	antibióticos	2,4-diacetilfloroglucinol Fenazinas Lipopéptidos cíclicos
Antagonismo mixto	enzimas líticas	Quitinasas Glucanasas Proteasas
	Productos de desecho no regulados	Amoníaco Dióxido de carbono Cianuro de hidrógeno
	Interferencia física/química	Obstrucción de los poros del suelo Consumo de señales de germinación Diafonía molecular confusa
Antagonismo indirecto	Competencia	Consumo de exudados/lixiviados Eliminación de sideróforos Ocupación de nicho físico
	Inducción de resistencia del huésped.	Contacto con paredes celulares de hongos Detección de patrones moleculares asociados a patógenos Inducción mediada por fitohormonas

2.12. *Bacillus* como agentes de control biológico

Las especies de *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae. Actualmente, el género incluye más de 336 especies, las cuales pueden clasificarse en distintos grupos: a) el grupo de *B. cereus*, asociado a patogenicidad; b) los bacilos ambientales que son caracterizados por su presencia en distintos hábitats; c) el grupo de *B. clausii-halodurans*; y d) el grupo que incluye a *Bacillus* sp. (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017).

Los miembros de este género se caracterizan por ser Gram positivos, de forma bacilar, catalasa positiva, aerobios estrictos o anaerobios facultativos y formadores de endosporas (Tejera-Hernández *et al.*, 2012). Además de encontrarse ampliamente distribuidas en diversos hábitats que incluyen ecosistemas de agua dulce, marinos y en suelo; siendo sus miembros considerados como ubicuos (Rojas *et al.*, 2017). Incluso en ambientes con condiciones extremas tales como polvo, sedimentos marinos y hasta lagos con elevadas concentraciones de cloruro de sodio, entre otros (Tejera- Hernández *et al.*, 2012).

Las bacterias del género *Bacillus* han sido considerados como algunos de los microorganismos de mayor importancia en la agricultura, ya que se ha demostrado su efectividad como promotores del desarrollo e inductores de resistencia a diferentes tipos de estrés en las plantas (González- León *et al.*, 2022). Estas han sido ampliamente estudiadas debido a la diversidad y abundancia en los diversos agro-sistemas (suelo, agua y planta), siendo significativamente mayor su población en comparación a otros géneros microbianos, y además de destacar por sus diversas capacidades metabólicas de producir sustancias antimicrobianas y antifúngicas (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017).

2.13. Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*

Dentro de los mecanismos de biocontrol reportados para *Bacillus* spp. se incluyen la producción de sustancias antimicrobianas o enzimas líticas, la competencia por nutrientes y espacio, el parasitismo, la interferencia de señales y la resistencia sistémica inducida (SAR) en las plantas (figura 4) (Chen *et al.*, 2020).

Una de las medidas de biocontrol más importantes de *Bacillus* spp. son la síntesis de sustancias antimicrobianas, seguido de competencia por nutrientes y espacios (Chen *et al.*, 2020).

2.13.1. Producción de sustancias antimicrobianas

Una de las medidas de biocontrol más importantes de *Bacillus* spp. son la síntesis de sustancias antimicrobianas. Estos pueden biosintetizar dos tipos de sustancias antimicrobianas: una es la bacteriocina, que se sintetiza ribosomalmente, y la otra es el lipopéptido, que se sintetiza no ribosomalmente (Chen *et al.*, 2020).

Los lipopéptidos (LPs), estructuralmente consisten en un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso β -hidroxi o β -amino. Estos incluyen a tres diferentes familias (iturinas, fengicinas y surfactinas), que se clasifican de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso (Villarreal-Delgado *et al.*, 2017). Los lipopéptidos tienen actividad antagonista contra una amplia gama de hongos, bacterias y levaduras e inducen resistencia sistémica en plantas huésped (Chen *et al.*, 2020). La actividad antimicrobiana de estos Lipopéptidos se produce en la interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, lo que provoca la formación de poros y un desbalance osmótico, provocando la muerte celular de los fitopatógenos (Aranda y Ortiz, 2005).

La producción de sideróforos, también, se considera un mecanismo de biocontrol. Estas moléculas son compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son quelantes del hierro, un elemento indispensable para el desarrollo de los organismos, por lo que, cuando estas sustancias son producidas por las rizobacterias, se suprime el desarrollo de los fitopatógenos (González-León *et al.*, 2023).

Otras de las actividades microbianas de *Bacillus* spp. se debe a la producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, quitosanasas, glucanasas, celulasas, lipasas y proteasas, que eficientemente hidrolizan los principales polisacáridos que conforma la pared celular de hongos y bacterias, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos (Miljaković *et al.*, 2020).

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *Bacillus* spp., son un tipo importante de sustancia antimicrobiana. Los VOCs pueden suprimir el crecimiento y la germinación de esporas de muchos hongos patógenos, así como inducir resistencia sistémica y promover crecimiento de las plantas, además de la actividad antifúngica (Chen *et al.*, 2020).

Generalmente los antagonistas utilizan más de un mecanismo de acción contra los patógenos. Para *Bacillus* spp., se ha reportado la sinergia de más de una sustancia con efectos antimicrobianos como sideróforos junto con lipopéptidos y/o enzimas líticas (Miljaković *et al.*, 2020; Chen *et al.*, 2020).

2.13.2. Competencia por nutrientes y espacio

La competencia por los nutrientes y el espacio es una de los más importantes mecanismos de biocontrol que predominan para bacterias y levaduras (Abraham *et al.*, 2010).

En el caso de los cítricos, en la superficie de los frutos las fuentes de nutrientes son limitadas, lo que inevitablemente conduce a una competencia entre patógenos y antagonistas (Talibi *et al.*, 2014), siendo los exudados de las plantas, el tejido senescido o los lixiviados las principales fuentes de suministro de nutrientes en la superficie de la planta huésped (Shafi *et al.*, 2017). Los agentes de control protegen estas superficies expuestas mediante una rápida colonización de las heridas y, por lo tanto, agotan los limitados sustratos disponibles (Talibi *et al.*, 2014).

En este mecanismo, el antagonista agota los nutrientes disponibles, impidiendo así que el patógeno utilice esos nutrientes para crecer. Los microorganismos patógenos y no patógenos deben competir por una colonización efectiva de la superficie de la planta, siendo esta el principal factor que determina el manejo exitoso de las enfermedades de las plantas (Shafi *et al.*, 2017).

2.13.3. Respuesta sistémica inducida

Cuando un patógeno ataca una planta, los tejidos vegetales no infectados adquieren la capacidad de resistir el ataque posterior; este tipo de capacidad de

las plantas de amplio espectro a largo plazo se conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR del inglés, systemic acquired resistance) (Shafi *et al.*, 2017).

Las plantas probablemente activan la expresión de genes diana y activan sustancias químicas diana en diferentes sistemas vegetales para defenderse contra infecciones patógenas (Shine *et al.*, 2018). La línea de defensa implica muchas reacciones químicas y bioquímicas, así como la producción de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) y cambios estructurales de los tejidos (Chen *et al.*, 2020).

Los principales componentes de la resistencia inducida sistémica son los compuestos fenólicos, las modificaciones genéticas y estructurales, los activadores de la resistencia de las plantas y la activación de armas enzimáticas (Shafi *et al.*, 2017).

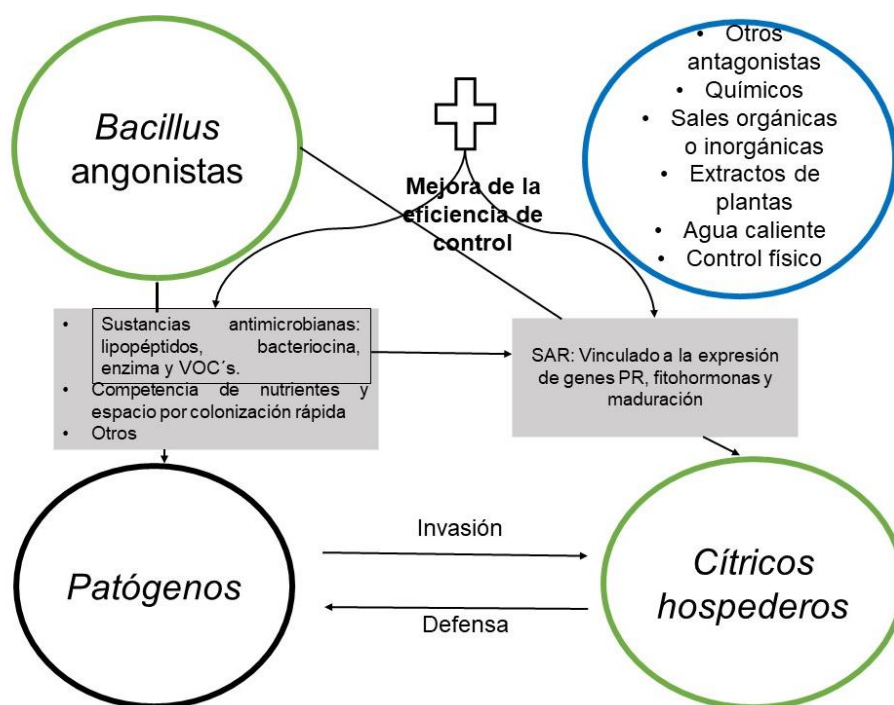


Figura 4. Los principales mecanismos de acción de los antagonistas de *Bacillus* contra las enfermedades de los cítricos. Los patógenos representan los patógenos que ocurren en las etapas previas y posteriores a la cosecha. VOC's (compuestos orgánicos volátiles), ISR (resistencia sistémica adquirida), PR (relacionados con la patogénesis). *Adaptado de* (Chen *et al.*, 2020).

3. Justificación

El cultivo de lima persa es de gran importancia económica a nivel estatal y se ve reflejado en el su valor de producción de \$ 6,082,435 millones de pesos en 2022. Sin embargo, la producción se ve afectada por diversos factores que demeritan el valor comercial de la cosecha, incrementando costos y limitando la producción. Entre los factores más importantes se encuentran las enfermedades causadas por hongos y bacterias. Para contrarrestar el efecto negativo que estos microorganismos traen consigo en la producción de lima persa, es necesario identificar las especies de microorganismos locales, ya que la gran diversidad de fitopatógenos y las diferentes condiciones del medio cambian de acuerdo a la región. A sí mismo, es importante evaluar alternativas para el control de estas enfermedades, distintas al uso de agroquímicos, como lo son los Agentes de Control Biológico (ACB) que han sido reportados por diversos autores como efectivos para el control de fitopatógenos que afectan diferentes cultivos de interés económico. Por lo anterior, el propósito de esta investigación es aislar e identificar el microorganismo causante de la enfermedad de mayor impacto en la zona citrícola Joachin, Ver., así como evaluar especies de *Bacillus* autóctonos como alternativa de control biológico contra el agente causal de la enfermedad.

4. Hipótesis

Las especies de *Bacillus* autóctonos presentarán un efecto antagónico contra el agente causal de la gomosis que afecta el cultivo de lima persa (*Citrus x latifolia* Tanaka) en la zona citrícola de Joachín, Ver.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

Determinar especies de *Bacillus* como alternativa de control biológico contra el agente causal de la gomosis en lima persa (*Citrus x latifolia* Tanaka) de la región citrícola Joachín, Ver.

5.2. Objetivos específicos

- 1.- Realizar el diagnóstico de las principales enfermedades del cultivo de lima persa en la zona de Joachín, Ver.
- 2.- Aislar y caracterizar el agente causal de la gomosis en cultivo de lima persa de la región de Joachín, Veracruz.
- 3.- Evaluar el efecto antagónico *in vitro* de especies de *Bacillus* autóctonos sobre fitopatógenos aislados del cultivo de lima persa.
4. Determinar la patogenicidad de los microorganismos aislados, en plantas de lima persa sanas (postulados de Koch).

6. Metodología

6.1. Diagnóstico de las principales enfermedades del cultivo de lima persa

6.1.1. Localización de la región de estudio

El municipio de Tierra Blanca se encuentra ubicado en la región de la cuenca del Papaloapan en el estado de Veracruz y geográficamente entre los paralelos 18° 19' y 18° 45' de latitud norte; los meridianos 95° 59' y 96° 38' de longitud oeste (Figura 5); altitud entre 10 y 350 m. Cuenta con un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (91%), cálido subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (8%) y cálido húmedo con abundantes lluvias en verano (1%). Con temperaturas medias de 24 – 26°C y precipitaciones de 1400 – 2100 mm (INEGI, 2010).

El municipio cuenta con 533 comunidades, de las cuales Joachín destaca por ser la segunda congregación más grande del municipio y cuyas principales actividades económicas son la agricultura y ganadería (SIEGVER, 2021). Esta localidad se encuentra ubicada al noroeste de la cabecera municipal, colindando con el municipio de Tlaxcoyan y con coordenadas 18° 38'' 26'N y 96°13'56'' W.

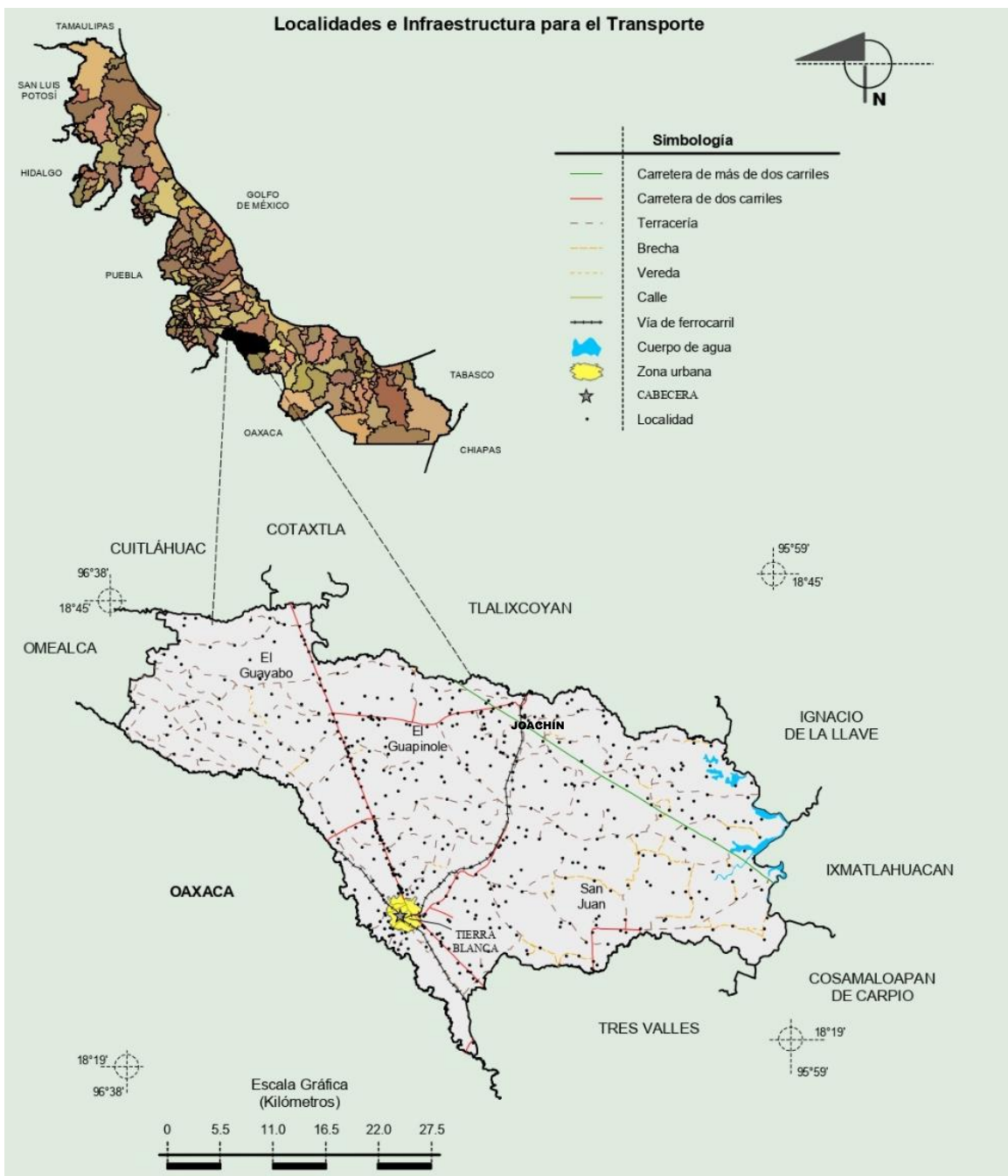


Figura 5. Ubicación geográfica del estado de Veracruz y el municipio de Tierra Blanca, México. INEGI, 2010.



Figura 6. Localización y delimitación del área de estudio de la zona de producción de lima persa de Joachín, Veracruz.

6.1.2. Aplicación de encuestas a productores

Para el presente estudio, se estableció un radio de influencia de 7 km considerando como punto central la comunidad de Joachín, municipio de Tierra Blanca, lugar donde se encuentra ubicada la cooperativa Citrícola Joachín (figura 6). Se entrevistaron a 28 productores de 10 comunidades pertenecientes a los municipios de Tierra Blanca y Tlaxcoyan, ambos del estado de Veracruz (tabla 4). El trabajo de campo se realizó en el período mayo-junio de 2022, aplicando una encuesta de 22 preguntas relacionados con el manejo agronómico de los huertos, las principales plagas y enfermedades presentes, así como los aspectos generales del cultivo y de la producción (anexo 1). Adicionalmente se recorrió cada huerta para identificar las principales plagas y enfermedades, observar la severidad de las mismas, tomar evidencia fotográfica y realizar registros.

Los datos obtenidos fueron procesados con el software Excel 2010 para desarrollar la estadística descriptiva y gráficos.

Tabla 4. Número de productores entrevistados en la región citrícola Joachín

Número de productores	Comunidad	Municipio
3	Joachín	Tierra Blanca
2	El Júcaro	Tierra Blanca
5	El Pantano	Tierra Blanca
1	Paso Escondido	Tierra Blanca
3	Nopiloa	Tierra Blanca
1	Loma de los Pichones	Tierra Blanca
10	Otapan	Tlalixcoyan
1	La Rosalía	Tlalixcoyan
1	La Laguna	Tierra Blanca
1	El Contenido	Tierra Blanca
28	Total	

6.2. Aislamiento e identificación del agente causal de la gomosis

6.2.1. Selección de huertas

En junio del 2022 se realizó el muestreo de 3 huertas de lima persa (tabla 5), ubicadas en la zona citrícola Joachín y comprendidos dentro de un radio de influencia de 7 km partiendo de esta misma localidad. En las huertas, se realizó la identificación de las plantas que presentaban, exudación de goma (gomosis), formación de canchales, clorosis, defoliación, decaimiento de la planta y muerte de ramas, sintomatología que los productores de la zona reportaban como enfermedad de gomosis.

Tabla 5. Localización de las huertas de lima persa muestreadas en la región de estudio.

Localización		Coordenadas	
Localidad	Municipio	Latitud	Longitud
El Pantano	Tierra Blanca	18°37'32"N	96°16' 33" W
Loma de los Pichones	Tierra Blanca	18°37'30"N	96°13' 08" W
Otapan	Tlalixcoyan	18°40'07"N	96°12' 27" W

6.2.2. Aislamiento de fitopatógenos

De las plantas que presentaron síntomas característicos de gomosis, con un bisturí estéril se tomaron segmentos (0.5 a 1 cm de largo) provenientes del margen de tejido necrótico y tejido sano, de ramas primarias y secundarias, así como de tallos. Las muestras fueron guardadas en bolsas de polipropileno estériles e identificadas para su posterior procesamiento en laboratorio.

La desinfección superficial de los tejidos se realizó sumergiéndolas en etanol al 70% durante 30 segundos, enjuagando a corriente con agua estéril, posteriormente las muestras fueron colocadas en papel filtro estéril para su secado. Se colocaron 4 fragmentos de tejido por cada placa de Petri, que

contenían agar rosa de bengala Difco™, complementado con cloranfenicol (0.5 g/L) y se incubaron a 29±1 °C en oscuridad por 48 horas.

Las colonias fúngicas observadas se sembraron, mediante el método de punta de hifa provenientes de los márgenes de las colonias, en papa-dextrosa-agar (PDA) y fueron incubados en las mismas condiciones de oscuridad y temperatura para la purificación de los aislados.

6.2.3. Identificación morfológica

Para la identificación morfológica de los hongos aislados, se consideraron las características de las colonias como el color, velocidad de crecimiento del micelio, tipo y forma de las colonias (Úrbuez-Torres *et al.*, 2013), así también se tomaron muestras de cada una de las colonias y se tiñeron con azul de algodón para observar las estructuras morfológicas bajo el microscopio.

Para las colonias que no presentaron esporulación después de las 4 semanas, la producción de picnidios fue inducida con la modificación de medio PDA con extractos de corteza de ramas y tallos, así como la adición de segmentos de tallo de lima persa en medio agar PDA. Otro de los medios empleados fue el medio líquido de caldo papa dextrosa suplementado con extracto de raíz de limón, para todos los casos, se incubaron a 28°C y en condiciones de luz fluorescente permanente, condiciones que propician la formación de picnidios para el género *Lasiodiplodia*, según lo reportado por Saha *et al.*, (2008).

Después de la esporulación de las colonias, se realizó la identificación presuntiva del género de hongos aislados y las posibles especies, con el apoyo de la clave de Phillips *et al.*, (2013).

6.2.4. Identificación molecular

La identificación molecular se realizó en el laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario del Colegio de Postgraduados (LADIFIT-CP), Texcoco, Estado de México.

El ADN fúngico extraído se utilizó para la amplificación de los genes ribosomales. Para el caso de las cepas presuntivas de *Lasiodiplodia* spp. (ZIM3, ZIIM1 y ZIIM3) y la cepa de *Colletotrichum* sp.(ZIIM3) se emplearon los cebadores

oligonucleótidos ITS1-ITS4 e ITS5-ITS4 (White *et al.*, 1990) utilizados para amplificar la región ITS de la región del ADN ribosómico nuclear.

Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit y comparadas para identificación por similitud contra la base de datos de Genbank, utilizando la herramienta BLAST®.

6.3. Efecto antagónico in vitro de *Bacillus* spp. sobre los aislados

6.3.1. Cepas de estudio

La experimentación se llevó a cabo durante los meses de mayo a septiembre del año 2022, en el laboratorio de microbiología del TecNM campus Tierra Blanca. Se utilizaron tres cepas bacterianas del género *Bacillus*, aisladas previamente de plantas de lima persa de la región de El “Jícaro”, municipio de Tierra Blanca, que fueron identificadas molecularmente y, que pertenecen a la colección de cepas del TecNM campus Tierra Blanca. Estas fueron *Bacillus subtilis* (Bs1) aislada de la rizosfera y *Bacillus subtilis* (Bs2), aislada previamente de las hojas. Así como una tercera cepa perteneciente a la especie de *Bacillus velezensis* (Bv), aislada de hojas de plantas lima persa.

Los cuatro fitopatógenos empleados en el bioensayo, fueron los previamente aislados en este estudio a partir de árboles sintomáticos de “gomosis” de diferentes huertas de lima persa de la región noroeste del municipio de Tierra Blanca, Veracruz y pertenecientes a la colección de cepas del TecNM campus Tierra Blanca, identificados como Las1 (*Lasiodiplodia* sp. ZIM31), Las2 (*Lasiodiplodia* sp. ZIIM1), Las3 (*Lasiodiplodia* sp. ZIIM3) y Colle (*Colletotrichum* sp. ZIIM3).

6.3.2. Pruebas de antagonismo

Para realizar las confrontaciones de *Bacillus* spp. frente a los fitopatógenos, se colocaron discos de 5 mm de diámetro en los puntos cardinales crecidos previamente en medio PDA, posteriormente, en el centro de la caja se colocó un disco de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno con 7 d de crecimiento. Todas las placas fueron incubadas a $29\pm 2^{\circ}\text{C}$ en ausencia de luz y los radios de

crecimiento del patógeno se midieron cada 24 h hasta que los testigos llenaron las cajas (Espinoza *et al.*, 2019).

La variable medida fue el radio de crecimiento del hongo fitopatógeno en presencia del antagonista bacteriano. Como control negativo o testigo se utilizaron placas donde se encontraban únicamente los hongos evaluados; con las mediciones obtenidas se determinó el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR), empleando la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.*, (2004):

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} * 100 \quad (1)$$

donde R_1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R_2 es el radio menor (radio del patógeno en confrontación).

Para el bioensayo se empleó un diseño completamente al azar, con doce tratamientos: tres aislados de *Bacillus* spp. confrontados contra cuatro hongos fitopatógenos (3 cepas de *Lasiosiphodia* sp. y 1 cepa de *Colletotrichum* sp.), con un testigo para cada microorganismo patógeno. Se realizaron 5 réplicas por tratamientos. Los datos del PICR se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias múltiple (Tukey, $P \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS V9.3.

6.4. Patogenicidad de los microorganismos aislados, en plantas de lima persa sanas (postulados de Koch)

6.4.1. Patogenicidad y virulencia en plantas

Para determinar la patogenicidad de las tres cepas aisladas de *Lasiodiplodia* se realizó un bioensayo en condiciones de invernadero en las instalaciones del Tecnológico Nacional de México campus Tierra Blanca (ITSTB), ubicado en el municipio de Tierra Blanca, Veracruz, México.

Para evaluar la patogenicidad, se emplearon plantas certificadas de lima persa (*Citrus x latifolia* Tan.) de un año de injertadas sobre portainjertos de limón volkameriano (*citrus volkameriana*). Estableciéndose un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos y 6 repeticiones. Un tratamiento para cada cepa aislada, un control (inoculado con discos de PDA estéril) y un control absoluto de plantas en las que sólo se le realizó el corte.

Para la inoculación de los hongos, se desinfectaron los tallos con alcohol al 70%. Luego, con un bisturí se realizó un corte longitudinal de 1 cm a la corteza del tallo, en un área ubicada a 10 centímetros superiores del injerto. La corteza fue desprendida ligeramente a forma de pestaña y en ella se colocó un disco de PDA (5 mm de diámetro) tomado del margen de una colonia con 6 días de crecimiento. El sitio de la inoculación fue sellado con parafilm® para evitar la desecación y contaminación. Las plantas se mantuvieron en un invernadero en condiciones de luz natural y a temperatura ambiente, que osciló en promedio de 21 a 32.5°C, en los meses de enero- abril del 2023.

Se realizaron observaciones periódicas a intervalos de 7 días por 3 meses, registrando la evolución de los síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas. La severidad de la enfermedad se evaluó a través de una escala que consistió en cuatro puntajes basados sobre la muerte del tallo y la corona del árbol (Adu- Accheapong, 2009) y modificado para el presente estudio (anexo 2). En donde la escala, 1= plantas sin síntomas visibles; 3 = Clorosis y marchitez de hojas más bajas (cercanas a la lesión por inoculación) y ligera exudación de goma

observable; 6 = follaje ½ marchito, ½ verde, defoliación y aumento de secreción de goma; y 9 = muerte de la planta (sin tejido vivo).

La virulencia de los aislamientos se evaluó a las 12 semanas después de la inoculación, en donde el tallo de las plantas fue seccionado longitudinalmente para observar el avance de las lesiones internas causadas por el hongo y medir la extensión longitudinal de la misma con apoyo de un vernier. De las plantas inoculadas y que presentaron síntomas de necrosis y gomosis, se procedió a reaislar en cultivo puro e identificar morfológicamente los hongos fitopatógenos empleando la metodología descrita en los apartados 6.2.2 y 6.2.3, para así cumplir los postulados de Koch.

Las diferencias en virulencia causada por *Lasiodiplodia* spp. fueron evaluadas mediante un análisis de varianza unidireccional (Anova) y las medias se compararon mediante la prueba de Tukey a $\alpha=0.05$ utilizando SAS.

7. Resultados y discusión

7.1. Diagnóstico de las principales enfermedades del cultivo de lima persa en la zona de Joachín, Ver

7.1.2. Caracterización del área de estudio

De los productores encuestados, el registro de sexo y edad correspondió al responsable del espacio productivo, que en 89.3% de los casos era el propietario de la tierra. En el caso del sexo, los resultados mostraron (figura 7) mayor participación de hombres (89.3%) con respecto a mujeres (10.7%), y que se compara con el 17% de la participación de la mujer en unidades de producción agrícola en México (INEGI, 2019). Concerniente a la edad (figura 8), predominan productores entre 41 y 60 años (53.6%), seguido del intervalo de 61 a 80 años (36.7%) y finalmente de 20 a 40 años (10.7%). Estos resultados muestran mayor participación de personas adultas mayores y de tercera edad en labores de campo en comparación con adultos jóvenes, y cuyos valores siguen la misma tendencia que se reporta a nivel nacional, de acuerdo con la Encuesta de Nacional Agropecuaria 2019. Lo anterior, puede ser efecto de fenómenos sociales como la migración, ya que el en estado de Veracruz se encuentra entre los tres estados de

mayor migración y que de acuerdo con el censo de población y vivienda 2020, los grupos de edad que mayormente emigran al extranjero son jóvenes de 18 a 29 años (INEGI, 2020).

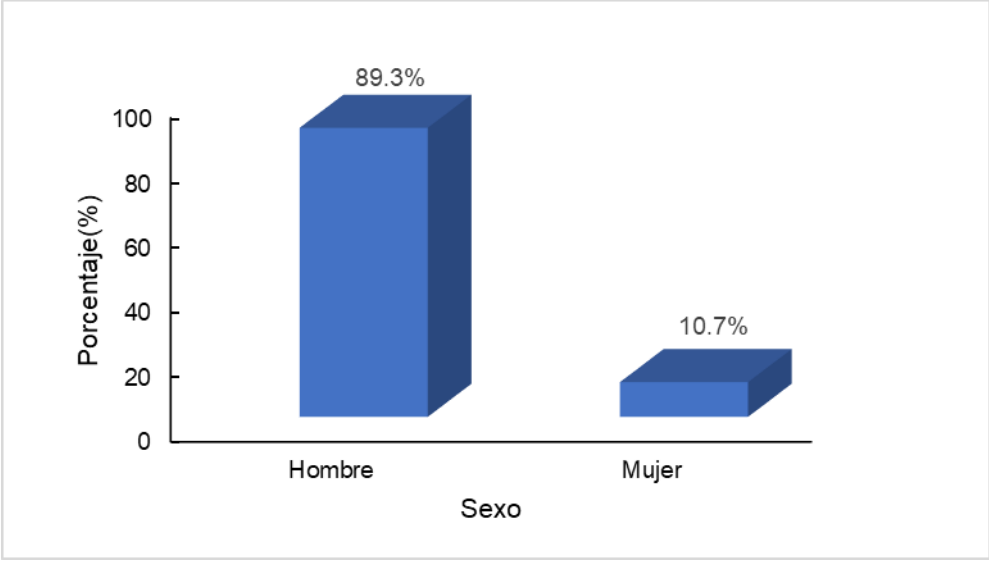


Figura 7. Sexo de los productores de lima persa. Elaboración propia de investigación de campo 2022

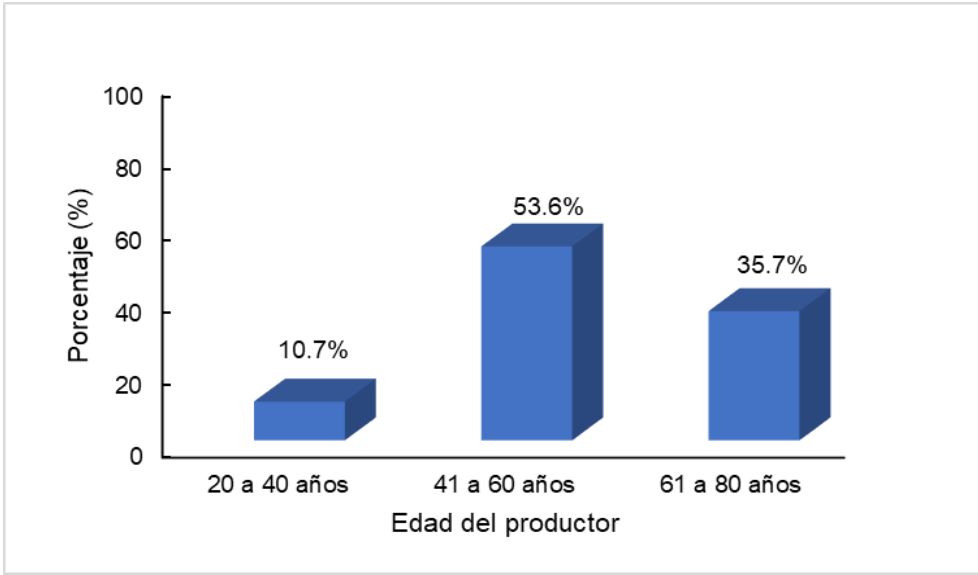


Figura 8. Edad de los productores de lima persa. Elaboración propia de investigación de campo 2022.

Referente a la organización de los productores, en la zona se cuenta con una cooperativa denominada “Citrícola Joaquín” de reciente creación en el año 2022 y que tiene como propósito organizar a los productores cítricos en la distribución y comercialización de su producto. Sin embargo, sólo el 39.3% de los productores encuestados pertenecía a esta organización y, el 60.7% mencionaron mantenerse independientes. Lo anterior puede limitar el aprendizaje colaborativo entre productores a través del intercambio de experiencias, así como la posibilidad de recibir asesoría técnica y capacitación, además de ver disminuidas las oportunidades de adquirir insumos a menores costos y poder negociar mejores precios en la comercialización de su producción. Así mismo, un productor por sí solo tiene escasas posibilidades de acceder a proyectos o programas, pero al organizarse con otros sus posibilidades se ven ampliadas (Partida y Meza., 2017).

Los productores cítricos encuestados mencionaron no contar con experiencia en el manejo de lima persa previo a la implementación de sus huertos (67.9%), por lo que desconocían varias de las labores culturales necesarias para el manejo de este cultivo. Cabe mencionar que esta falta de experiencia se puede relacionar con la antigüedad de los productores en el manejo de este cítrico, ya que el 78.6% indicó tener entre 1 a 5 años de experiencia (figura 9) y sólo el 3.6% contaba con más de 16 años en el manejo de huertas de lima persa.

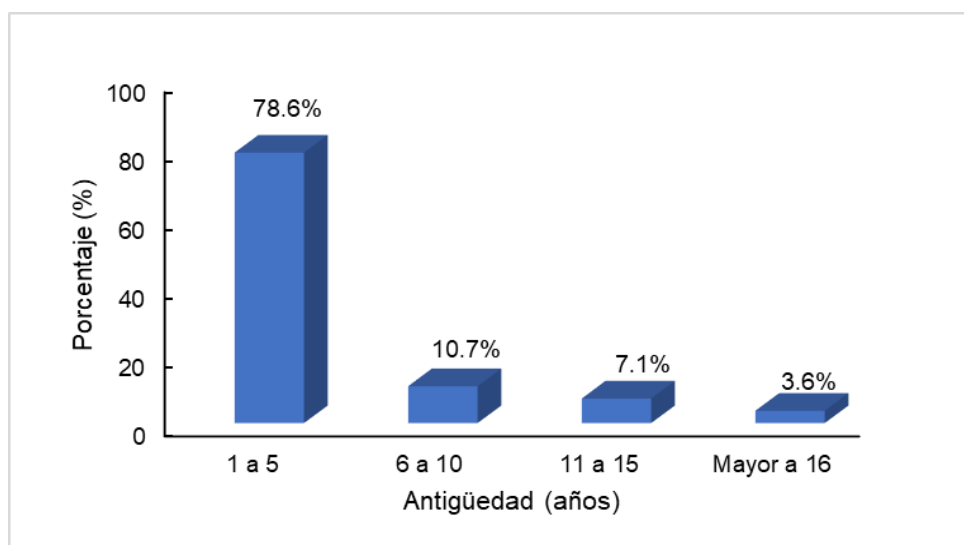


Figura 9. Antigüedad en el manejo de lima persa. Elaboración propia de investigación de campo 2022

Cabe resaltar, que la capacitación técnica es indispensable para la producción de lima persa, es por ello que se considera la capacitación, asistencia y asesoría técnica como requerimientos importantes en su producción (Valderrama *et al.*, 2022a). En este sentido, el 60.7% de los productores encuestados manifestaron no contar con asesoría técnica, mientras que el 39.3 % mencionaron tener asesoría por parte de los técnicos de las casas comercializadoras de agroquímicos donde adquieren sus insumos, por lo que su asesoría dependía de la adquisición de estos productos, además de ser eventual. Lo anterior coincide con lo reportado por Valderrama *et al.*, (2022b), en el municipio de Martínez de la Torre, donde el 88% de los productores de lima persa reportaron no haber recibido capacitación técnica para el manejo del cultivo y solo el 12 % recibieron alguna vez capacitación, por medio del servicio agrotécnico del mismo municipio. Si bien esta asesoría técnica ayuda a los productores a realizar algunas labores como fertilización, control de plagas y enfermedades, no se puede considerar un seguimiento adecuado, debido a que este tipo de asistencia que reciben los productores no es con la frecuencia requerida, además de verse influenciada por intereses comerciales, dejando de lado, las necesidades reales del productor y las actividades en vías de un desarrollo sostenible.

Con respecto a la extensión de superficie de las huertas, el 78.6% de los productores manifestó contar con huertas de superficie entre 0.5 a 5 hectáreas y el 14.3% con extensiones de 6 a 10 hectáreas (figura 10). Según la tipología propuesta por Schwentesius y Gómez, (2005), el mayor porcentaje de productores de lima persa de la zona de estudio, son pequeños productores o de subsistencia, ya que la superficie de siembra es menor a 10 hectáreas, siendo solo el 7.1% de los encuestados, medianos productores, al producir en superficies entre 10 y 20 hectáreas. Debido al mayor porcentaje de pequeños productores o de subsistencia, se condicionan los espacios de comercialización a los que recurren, principalmente para los que no se encuentran organizados, así también se dificulta el acceso a fuentes de financiamiento para realizar el correcto manejo de las huertas e implementación de innovaciones productivas.

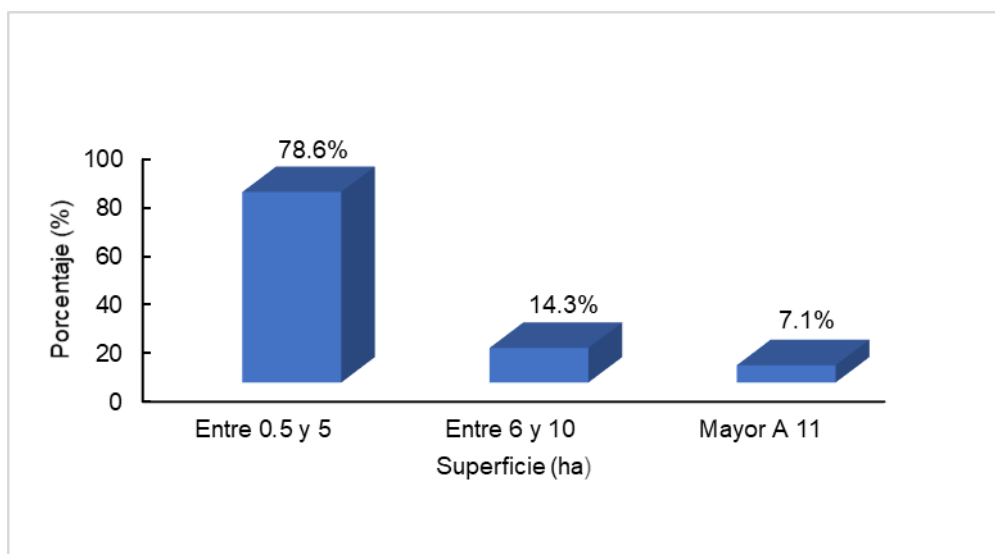


Figura 10. Superficie de lima persa por productor. Elaboración propia de investigación de campo 2022

El 60.7% de las huertas de lima persa se caracterizan por tener edad de entre 4 a 7 años y el 28.6% menos de 3 años (figura 11), esto nos indica que el mayor porcentaje de huertas de la región son cultivos jóvenes en etapa productiva. Sin embargo, con base a la información proporcionada por el productor, se estimó un rendimiento promedio anual de 12.16 t/ha, cuyo valor prevalece por debajo de la media estatal de 15.74 t/ha (SIAP, 2021).

7.1.3. El origen y selección del material vegetal

Para la implementación de las huertas, el 92.9% de los productores adquirieron planta no certificada que procedía de viveros regionales y, en algunos casos las plantas fueron adquiridas a través de un intermediario que se encargaba de obtener las plantas en viveros de la región, así como entregarlas al productor directamente en las huertas. Debido a esto, los citricultores desconocían del origen preciso de sus plantas, no tenían la certeza de haber adquirido material vegetal sano y no podían constatar que los portainjertos y variedades de interés correspondieran con lo adquirido a través de los viveros regionales o mediante los intermediarios.

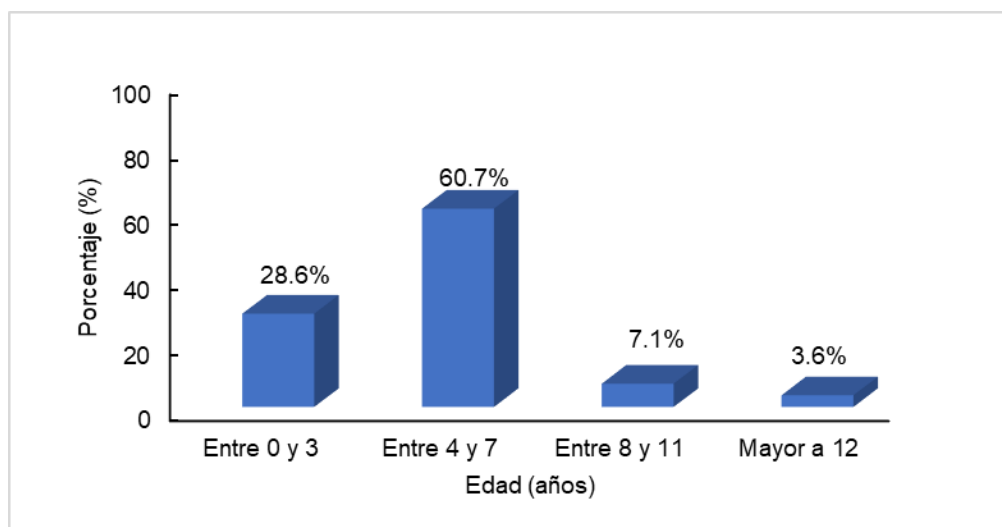


Figura 11. Edad de los huertos de lima persa. Elaboración propia de investigación de campo 2022

En la citricultura, generalmente los árboles se propagan injertando el cultivo fructífero (vástago), sobre un segundo cultivar que formará el tronco inferior y el sistema radicular, que se denomina patrón o portainjerto. El uso de portainjertos da la oportunidad de producir rápidamente una cantidad ilimitada del árbol del frutal original, cada uno de los cuales será genéticamente idéntico y tendrá esencialmente las mismas características frutales (Bowman y Joubert., 2020). Así también el portainjerto, confiere al árbol injertado tolerancia a ciertas enfermedades, plagas y condiciones abióticas, además de influir en los rendimientos y en la calidad del fruto (Cantuarias *et al.*, 2012; Raddatz *et al.*, 2019; García *et al.*, 2021; Pathania y Singh., 2021).

De los patrones mayormente empleados en la región, el 53.6% de los productores utilizó naranjo agrio (*Citrus aurantium*), conocido popularmente como “cucho”, para establecer sus huertas. Esto debido a la gran oferta y popularidad, además de ser el más conocido por los productores de la región. Por otra parte, el 25% empleó dos tipos de patrones: naranjo agrio y limón Volkameriano (*Citrus volkameriana*) (Tabla 6).

Cabe señalar que hay desconocimiento de los productores por características que confieren los diferentes “patrones” a la producción, siendo su selección sesgada

por la recomendación de un tercero o la disponibilidad de las variedades en la región, dejando de lado aspectos como producción, calidad de fruto, tipo de suelo y enfermedades presentes en la zona.

Tabla 6. Patrones empleados por productores de la región citrícola Joachín

Patrones	Porcentaje
Naranja Agrio	53.6
Volkameriano	3.6
Limón real	10.7
Naranja agrio/volkameriano	25.0
Volkameriano/macrófila	7.1

Fuente: elaboración propia de investigación de campo 2022.

Los patrones de naranja agrio y limón volkameriano, mayormente empleados en la región de Joachín, son clasificados según Campbell, (1991) como patrones bien adaptados, al producir buenos rendimientos y calidad de la fruta en la mayoría de condiciones del sitio; además de ser tolerantes a infecciones por gomosis (*phytophthora spp*) y, en el caso específico de limón volkameriano resistente al virus de la tristeza de los cítricos (VTC). Sin embargo, los portainjertos de naranja agrio presentan alta susceptibilidad al VTC, baja compatibilidad con otros cítricos y en algunos casos, rendimientos más bajos en comparación con otros portainjertos (Castle *et al.*, 2011). Debido a la alta susceptibilidad del naranja agrio al VTC, esta enfermedad representa una seria amenaza para la producción de lima persa en la región de estudio.

7.1.4. La poda

La poda, es una actividad cultural con diferentes propósitos, entre ellos ayudar a la sanidad de la planta, regular el tamaño, equilibrar el desarrollo vegetativo y reproductivo, y restablecer la incidencia de luz en la mayor superficie foliar (Rocha y Padrón., 2009). En este estudio, el 100% de los productores citrícolas indicaron realizar algún tipo de poda, de los cuales el 89.3% desconocía los tipos de poda y contrataban a personal externo para realizarla, mientras que solo el 10.7% conocían de la labor y capacitaban a sus trabajadores para realizar las podas de

sus huertas. Cabe señalar, que la desinfección eficiente y frecuente de herramientas durante la poda es de gran relevancia para evitar la propagación de enfermedades; sin embargo, se obtuvo que el 46.4% de los productores no realizó la desinfección de herramienta durante la poda y el 53.6% que la realizó, no reportaron la desinfección de la herramienta con la frecuencia adecuada, al no realizar la desinfección por árbol ni emplear los productos y concentraciones adecuados. En adición a esto, el 100% de los productores no protegió los cortes realizados, no juntó los residuos vegetales de poda y no realizó la quema de estos, por lo que se pueden propagar enfermedades dentro de los mismos huertos, ya que hongos fitopatógenos como el género *Lasiodiplodia*, según lo reportado por Moreira *et al*, (2021), sobrevive en el suelo y en restos culturales, principalmente en forma de picnidios, esclerocios y/o clamidósporas.

7.1.5. El riego

El suministro de agua es gran importancia en el desarrollo de los cítricos debido a que su disponibilidad es el factor más importante para determinar el rendimiento de la planta y, en última instancia, la supervivencia. En este sentido, tanto la escasez como el exceso de agua se consideran factores estresantes abióticos importantes (Vincent *et al.*,2020). Entre los métodos de riego, se encuentran el superficial o rodado, riego por aspersión y el riego localizado o presurizado. De los sistemas antes señalados, el riego localizado o presurizado (riego por goteo y microaspersión) es el que presenta mayores ventajas por el ahorro de agua, humedecimiento localizado y la versatilidad de su aplicación en diversas características del terreno (Curti- Díaz *et al.*, 2000). En el presente estudio, el 75% de los huertos presentó un sistema de riego por microaspersión y el 10.7% por riego de goteo (gráfico 12). En ambos casos, los pozos profundos fueron la principal fuente de agua. Por otra parte, el 14.3% de los productores manifestó utilizar riego rodado para el cultivo, y cuya fuente de suministro era agua de canal de riego y ríos aledaños a sus huertos. Para este tipo de riego, se observó durante las visitas al campo, el estancamiento de agua, la erosión de los suelos y el exceso de humedad en el tallo de los árboles, que son condiciones que propician el desarrollo de enfermedades de origen fúngico.

Adicionalmente, se constató con las visitas al campo que el suministro de agua a los huertos no es medido y que los riegos se realizan de acuerdo al conocimiento adquirido y basado en experiencias empíricas por parte de los productores. Debido a que no miden las láminas de riego empleados, ni calendarizan los riegos de acuerdo a la etapa fenológica de sus huertos y la época del año, realizando los riegos según se observe la necesidad en planta. De acuerdo con Rocha y Padrón, (2009) el descuidar las plantaciones en cuanto a riegos, puede afectar las etapas fenológicas de crecimiento vegetativo y desarrollo del fruto, lo que puede impactar en la productividad de la plantación.

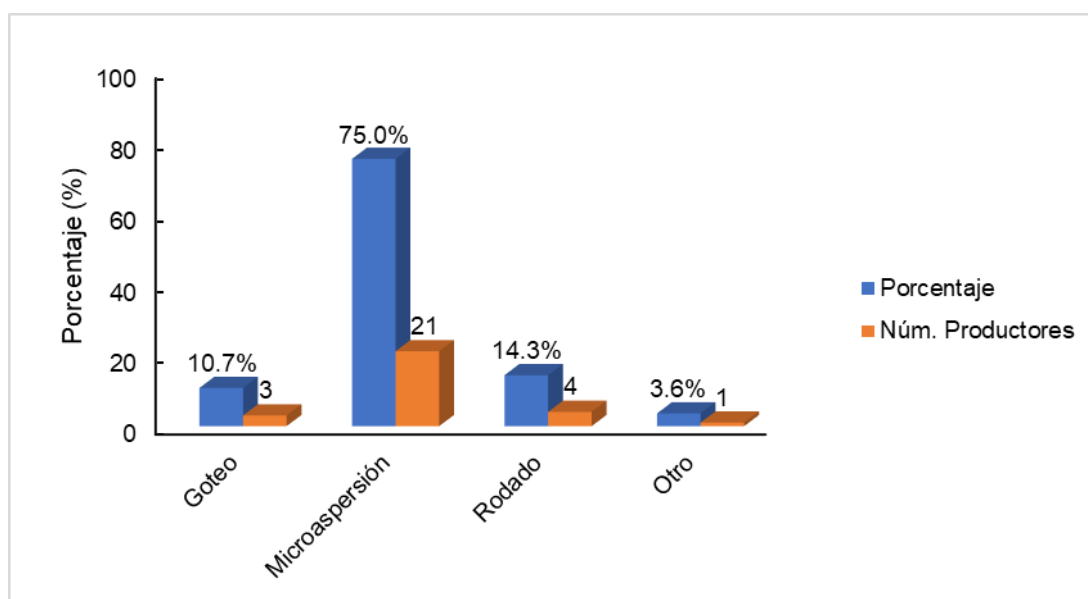


Figura 12. Sistemas de riego. Elaboración propia de investigación de campo 2022

7.1.6. Fertilización

Conocer la composición del suelo a través de un análisis físico-químico-biológico puede mostrar la dinámica de sus componentes y deducir el potencial de interacción de los mismos con la planta. En este punto, el estudio mostró que el total de productores encuestados no realizaron análisis de suelos ni análisis foliares, por lo que desconocían los requerimientos de nutrientes de las huertas, así como las características del suelo, tales como pH, contenido de materia orgánica y minerales presentes. Debido a la anterior, la nutrición empleada a los huertos de lima persa se basa en la experiencia y observación de los productores,

y en ocasiones, en las recomendaciones de casas comercializadoras de agroinsumos, lo que no asegura la adecuada nutrición de las plantas y el riesgo de emplear nutrientes no requeridos por las mismas, lo que impacta en la eficiencia de los huertos, como lo indica Curti *et al.*, (2000) al mencionar que debido al uso de productos comerciales que contienen elementos innecesarios o no requeridos, se puede provocar un desbalance nutricional del árbol, o en el caso, de aplicar cantidades inadecuadas para lo requerido por la planta, se puede afectar la calidad del fruto y/o el volumen de producción. Para este punto, los datos recabados mostraron que el 92.9% de los entrevistados realizó fertilización química empleando productos sintéticos granulados, mientras que el 7.4% aplica abonos orgánicos. Lo anterior muestra la influencia de casas comerciales de agroquímicos en la región y la escasa cultura de sostenibilidad.

7.1.7. Las plagas

Las plagas presentes en los cítricos afectan de manera significativa la producción y calidad de los frutos en lo huertos, es por ello la importancia de la identificación y su control. En este estudio se obtuvo, a partir de las encuestas a productores y con lo observado en campo, que las principales plagas que afectan los huertos de la región son la araña roja (*Panonychus citri* McGregor), diaforina diaforinas (*Diaphorina citri* Kuw.), minador de la hoja (*Phyllocnistis citrella* Station), ácaros (*Phyllocoptruta oleivora*), pulgones (*Aphis citricola* Van der Goot), trips (*Scirtothrips citri* Moulton) y escama de nieve (*Lepidosaphes gloverii* Pack). Entre estas, la araña roja estuvo presente en el 100% de los huertos (tabla 7) causando afectaciones severas en el cultivo debido a su rápida proliferación. Así también, este ácaro ha sido reportado por diversos autores como una de las plagas más significativas y devastadoras de árboles frutales de hoja caduca y perenne, distribuidas a nivel mundial y con características de resistencia a diversos acaricidas (Van Leeuwen *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2019; Gerson, 2003).

Para su control, los productores indicaron aplicar métodos químicos (89.3%), mientras que el 3.6% utilizó la combinación de productos químicos y orgánicos de tipo comercial y, el 7.1% realizó la aplicación con productos de tipo orgánico, que los mismos productores elaboraron de forma artesanal. A pesar que existen otros

métodos para el control de plagas, el uso de químicos (sintéticos) es lo mayormente empleado por los productores de la región, debido a su fácil aplicación y los resultados rápidos que se observan. Sin embargo, el uso excesivo de estos productos altera los sistemas biológicos naturales, induce la resistencia de las plagas y, finalmente, conduce a un resurgimiento de las poblaciones de plagas (Urbaneja *et al.*, 2020), lo que resulta contraproducente para el control efectivo de plagas.

Tabla 7. Plagas presentes en la zona citrícola Joachín

Plagas	Frecuencia	Porcentaje (%)
Pulgones	13	46.4
Ácaros	17	60.7
Trips	15	53.6
Minador	17	60.7
Diaforinas	16	57.1
Hormigas	1	3.6
Escama de nieve	1	3.6
Araña roja	28	100.0

Fuente: elaboración propia de investigación de campo 2022

Por lo anterior, la araña roja representa un riesgo para la producción de lima persa en la zona citrícola Joachín al ser considerada una plaga resistente a acaricidas químicos, y a su vez, es un reto importante para los citricultores ya que deben de emplear alternativas diferentes al control químico, para el manejo efectivo de este tipo de plaga en la región.

7.1.8. Las principales enfermedades

Las enfermedades de los cítricos pueden ser inducidas por diversos factores como hongos, plagas, bacterias y clima extremo, que pueden disminuir la producción y, en ocasiones, incluso poner en peligro los huertos (Zhang y Chen.,2022). En este estudio, se identificaron las enfermedades presentes de acuerdo a lo reportado

por los productores y por recorrido visual en campo. Se destaca la gomosis, Huanglongbing (HLB), fumagina, y en menor porcentaje, la antracnosis (tabla 8). La enfermedad denominada gomosis, se presentó en el 100% de los campos productivos. Así también, el total de productores coincidieron en señalar que la “gomosis” era la enfermedad de mayor incidencia en sus huertas, además de ser la causante de la mayor pérdida productiva al desencadenar el decaimiento, disminución de la producción y finalmente, la muerte de árboles enfermos.

Con los datos recabados en la encuesta, se obtuvo que los principales agentes causales de enfermedades en las huertas de lima persa, son hongos y que de acuerdo con Doehlemann *et al.*, (2017), son las enfermedades de origen fúngicas los factores bióticos más comunes que causan serias amenazas a los diferentes cultivos.

Tabla 8. Enfermedades predominantes en la región citrícola Joachín.

Enfermedad	Frecuencia	Porcentaje
Gomosis	28	100.0
HLB	20	71.4
Antracnosis	1	3.6
Fumagina	11	39.3

Fuente: elaboración propia de investigación de campo 2022

Para el control de enfermedades, predominó entre los productores encuestados el control de tipo químico (78.6%), otros empleaban productos orgánicos (7.1%) y un 14.3% no realizaba ningún tipo de control, esto debido al poco conocimiento del productor en la identificación de los agentes causales de las enfermedades y nula asesoría técnica en el control de enfermedades. Por otro lado, los productores reportaron (53.6%), que las medidas empleadas para el control de enfermedades en los huertos no eran eficientes debido a la reincidencia de las enfermedades y afección que estas causaban en sus plantas. Así mismo, coincidieron en que la incidencia de las enfermedades no estaba marcada por una temporada específica, ya que durante todo el año se presentaban problemas de enfermedades en los huertos.

Para el caso específico de control de enfermedades en la región de estudio se requiere una estrategia efectiva y eficiente para la identificación temprana y con ello, una respuesta rápida para el manejo de los hongos fitopatógenos y en general, de los microorganismos y virus presentes que provocan las diferentes enfermedades en lima persa. Debido a que las diferentes enfermedades requieren diferentes procedimientos, la identificación precisa de las enfermedades de los cítricos en los huertos es importante para una intervención temprana a fin de minimizar el daño (Barbedo, 2018).

7.2. Aislamiento e identificación del agente causal de la gomosis

7.2.1. Recolección de muestras

En las 3 huertas comerciales de la zona de estudio, se logró identificar árboles enfermos con exudación de goma en ramas y tallos, necrosis en tejido enfermo, agrietamiento, marchitamiento de árboles y la muerte regresiva en ramas (figura 13). Estos síntomas son comúnmente asociados por los productores regionales como gomosis (*Phytophthora spp.*) y que de acuerdo con Orozco-Santos, (1995) provoca la exudación de goma, canchros en tallo, agrietamiento de la madera, clorosis de hojas, muerte progresiva de ramas, defoliación y muerte del árbol. Sin embargo, en México se han reportado huertas de cítricos que se ven afectadas especies del género *Lasiodiplodia* (Bautista *et al.*, 2019; Valle- de la Paz *et al.*, 2019; Polanco *et al.*, 2019; Flores *et al.*, 2021) y que además provocan síntomas similares al de la gomosis como lo es: canchros en tallo y ramas, agrietamiento, necrosis de tejido enfermo y muertes regresiva de ramas, causando la muerte de la planta (McDonald y Eskalen., 2011). De esta forma, la semejanza de los síntomas de estas enfermedades, podría ser un factor de confusión para los productores, al identificar el agente causal de la enfermedad y a su vez, la elección en los métodos de control para estos fitopatógenos.



Figura 13. Síntomas de “gomosis” en lima persa. A) Agrietamiento y necrosis en lesiones; B) Muerte descendente en ramas; C) Exudación de goma; D) Decaimiento, clorosis y defoliación de árboles enfermos.

7.2.2. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos

De las muestras de árboles enfermos, se lograron aislar un total de 9 colonias (3 por huerta), de las cuales, se utilizó una submuestra de cada huerta para realizar la identificación molecular y las pruebas de patogenicidad.

Las cepas identificadas como Las1 (ZIM3), Las2 (ZIIM1) y Las (ZIIM3) presentaron desarrollo de picnidios de coloración oscura en diferentes medios modificados: el agar PDA con extracto de tejido vegetal (brotes) propició el

desarrollo de picnidios de la cepa Las1 después de los 50 días, mientras que la cepa Las2, desarrolló estructuras reproductivas asexuales a los 47 días en agar PDA suplementado con extracto de tejido vegetal (corteza de ramas) y al cual se le colocaron pequeños segmentos de ramas en las placas (figura 14. A). Por otro lado, la cepa identificada como Las desarrolló picnidios a los 30 días en un medio líquido compuesto de papa dextrosa con extracto de raíz de limón, siendo para todos los casos las mismas condiciones de temperatura y luz (29°C y luz fluorescente 24 horas). El desarrollo de estructuras asexuales de las cepas en diferentes medios modificados lo corroboran otros autores al reportar que, la adición de estructuras de plantas y sus extractos en medios sintéticos como lo son: extractos de raíz de plantas, fibras de bagazo de caña y acículas de pino, propician a la esporulación y el aumento de formación de picnidios de especies del género *Lasiodiplodia* en medios sintéticos (Saha *et al.*, 2008; Mussi *et al.*, 2016; Lima *et al.*, 2015).

Los aislados se caracterizaron por desarrollar en estos medios abundante micelio aéreo de crecimiento rápido, de tipo algodonoso y presencia de hifas septadas. Las colonias inicialmente presentaban una coloración blanquecina, para posteriormente tornándose gris-verdosa (7 días) y oscurecerse completamente transcurridos los 14 días.

Las tres colonias presentaron conidiomas (picnidios) que desarrollaron conidios (esporas) inicialmente hialinas y aseptadas, pero con el tiempo, en estas se formó un septo medio transversal, las paredes tomaron un color café oscuro y se observaron estriaciones longitudinales (figura 14), características que distinguen al género *Lasiodiplodia* de otros géneros estrechamente relacionados (Abdollahzadeh *et al.*, 2010), y que a su vez, coinciden con las características reportadas por Phillips *et al.*, (2009) para las diferentes especies de este mismo género.

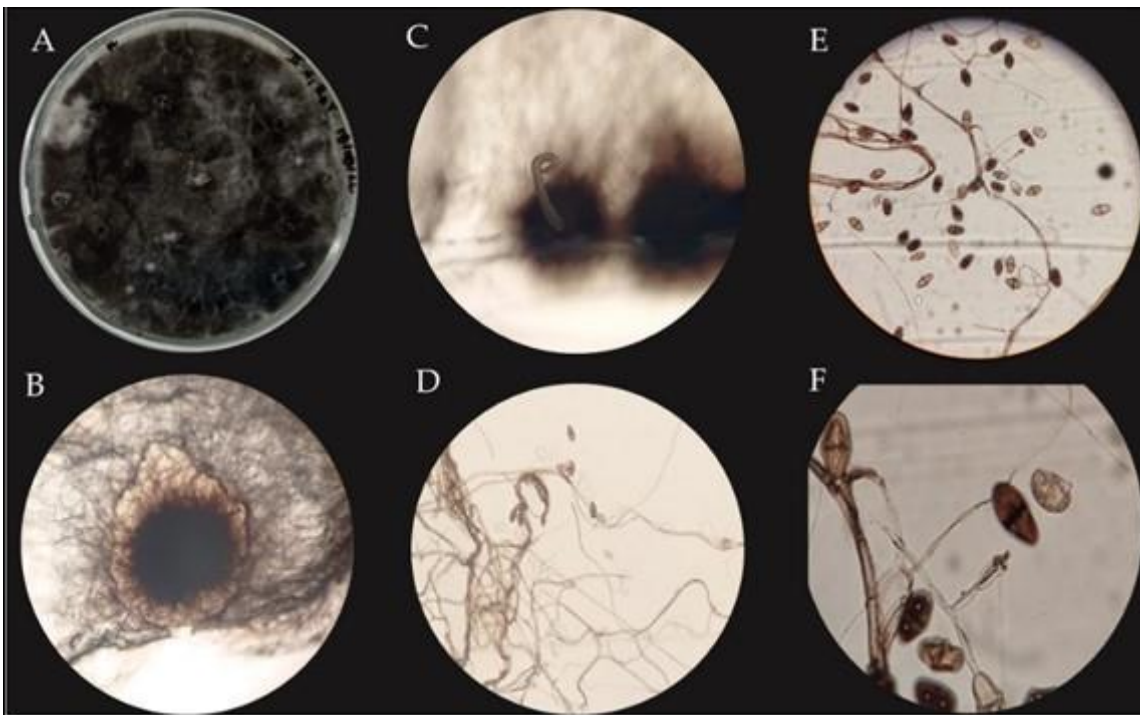


Figura 14. Características morfológicas de *Lasiodiplodia* spp. A, Desarrollo de la colonia a 47 d en medio PDA suplementado con extracto vegetal de limón. B, Picnidio (conidiomata). C, liberación de conidias inmaduras del picnidio. D, Conidias hialinas. E, Conidias maduras y F, Conidios con estriaciones longitudinales y segmentación media transversal.

La identificación a nivel especie no se realizó por este método, debido a la poca variabilidad morfológica entre las cepas reportadas y la similitud entre más de una especie de género *Lasiodiplodia*. Así mismo diferentes autores reportan a las especies del género *Lasiodiplodia*, como inadecuadas para definir las o identificarlas, únicamente por las características morfológicas, por la confusión de la taxonomía en el pasado y también porque existe una gran variabilidad en las características fisiológicas entre los aislamientos de una misma especie (Phillips *et al.*, 2009; Picos-Muñoz *et al.*, 2014). Así también, Slippers *et al.*, (2013) señala lo engañoso pueden ser los caracteres de los conidios y ascosporas para evaluar el origen evolutivo de estas especies.

7.2.3. Identificación molecular

En las reacciones de PCR, se logró la amplificación de ADN de las cuatro especies de hongos utilizando los primers ITS1/ITS4 e ITS5/ITS4. Al comparar las secuencias de ADN de los aislamientos con secuencias del GenBank, en los cuatro casos dichas secuencias mostraron una alta cobertura y similitud con diferentes especies del género *Lasiodiplodia* y *Colletotrichum* (tabla 9), por lo que tres de las cuatro cepas aisladas han sido afiliadas a *Lasiodiplodia* sp., y una a *Colletotrichum* sp. hasta realizar más estudios para clasificar estos aislado a nivel de especie.

Valle-De la Paz *et al.*, (2019), reporta la distribución, incidencia y severidad de *Lasiodiplodia* spp. en huertas comerciales de lima persa en el estado de Morelos, logrando aislar e identificar molecularmente a *Lasiodiplodia* sp., *L. citrícola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*, empleando los cebadores ITS5/ ITS4, lo cual coincide con los resultados obtenidos, al lograr aislar e identificar a *Lasiodiplodia* sp. a partir de árboles de lima persa que presentaban exudación de goma, canchros, agrietamientos en tallos, clorosis y muerte regresiva en ramas.

A pesar de no llegar a una identificación específica de las especies de *Lasiodiplodia* que afectan la zona de estudio, la identificación molecular de *Lasiodiplodia* sp. aisladas en la región citrícola Joachín brinda una mayor claridad del agente causal de muerte descendente, ya que localmente, los síntomas de esta enfermedad han sido confundidos con los síntomas causados por gomosis (*Phytophthora* spp.) al provocar secreción de goma y formación de canchros en las plantas enfermas.

Tabla 9. Identidad máxima encontrada en las secuencias de las cepas Las1 (ZIM3), Las (ZIIM1), Las3 (ZIIM3) y colle (ZIIM3), en el GenBank

Especie/Cepa	Identidad por ITS1/ITS4 (ID GenBank)	Identidad por ITS5/ITS4 (ID GenBank)
<i>Lasiodiplodia</i> sp. /ZIM3	100% <i>Lasiodiplodia citrícola</i> (MK041907.1)	
	100% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (OM797962.1)	
	100% <i>Lasiodiplodia</i> sp. (JN615242.1)	
<i>Lasiodiplodia</i> sp. /ZIIM1	100% <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MH277915.1)	99.79% <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MT332314.1)
	99.77% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (OP963846.1)	
	99.77% <i>Lasiodiplodia</i> sp. (OP117391.1)	99.79% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (MT043789.1)
<i>Lasiodiplodia</i> sp./ZIIM3	93% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (JX139597.1)	100% <i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> (MN341226.1)
	93% <i>Lasiodiplodia</i> sp. (MW299483.1)	100% <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (MT043789.1)
<i>Colletotrichum</i> sp./ ZIIM3	100% <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (OQ274997.1)	100% <i>Colletotrichum siamense</i> (MT450688.1)
	100% <i>Colletotrichum</i> sp. (MT570098.1)	100% <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (OQ572332.1)
	100% <i>Colletotrichum siamense</i> (OQ379695.1)	

7.3. Efecto antagónico in vitro de *Bacillus spp.* sobre los aislados

7.3.1. Actividad antagónica in vitro de *Bacillus spp.* vs aislados fúngicos

El PICR entre microorganismos evaluados *in vitro* (figura 15), muestra que las dos cepas de *Bacillus subtilis* Bs1 y Bs2, tuvieron un comportamiento antagónico sobre los cuatro hongos confrontados, mientras que en la cepa de *Bacillus velezensis* (Bv) no ejerció antagonismo sobre tres cepas de patógenos (Colle, Las2 y Las3) al observarse el desarrollo de los patógenos sobre las colonias del antagonista y que mostraron un desarrollo completo en la placa (figura 16). En diferencia, solo se mostró inhibición del 8.4% sobre *Lasiodiplodia sp.* ZIM3 (Las1). Estos resultados contrastan con lo reportado por Chukeatirote *et al.*, (2018), en donde *Bacillus velezensis* presentó un 60% de inhibición de crecimiento radial de sobre *Lasiodiplodia theobromae*.

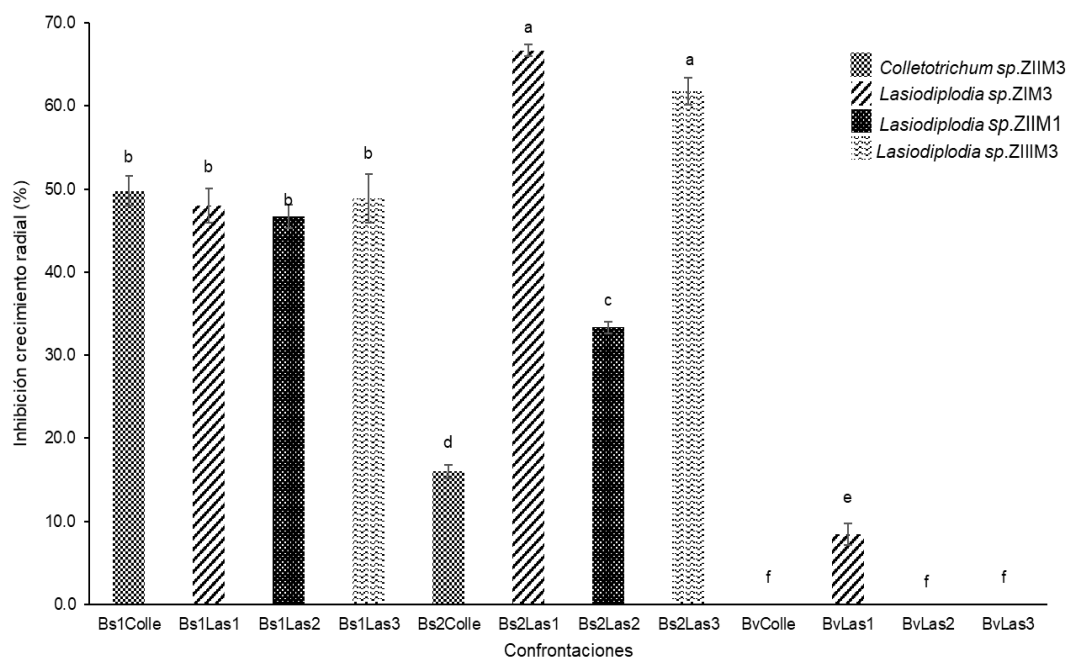


Figura 15. Confrontación in vitro de *Bacillus spp.* contra patógenos de lima persa. Bs1 (*B. subtilis* 212s); Bs2 (*B. subtilis* 314s); Bv (*B. velezensis*); Colle (*Colletotrichum sp.* ZIIM3); Las1 (*Lasiodiplodia sp.* ZIM3); Las2 (*Lasiodiplodia sp.* ZIIM1); Las3 (*Lasiodiplodia sp.* ZIIM3). Barras con la misma letra no son estadísticamente diferentes, de acuerdo con la prueba de Tukey ($p=0.05$).

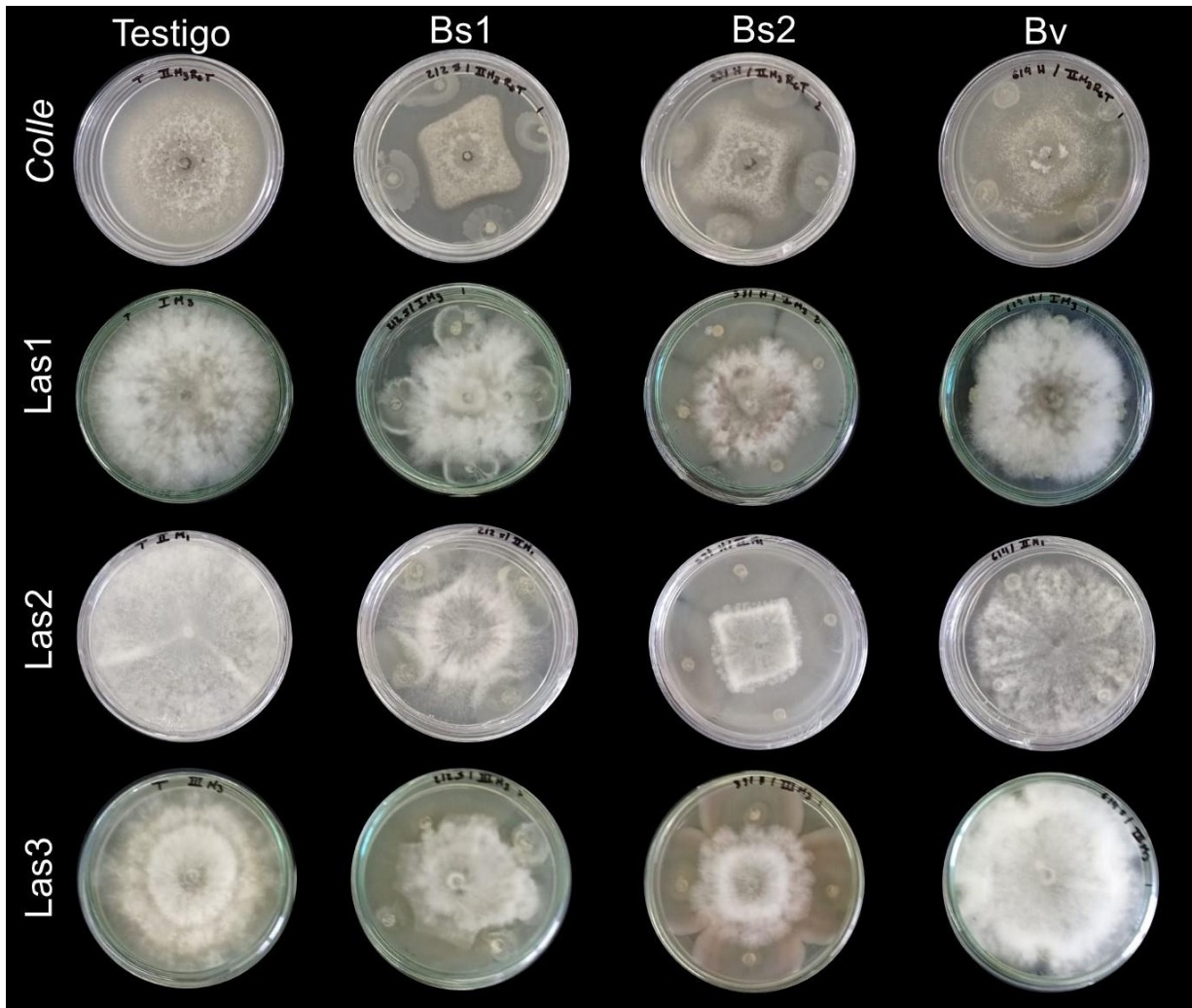


Figura 16. Efecto inhibitorio de tres cepas de *Bacillus* spp. sobre el crecimiento de cuatro aislados de patógenos de lima persa a los 9 días incubación. Bs (*B. subtilis* 212s); Bs2 (*B. subtilis* 314H); Bv (*B. velezensis* 614H); Colle (*Colletotrichum* sp. ZIIM3); Las1 (*Lasiodiplodia* sp. ZIM3); Las2 (*Lasiodiplodia* sp. ZIIM1); Las3 (*Lasiodiplodia* sp. ZIIM3).

Se ha reportado por diferentes autores estudios de secuenciaciones genéticas de *Bacillus velezensis*, en los que se han identificado grupos de genes relacionados con la síntesis de metabolitos secundarios con actividad antifúngica, como lo son las fengicinas, iturinas y surfactinas que juegan un papel importante en el control de patógenos fúngicos (Zhang *et al.*, 2022; Wei *et al.*, 2023). No obstante, al ser evaluado en plantas, se ha observado que puede reducir las enfermedades,

debido a la formación de biopelículas en las rizosfera que promueven el crecimiento y las protegen de los microorganismos infecciosos, tanto por la secreción de compuestos antimicrobianos como a través de la resistencia sistémica. (Rabbee *et al.*, 2019; Moreno *et al.*, 2021). Por lo anterior, esta especie podría tener un efecto prometedor en el desarrollo y protección de la planta en pruebas *in situ*.

Por otra parte, la cepa de *Bacillus subtilis* (Bs2) presentó los valores más altos de inhibición de crecimiento micelial, mostrando un 66.69 y 61.78% de inhibición sobre las cepas de *Lasiodiplodia* sp., Las1 y Las3, respectivamente (figura 15). Se reportan resultados similares por Sajitha *et al.* (2014), al evaluar dos cepas identificadas como *Bacillus subtilis* contra *Lasiodiplodia theobromae*, donde se obtuvieron valores de inhibición de 64.44 y 60.74%. El bajo porcentaje que se obtuvo de la cepa Bs2 sobre *Colletotrichum* sp. (16%), contrasta con lo señalado por Ayón *et al.*, (2020), quien reporta un porcentaje de inhibición micelial superior (32%) en la evaluación de *Bacillus subtilis* sobre *C. gloeosporioides* (Colle).

Adicionalmente, la cepa de *Bacillus subtilis* (Bs1), mostró un efecto homogéneo en la inhibición de los cuatro patógenos en confrontación, ya que los valores obtenidos de PICR no mostraron diferencias significativas (figura 15). Evidenciando valores de inhibición que van de 46.6% sobre la cepa Las2 y un máximo de 49.7% para la cepa de Colle.

Cabe mencionar que las cepas Bs1 y Bs2 identificadas como *B. subtilis*, no obtuvieron los mismos resultados. Lo anterior coincide con Castillo *et al.*, (2015), en que para cepas de una misma especie se pueden exhibir diferentes capacidades para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos. También, el origen de estas cepas podría ser un factor que influya en las características de biocontrol de las mismas, debido a que Bs1 fue aislada de hojas y Bs2 de la rizosfera de plantas de lima persa. Se ha demostrado en diversos estudios que cepas nativas del género *Bacillus*, aisladas de la rizósfera de diferentes cultivos, son capaces de generar un efecto antagónico en el desarrollo de agentes fitopatógenos (Balthazar *et al.*, 2022; Castañeda y Consuelo, 2016; Castillo *et al.*, 2015; Yan *et al.*, 2021).

Durante las pruebas de confrontación se observaron dos patrones de inhibición. En el primero (figura 17a), el crecimiento de los hongos fitopatógenos estuvo delimitado por el desarrollo de las cepas de *Bacillus*, de acuerdo a lo que puede ser una baja producción de metabolitos y al efecto de mecanismos de competencia por nutrientes y espacio, como lo reporta Chen *et al.*, (2020). El segundo patrón (figura 17b) fue la formación de un halo de inhibición, manifestando la posible producción de lipopéptidos como iturinas, fengicinas y surfactinas, que han sido identificadas en la zona de inhibición durante la confrontación de *Bacillus* spp. contra hongos filamentosos (Moreno *et al.*, 2021; Sajitha y Dev, 2016), y que de acuerdo con lo reportado por Chen *et al.* (2020), es la producción de sustancias microbianas el mecanismo de biocontrol más importante para este género.

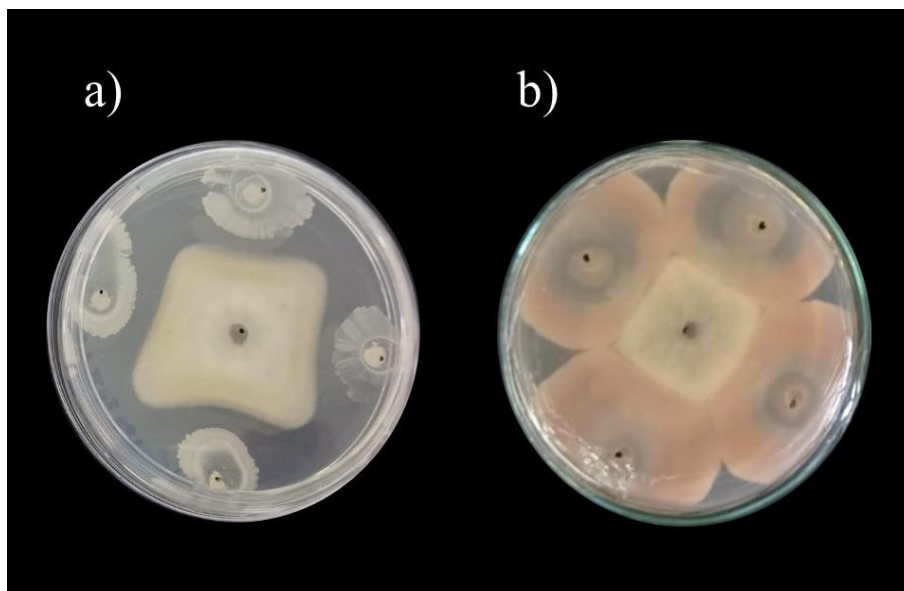


Figura 17. Patrones de inhibición en confrontaciones. a) Competencia por espacio y nutrientes), b) Producción de metabolitos microbianos (formación de halo de inhibición).

7.4. Evaluación de patogenicidad de los aislados

7.4.1. Prueba de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad realizadas en las plantas de lima persa, indicaron que las tres cepas aisladas e identificadas como *Lasiodiplodia* sp. son patógenos, ya que causaron los síntomas de enfermedad en las plantas, lográndose observar

los primeros síntomas de secreción de goma a los 4 días posteriores a la inoculación (figura 18A).



Figura 18. Patogenicidad en plantas de lima persa (*Citrus x Latifolia* Tan.). A, exudación de goma en plantas 4 días posteriores de la inoculación con *Lasiodiplodia* sp. B, Necrosis y aumento de gomosis en área cercanas a la inoculación. C, Daño necrótico interno de tejido vascular a las 12 semanas de la inoculación.

De acuerdo con la escala propuesta por Adu- Accheapong, (2009) la puntuación de severidad que se alcanzó en la semana cuatro posterior a la inoculación fue 3 (tabla 10), al presentarse secreción de goma, marchitamiento, clorosis y defoliación de las hojas cercanas a la lesión por la inoculación. Y en donde los tres tratamientos mostraron homogeneidad en la sintomatología expresada por las plantas durante el tiempo de evaluación. Para el caso de las semanas ocho y doce, se obtuvo una puntuación de 3-6 (tabla 10), en donde se observó clorosis y marchitamiento de las hojas, defoliación, y aumento en la secreción de goma de las plantas inoculadas. Aunado a esto, algunas plantas mostraron formación de

picnidios en los tallos enfermos y la necrosis de la lesión que se extendía hacia la parte superior e inferior del sitio de la inoculación (figura 18B); en contraste, los árboles testigos (T. Corte. A y control) y los inoculados con *Colletotrichum* sp.(Colle) no presentaron síntomas de enfermedad y se conservaron sanos.

Tabla 10. Escala de severidad por tratamientos

Tratamiento	Semana 4	Semana 8	Semana 12
Las1 (ZIM3)	3	3 – 6	3 - 6
Las2 (ZIIM1)	3	3 - 6	3 - 6
Las3 (ZIIM3)	3	3 – 6	3 – 6
Colle (ZIIM3)	1	1	1
T.Corte.A	1	1	1
Control	1	1	1

Lasiodiplodia sp. fue re-aislada e identificados, a partir de las plantas que fueron inoculadas y presentaron enfermedad. Por otra parte, de las plantas testigos (sanas) no se obtuvieron aislamientos, cumpliéndose así con los postulados de Koch's.

7.4.2. Virulencia de cepas aisladas

Después de las 12 semanas de la inoculación de las tres cepas aisladas de *Lasiodiplodia* sp. (Las1, Las2 y Las3) en plantas de lima persa, se pudo observar que estas provocaron lesiones necróticas en el tejido vascular de las plantas (figura 18C), siendo los valores de las medias de la lesión significativamente diferentes con respecto al control absoluto y control. De acuerdo a la comparación de medias de Tukey, los tres aislados no mostraron diferencia significativa en las lesiones provocadas en el tejido vascular de las plantas (Figura 19), lo que sugiere que el grado de virulencia de las cepas de *Lasiodiplodia* sp. es el mismo bajo las condiciones del presente estudio.

En contraparte, la cepa identificada como *Colletotrichum* sp., así como los testigos no mostraron tener un efecto adverso en el tejido interno de la planta.

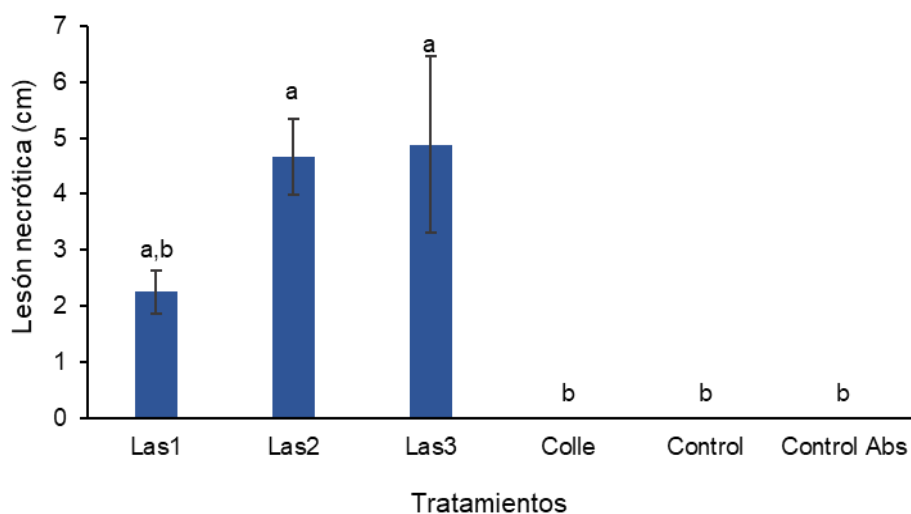


Figura 19. Virulencia de cuatro hongos aislados en lima persa (*Citrus x latifolia* Tan.) evaluadas como la longitud media de la lesión necrótica interna (cm). Los datos fueron tomados 12 semanas después de la inoculación de discos colonizados con micelio e insertados en tallos de árboles de lima persa. Las barras sobre las columnas son los errores estándar de las medias. Las columnas con letras iguales no son significativamente diferentes de acuerdo con la comparación de medias de Tukey ($P \leq 0.05$). Las1 (*Lasiodiplodia* sp. ZIM3); Las2 (*Lasiodiplodia* sp. ZIIM1); Las3 (*Lasiodiplodia* sp. ZIIM3); Control (Agar PDA estéril) y Control Abs (control absoluto).

Diversas especies del género *Lasiodiplodia* han sido asociadas por conducir a necrosis tisular interna de especies frutícolas al evaluarse la patogenicidad de estos patógenos en plantas, tal es el caso de Rodríguez-Gálves *et al.*, (2016) quién reportó a *Lasiodiplodia* sp. como una de las especies asociadas a muerte regresiva en mango, provocando lesiones necróticas internas en ramas. Mientras que, Contreras-Pérez *et al.*, (2019) asocia a *Lasiodiplodia* sp. como el agente causal de clorosis y necrosis en tallos de zarzamora. Para el caso específico de lima persa, en México se han aislado e identificado a las especies de *Lasiodiplodia* sp., *L. brasiliense*, *L. citrícola*, *L. iranienensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. subglobosa*, y *L. theobromae*; que, a su vez, han sido relacionados como los agentes causales

de la muerte descendente en árboles de lima persa. (Bautista *et al*, 2019; Valle-De la Paz *et al.*,2019). Por lo que los resultados de esta investigación coinciden con reportes previos en México y genera una visión clara del agente causal de muerte descendente en lima persa; enfermedad que ha sido mal identificada por productores y técnicos a nivel regional.

8. Conclusiones

El presente estudio evidenció escaso conocimiento de los productores en la identificación, manejo y control de plagas y enfermedades presentes en los huertos de lima persa, lo que influye de forma directa en los bajos rendimientos de la producción en la región (12.16 t/ha). Por otro lado, factores como la alta incidencia de adquisición de planta no certificada, la inadecuada desinfección de herramienta de poda, aunado a la poca capacitación y experiencia el manejo del cultivo de lima persa, destacaron como los detonantes de la incidencia de las enfermedades en las huertas. Destacando en todos los casos la presencia de “gomosis” en la región de estudio.

A partir de árboles de lima persa que presentaron síntomas característicos de gomosis en huertos ubicados en la región citrícola Joachín, se logró aislar a cuatro hongos fitopatógenos. Con base en las características morfológicas y caracterización molecular, se logró identificar a la cepa Colle (ZIIM3) como *Colletotrichum* sp. y a tres aislados Las1(ZIM3), Las2(ZIIM1) y Las3(ZIIM3) como *Lasiodiplodia* sp., siendo el primer reporte de presencia de este género en huertas de lima persa en la región de estudio. Así también, en cumpliendo con los postulados de Koch, se logró identificar que los tres aislados de *Lasiodiplodia* sp. fueron positivos para la prueba de patogenicidad en plantas de lima persa, provocando los mismos síntomas de la enfermedad de “gomosis” en condiciones de invernadero y presentar el mismo grado de virulencia en plantas, de las cuales, los microorganismos fueron re-aislados y se corroboró su identificación.

Lo que indica que una de las enfermedades más frecuentes en la región de estudio ha sido mal identificada y con ello, mal controlada por mucho tiempo, al atribuirle los síntomas de muerte descendente (*Lasiodiplodia* sp.) a gomosis (*Phytophthora* spp.). Por lo que el aislamiento e identificación del agente causal proveerá información de importancia para el manejo integrado de esta enfermedad en la zona de estudio.

Una alternativa de control biológico sobre la muerte descendente (*Lasiodiplodia* sp.) en lima persa, es el empleo de la cepa Bs1 y Bs2 identificadas como *Bacillus*

subtillis. Donde la cepa Bs2 obtuvo los porcentajes de inhibición *in vitro* más altos sobre las cepas Las1 y Las3 (*Lasiodiplodia* sp.), en un 66.69 y 61.78%, respectivamente. Mientras que Bs1 generó los valores más altos sobre las cepas Colle (*Colletotrichum* sp.) con un 46.6% y para Las2 (*Lasiodiplodia* sp.) en el 49.7%. Dando pauta a emplear estos microorganismos en futuras investigaciones en control biológico *in vivo* de los agentes causales de muerte descendente en lima persa.

9. Bibliografía

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Goltapeh, E. M., Zare, R., y Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of Lasiodiplodia from Iran. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 25, 1. <https://doi.org/10.3767/003158510X52415>
- Abraham, A. O., Laing, M. D., y Bower, J. P. (2010). Isolation and in vivo screening of yeast and Bacillus antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. *Biological Control*, 53(1), 32–38. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2009.12.009>
- Adesemoye, A. O., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Twizeyimana, M., Lynch, S. C. y Eskalen, A. (2014). Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Disease*. 98: 55-61. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0492-RE>
- Adu-Acheampong (2009). Lasiodiplodia theobromae as a causal pathogen of leaf blight, stem canker, and pod rot of *Theobroma cacao* in Malaysia. (Thesis de doctorado, Imperial College London). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13057-9>
- Almaguer-Vargas, G., y Ayala-Garay, A. V. (2014). Adopción de innovaciones en limón “Persa” (*Citrus latifolia* tan.) en Tlapacoyan, Veracruz: Uso de bitácora. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 20(1), 89–100. <https://doi.org/10.5154/R.RCHSH.2010.10.076>
- Álvarez, M. G. (1976). Primer catálogo de enfermedades de plantas mexicanas. *Fotófilo*, 29 (71), 7-169. <https://biblat.unam.mx/es/revista/fitofilo>
- Aranda, F.J., Teruel, J.A, y Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1713:51-56. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Ayón, C. B. C., Esquivel, G. L., Velasco, C. R., Virgen, O. E., Aranguré, A. B. y Campos, O. J. C. (2020). Evaluación in vitro de antagonistas contra patógenos de fruto de guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México.

Revista Brasileira De Fruticultura. 42(2):1-5. <https://doi.org/10.1590/0100-29452020147>

- Balthazar, C., Novinscak, A., Cantin, G., Joly, D. L., y Filion, M. (2022). Biocontrol Activity of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. Against *Botrytis cinerea* and Other Cannabis Fungal Pathogens. *Phytopathology* 112(3):549-560. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-21-0128-R>
- Barbedo, J. G. A. (2018). Factors influencing the use of deep learning for plant disease recognition. *Biosystems Engineering*, 172, 84–91. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMSENG.2018.05.013>
- Bautista-Cruz, M. A., Almaguer-Vargas, G., bau-Mir, S. G., Colinas-Léon, 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/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-06-18-1036-RE_F5.JPEG
- Berdeja-Arbeu, R., L. Aguilar-Mendez, D. Moreno-Velázquez, G. Vázquez-Huerta, A. Ibáñez-Martínez y R. Ontiveros.Caburata. (2016). Calidad de fruta de lima ‘Persa’ en diferentes portainjertos en Veracruz, México. *Acta Agríc. Pecu.* 2(1), 17-22.
- Bowman, K. D., y Joubert, J. (2020). Citrus rootstocks. En: Talon, M., Caruso, M. y Gmitter, F. Jr. (Eds.), *The Genus Citrus* (pp.105–127). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00006-1>
- Campbell, C. W. (1991). Rootstocks for the “Tahiti” Lime. Proceedings of the Florida State. *Horticultural Society*. 104, 28–30. <https://journals.flvc.org/fshs/article/view/104740>
- Cantuarias-Avilés, T., Mourão Filho, F. de A. A., Stuchi, E. S., da Silva, S. R., Espinoza-Núñez, E., y Neto, H. B. (2012). Rootstocks for high fruit yield and quality of ‘Tahiti’ lime under rain-fed conditions. *Scientia Horticulturae*, 142, 105–111. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2012.05.008>

- Cantuarias-Avilés, T., Mourão Filho, F. de A. A., Stuchi, E. S., Silva, S. R. da, y Espinoza-Núñez, E. (2010). Tree performance and fruit yield and quality of 'Okitsu' Satsuma mandarin grafted on 12 rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 123(3), 318–322. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2009.09.020>
- Carbone, I., y Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553–556. doi:10.1080/00275514.1999.12061051
- Castañeda, A. E. y Consuelo, S. L. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 13(26):53-65.
- Castillo, F., Hernández, F. D., Gallegos, G., Flores, A., Rodríguez, R. y Aguilar, C. N. (2015). Efectividad in vitro de Bacillus y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(3):549-562.
- Castle, W. S., Bowman, K. D., Baldwin, J. C., Grosser, J. W., y Gmitter, F. G. (2011). Rootstocks Affect Tree Growth, Yield, and Juice Quality of 'Marsh' Grapefruit. *HortScience*, 46(6), 841–848. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.46.6.841>
- Chaur T. (1998). General mechanisms of action of microbial biocontrol agents. *Plant Pathology Bulletin*, 7:155- 166. <http://140.112.183.156/pdf/07-4/7-4-1.pdf>
- Chien, C., y Chu, Y., (1996): Biological control of citrus psyllid, *Diaphorina citri* in Taiwan. *Inter. J. Pest Mgt.* 34: 93-105.
- Chukeatirote, E., Niraphai, K., Sardsud, U. y Popluechai, S. (2018). Identification of antagonistic bacteria isolated from Thai fermented soybean (Thua Nao) for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 53(1):19-28. <https://doi.org/10.1556/038.53.2018.004>

- Chulze, S.N. (2023). Biocontrol agents based on microorganisms to reduce the impact of pathogen and toxigenic fungi. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(1): 1-2. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.02.001>
- Contreras-Pérez, M., Santoyo-Pizano, G., de los Santos-Villalobos, S., Gutiérrez-García, M.A, Orozco-Mosqueda, M.C y Rocha-Granados, M.C. (2019). First report of Lasiodiplodia on blackberry plants (*Rubus subgenus Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3): 479-485 doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1905-4
- Curk, F., Ollitrault, F., Garcia-Lor, A., Luro, F., Navarro, L y Ollitrault, P. (2016). Phylogenetic origin of limes and lemons revealed by cytoplasmic and nuclear markers. *Ann. Bot*, 117(4), 565–583. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw005>
- Curti-Díaz, S. A., Hernández-Guerra, C., y Loreda-Salazar, R. X. (2012). Productividad del limón “Persa” injertado en cuatro portainjertos en una huerta comercial de Veracruz, México. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 18(3), 291–305. <https://doi.org/10.5154/R.RCHSH.2010.11.109>
- Curti-Díaz, S. A., Loreda-Salazar, X., Díaz-Zorrilla, U., Sandoval, J.A. y Hernández, H. (2000). Tecnología para producir limón Persa. INIFAP-CIRGOC. Campo experimental Ixtacuaco. Libro Técnico Núm. 8. Veracruz, México. 144p.
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., y Sharon, A. (2017). Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/MICROBIOLSPEC.FUNK-0023-2016>
- Espinoza, C. A., Gallegos, G., Hernández, F., Ochoa, Y., Cepeda, M. y Castillo, F. (2019). Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 6(16):45-55. <https://doi.org/10.19136/era.a6n16.1843>.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M. E., Rubio, L. y Candela, M.E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología*, (26):69-78.

- Flores, H. H., Flores, G. J., Varela, F.S., Pérez, R, Amado, A. D & Monteon, A. (2021). Reporte de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. en árboles cítricos de Tamaulipas. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 12(3), 499–511. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2640>
- Franco, V. A. M., Caamal, C., Pat, F y Pérez, S. F. (2021). Characterization of Persian lime production (*Citrus x latifolia*; Tanaka ex Q. Jiménez). *Agro Productividad*. <https://doi.org/10.32854/agrop.v14i11.1883>
- Franco-Valderrama, A.M., Caamal-Cauich, I., Pat-Fernández, V.G y Ramírez-Hernández J.J. (2022). Sustentabilidad del sistema de producción de limón persa en Martínez de la Torre, Veracruz. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo* <https://doi.org/10.22231/asyd.v19i2.1376>
- García-Muñoz, M. C., Henao-Rojas, J. C., Moreno-Rodríguez, J. M., Botina-Azain, B. L y Romero-Barrera, Y. (2021). Effect of rootstock and environmental factors on fruit quality of Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) grown in tropical regions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103, 104081. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2021.104081>
- Gerson, U. (2003). Acarine pests of citrus: overview and non-chemical control. *Systematic and Applied Acarology*, 8(0), 3–12. <https://doi.org/10.11158/SAA.8.1.1>
- Glass, N. L., y 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(4), 1323. <https://doi.org/10.1128/AEM.61.4.1323-1330.1995>
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M & Mercado-Flores, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 25, e520. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Hassanzadeh, K. H., Rastegar, S., Golein, B., Golmohammadi, M y Aboutalebi J. A. (2019). Effect of rootstock on vegetative growth and mineral elements in

scion of different Persian lime (*Citrus latifolia* Tanaka) genotypes. *Scientia Horticulturae*, 246, 136–145. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2018.10.066>

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2010. Compendio de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, Tierra Blanca, Veracruz de Ignacio de la Llave. https://www.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/30/30174.pdf (Recuperado: 02 de febrero 2023).

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2019. Encuesta Nacional Agropecuaria 2019. <https://www.inegi.org.mx/programas/ena/2019/> (recuperado: 27 de abril 2023)

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). Cuéntame de México. <https://cuentame.inegi.org.mx/poblacion/migracion.aspx?tema=P> (recuperado: 27 de abril 2023)

Intrigliolo, F. y Rocuzzo, G. (2011). Modern trends of Citrus pruning in Italy. *Advances in Horticultural Science*, 25(3), 187–192. <http://www.jstor.org/stable/42882836>

Jackson, L.K. 1991. Citrus growing in Florida. University of Florida Press, Department of fruit crops, IFAS. 293p.

Li, Z., Wang, Y.T., Gao, L., Wang, F., Ye, J.L., y Li, G.H. (2014). Biochemical changes and defence responses during the development of peach gummosis caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1), 195–207. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0322-4>

Lima, J.S., Moreira, R.C., Cardoso, J.E., Martins, M.V.V., y Viana, F.M.P. (2013). Caracterização cultural, morfológica e patogênica de *Lasiodiplodia theobromae* associado a frutíferas tropicais. *Summa Phytopathol.*, 39(2): 81-88. doi: 10.1590/S0100-54052013000200001

Martínez, M., Beltrán, H. y Orduz-Rodríguez. (2020). Generalidades del cultivo, descripción botánica, variedades y fenología de la lima ácida Tahití. En: Castillo, A. M. y Gaona, N. (Eds.) Modelo productivo de lima ácida Tahití

- (*Citrus × latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez) para Colombia. (pp. 25-41) AGROSAVIA. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.model.7403435>
- Mattos, D., Jr., Kadyampakeni, D. M., Oliver, A. Q., Boaretto, R. M., Morgan, K. T. y Quaggio, J. A. (2020). Soil and nutrition interactions. En: Talon, M., Caruso, M. y Gmitter, F. Jr. (Eds.), *The Genus Citrus* (pp. 328–349). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00015-2>
- McDonald, V., y Eskalen, A. (2011). Botryosphaeriaceae Species Associated with Avocado Branch Cankers in California. *Plant Disease*, 95(11), 1465–1473. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0136>
- Miljaković, D., Marinković, J. ve Balešević-Tubić, S. (2020). The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*, 8(7), 1037. doi:10.3390/microorganisms8071037
- Missouri Botanical Garden. (2023). *Citrus × latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez. <http://www.tropicos.org/Name/100384167> (recuperado: 27 de abril 2023).
- Moreira-Morrillo, A. A., Cedeño-Moreira, Á. v., Canchignia-Martínez, F y Garcés-Fiallos, F. R. (2021). *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maul [(sin.) Botryodiplodia theobromae Pat] en el cultivo de cacao: síntomas, ciclo biológico y estrategias de manejo. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653–662. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2021.068>
- Moreno, C. A., Ongena, M. y Cotes, A. M. (2021). Effects of Fengycins and Iturins on *Fusarium oxysporum* f. sp. physali and Root Colonization by *Bacillus velezensis* Bs006 Protect Golden Berry Against Vascular Wilt. *Phytopathology* 111(12):2227-2237. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-21-0001-R>
- Murcia, R. N., Betancourt, V. M, Pérez, A.L., Rodríguez, M. D., Ríos, R.L., Pisco, O. C y Martínez, M. (2020). Principales enfermedades en el cultivo de lima ácida Tahití. En: Castillo, A.M. y Gaona, L. G. (Eds.) Modelo productivo de lima ácida Tahití (*Citrus × latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez) para Colombia (pp. 257-312). AGROSAVIA. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.model.7403435>

- Mussi-Dias, V. y Santos, A. y Freire, M.D. G. (2016). Pycnidia and conidia quantification of *Lasiodiplodia* using a culture medium enriched with sugarcane bagasse. *Journal Of Agricultural And Research*. 2. 1-16. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:90991490>
- Oke, M. O., Sobratee, N., & Workneh, T. S. (2013). Integrated pre-and postharvest management processes affecting fruit and vegetable quality. *Stewart Postharvest Review*, 9(3). <https://doi.org/10.2212/SPR.2013.3.6>
- Ollitrault, P., Curk, F., y Krueger, R. (2020). Citrus taxonomy. En: Talon, M., Caruso, M. y Gmitter, F. Jr. (Eds.), *The Genus Citrus* (pp. 57–81). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00004-8>
- Orozco, S. M., Robles, G. M., Velázquez, M. J. J., Manzanilla, R. M. A., Hernández, F. L. M., Manzo, S. G. y Nieto, A. D. (2013). Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades en limón mexicano y limón persa. *Memorias IX Simposio Internacional Citrícola*. 113-171 pp
- Orozco-Santos, M. (1995). Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo de México. México 150 pp.
- Pal, K.K., Scholar, V.F. y Gardener, B.B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.
- Partida, Z. M. E., y Meza, R. E. (2017). La competitividad y la productividad del limón persa en Nayarit (México). *Cuadernos Del Claeh*, 36(105), 127–140. <https://doi.org/10.29192/CLAEH.36.1.6>
- Pathania, S. y Singh, H. (2021). Evaluation and prediction of salinity tolerance behavior of citrus rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 289, 110422. <https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2021.110422>
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. y 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. y Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 54-74
https://www.rmf.smf.org.mx/Contenido_Vol_33_1_2015.html
- Pitt, J.I. y Hocking, A.D. (2009). Primary Keys and Miscellaneous Fungi. En: Fungi and Food Spoilage. Springer, Boston, MA. pp 53–143.
https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2_5
- Ploetz, R. C., Thomas, J. E. y Slabaugh, W. R. (2003). Diseases of banana and plantain En: Diseases of Tropical Fruit Crops. CABI Publishing. Wallingford, UK. pp 76-77. <https://doi.org/10.1079/9780851993904.0073>
- Polanco, F. L. G., Alvarado, G. O. G., Pérez, G. O., González, G. R. y Olivares, S. E. (2019). Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 757-764. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>
- Rabbee, M.F., Ali, M.S., Choi, J., Hwang, B.S., Jeong, S.C. y Baek, K.H. (2019). *Bacillus velezensis*: A Valuable Member of Bioactive Molecules within Plant Microbiomes. *Molecules*, 24(6), 1046.
<https://doi.org/10.3390/molecules24061046>
- Raddatz-Mota, D., Franco-Mora, O., Mendoza-Espinoza, J. A., Rodríguez-Verástegui, L. L., Díaz de León-Sánchez, F., y Rivera-Cabrera, F. (2019). Effect of different rootstocks on Persian lime (*Citrus latifolia* T.) postharvest quality. *Scientia Horticulturae*, 257, 108716.
<https://doi.org/10.1016/J.SCIENTA.2019.108716>
- Rocha-Peña, M.A. y Padrón-Chávez, J.E. (2009). El cultivo de los cítricos en el estado de Nuevo León. Libro Científico No. 1. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. CIRNE. Campo Experimental General Terán. México
- Rodríguez-Gálvez, E., Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P. W., y Alves, A. (2017). Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with

- dieback of mango in Peru. *Fungal Biology*, 121(4), 452–465.
<https://doi.org/10.1016/J.FUNBIO.2016.06.004>
- Rojas, B. M. M., Sánchez, C. D., Rosales, P.K. y Lugo, M. D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas. *Revista de Protección Vegetal*, 32(2), 00.
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522017000200005&lng=es&tlng=es.
- Romero, P., Navarro, J. M., Pérez-Pérez, J., García-Sánchez, F., Gómez-Gómez, A., Porras, I., Martínez, V. y Botía, P. (2006). Deficit irrigation and rootstock: their effects on water relations, vegetative development, yield, fruit quality and mineral nutrition of *Clemenules mandarin*. *Tree Physiology*, 26(12), 1537–1548. <https://doi.org/10.1093/TREEPHYS/26.12.1537>
- Saha, A., Mandal, P., Dasgupta, S., y Saha, D. (2008). Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and sporulation of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. *Journal of Environmental Biology*, 29(3), 407–410. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18972700/>
- Sajitha, K. L. y Dev, S. A. (2016). Quantification of antifungal lipopeptide gene expression levels in *Bacillus subtilis* B1 during antagonism against sapstain fungus on rubberwood. *Biological Control*. 96:78-85.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2016.02.007>
- Sajitha, K. L., Maria, E. J. y Dev, S. A. 2014. Screening of bacterial biocontrols against sapstain fungus (*Lasiodiplodia theobromae* Pat.) of rubberwood (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.). *Research in Microbiology* 165(7):541-548.
<https://doi.org/10.1016/J.RESMIC.2014.07.002>
- Schwentesi, R. R., y Gómez, C. M. Á. (2005). Limón persa. Tendencias en el mercado mexicano. (Primera). Universidad Autónoma Chapingo. 158pp.
<http://repositorio.chapingo.edu.mx:8080/handle/20.500.12098/319>

- Shafi, J., Tian, H., y Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446–459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shahbaz, M., Iqbal, Z., Sallem, A. y Anjum, M.A. (2009). Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.). *Pakistan Journal of Botany* 41:359-368. <http://www.pakbs.org/pjbot/>
- Shine, M. B., Xiao, X., Kachroo, P. y Kachroo, A. (2019). Signaling mechanisms underlying systemic acquired resistance to microbial pathogens. *Plant Science*, 279, 81–86. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2018.01.001>
- Shurtleff, M.C. y Averre, C.W. (1997). *Glossary of Plant Pathological Terms*. APS Press, St. Paul, MN.
- SIEGVER (Sistema de Información Estadística y Geográfica del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave). 2021. http://ceieg.veracruz.gob.mx/wp-content/uploads/sites/21/2021/06/TIERRA-BLANCA_2021.pdf (Recuperado: 02 de febrero 2023)
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). (2023). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera. (SIAP). (2022). Panorama Nacional agroalimentario 2022. Fecha de consulta 08 de septiembre de 2023. https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2022/Panorama-Agroalimentario-2022.
- Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A. J. L., Groenewald, J. Z., Lombard, L., Wingfield, M. J., Postma, A., Burgess, T., y Crous, P. W. (2013). Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology*, 76(1), 31. <https://doi.org/10.3114/SIM0020>
- Talibi, I., Boubaker, H., Boudyach, E. H., y Ait Ben Aoumar, A. (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *Journal of Applied Microbiology*, 117(1), 1–17. <https://doi.org/10.1111/JAM.12495>

- Urbaneja, A., Grout, T. G., Gravena, S., Wu, F., Cen, Y. y Stansly, P. A. (2020). Citrus pests in a global world. En: Talon, M., Caruso, M. y Gmitter, F. Jr. (Eds.), *The Genus Citrus* (pp. 333–348). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00016-4>
- Úrbez-Torres, J. R., Peduto, F., Vossen, P. M., Krueger, W. H., y Gubler, W. D. (2013). Olive Twig and Branch Dieback: Etiology, Incidence, and Distribution in California. *Plant Disease*, 97(2), 231–244. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0390-RE>
- Valenzuela, V., Gálvez, G. T., Villa, E. D., Parra, F. I., Santoyo, G. y Santos, S. 2020. Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus*: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas* 11(2):419-432. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i2.2191>
- Valle-de la Paz, M., Guillén-Sánchez, D., Gijón-Hernández, A. R., Alía-Tejacal, I., López-Martínez, V., Juárez-López, P., Martínez-Fernández, E., Hernández-Arenas, M. y Ariza-Flores, R. (2019). Species of *Lasiodiplodia* in lima ‘Persa’ (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México. *Revista Bio Ciencias* 6, e595. doi: <https://doi.org/10.15741/REVBIO.06.e595>
- Van, L. T., Van, N. P., Vanholme, B., Dermauw, W., Nauen, R., & Tirry, L. (2011). Parallel evolution of cytochrome b mediated bifentazate resistance in the citrus red mite *Panonychus citri*. *Insect Molecular Biology*, 20(1), 135–140. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2583.2010.01040.X>
- Varela, F.S.E., Orozco, S.M., Torres, A.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. 428 p.
- Vásquez-López, A., Mora-Aguilera J. A., Cárdenas-Soriano E. y Téliz-Ortiz D. (2009). Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn] en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia*, 43, 717-728. <https://agrocienciacolpos.org/index.php/agrociencia/article/view/756>

- Viera-Arroyo, W.F., Tello-Torres, C.M., Martínez-Salinas, A.A., Navia-Santillán, D.F., Medina-Rivera, L.A., Delgado-Párraga, A.G., Perdomo-Quispe, C.E., Pincay-Verdezoto, A.K., Báez-Cevallos, F.J., Vásquez-Castillo, W. y Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128-149. DOI: 10.36610/j.jsab.2020.080200128
- Villarreal-Delgado, M.F., Villa-Rodríguez, E.D., Cira-Chávez, L.A., Estrada-Alvarado, M.I., Parra-Cota, F.I., De los Santos-Villalobos, S. (2017). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-5
- Vincent, C., Morillon, R., Arbona, V. y Gómez-Cadenas, A. (2020). Citrus in changing environments. En: Talon, M., Caruso, M. y Gmitter, F. Jr. (Eds.), *The Genus Citrus* (pp. 271–289). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812163-4.00013-9>
- Vinchira-Villarraga, D. M. y Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1), 2-5. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v21n1.80860>
- Wei, J., Zhao, J., Suo, M., Wu, H., Zhao, M. y Yang, H. 2023. Biocontrol mechanisms of *Bacillus velezensis* against *Fusarium oxysporum* from Panax ginseng. *Biological Control*. 182, 105222. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2023.105222>
- White, T.J (1990) Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications, 315-322
- Yan, H., Qiu, Y., Yang, S., Wang, Y., Wang, K., Jiang, L., et al. 2021. Antagonistic activity of *Bacillus velezensis* SDTB038 against *Phytophthora infestans* in potato. *Plant Disease* 105(6):1738-1747. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1666-RE>

- Zhang, R. S., Wang, F. G., Qi, Z. Q., Qiao, J. Q., Du, Y., Yu, J. J., Yu, M. N., Liang, D., Song, T. Q., Yan, P. X., Cao, H. J., Zhang, H. y Liu, Y. F. (2022). Iturins produced by *Bacillus velezensis* Jt84 play a key role in the biocontrol of rice blast disease. *Biological Control*, 174, 105001. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2022.105001>
- Zhang, X., Xun, Y. y Chen, Y. (2022). Automated identification of citrus diseases in orchards using deep learning. *Biosystems Engineering*, 223, 249–258. <https://doi.org/10.1016/J.BIOSYSTEMSENG.2022.09.006>
- Zhu, L., Zhang, W., Li, G., Sun, Q. Z., Wang, J. J., Smagghe, G., & Jiang, H. B. (2019). Molecular characterization of ecdysis triggering hormone and its receptor in citrus red mite (*Panonychus citri*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 230, 100–105. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2019.01.003>

10. Anexos

10.1. Anexo 1. Cuestionario



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico Superior de Tierra Blanca
Maestría en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología



Encuesta a productores de limón persa

CUESTIONARIO PARA PRODUCTORES

Este cuestionario tiene como objetivo conocer el manejo del cultivo de lima persa en la región, así como identificar las principales plagas y enfermedades presentes en la zona de estudio. Cabe señalar que todos los datos que se proporcionen tienen carácter confidencial y solo servirán para obtener conclusiones relativas a la investigación que se realiza como parte del proyecto de investigación "Especies de *Bacillus* como alternativa de control biológico contra el agente causal de la gomosis en lima persa (*Citrus x latifolia* Tanaka) de la región citrícola Joachín, Ver."

Fecha:	Nombre del productor:
Edad:	Sexo:
Lugar:	Coordenadas:
Superficie sembrada:	Rendimiento:
Edad del cultivo:	

Instrucción: marque la opción que corresponda, según la información obtenida.

1. Pertenecer a alguna cooperativa u organización de producción de limón persa.

Sí No Cual: _____

2. Experiencia en el cultivo de limón persa.

Sí No Tiempo: _____

3. Cuenta con asesoría técnica para el manejo del cultivo.

Sí No

4. Las plantas fueron adquiridas en invernaderos certificados.

Sí No



Encuesta a productores de limón persa

5. Cuál portainjerto fue adquirido para el cultivo:

- L. Volkameriana Cintrange Troyer Lima Rangpur Mandarino Cleopatra
 L. macrofila Cintrange Carrizo Limón Rugoso Naranja Trifoliado
 Naranja agrio Citrumelo Swingle Mandarino Amblycarpa Otro: _____

6. Labores culturales que realiza.

- Podas Fertilización Riego
 Prevención de enfermedades Prevención de plagas Otras: _____

7. Tipos de poda que realiza.

- Poda de Formación Etapa de desarrollo Etapa de producción
 Mantenimiento Podas laterales Otra: _____

8. Realiza la desinfección de herramientas empleadas en poda.

- Si No

9. Método de riego empleado en el cultivo.

- Riego localizado Riego por goteo Riego por microaspersión
 Otro: _____

10. Origen del agua de riego.

- Agua potable Pozo profundo Canal de riego
 Otro: _____



Encuesta a productores de limón persa

11. Realiza el control en la dosificación de los productos químicos al emplearlos en el control de plagas, enfermedades y malezas.

- Si No

12. Cuáles son las plagas que afectan el cultivo de limón persa en el huerto

- | | | |
|---------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Pulgones | <input type="checkbox"/> Minador de hoja | <input type="checkbox"/> Escama de nieve |
| <input type="checkbox"/> Ácaro blanco | <input type="checkbox"/> Diaforinas | <input type="checkbox"/> Araña roja |
| <input type="checkbox"/> Trips | <input type="checkbox"/> Hormigas | Otra _____ |

13. Cuál es la plaga más significativa.

- | | | |
|---------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Pulgones | <input type="checkbox"/> Minador de hoja | <input type="checkbox"/> Escama de nieve |
| <input type="checkbox"/> Ácaro blanco | <input type="checkbox"/> Diaforinas | <input type="checkbox"/> Araña roja |
| <input type="checkbox"/> Trips | <input type="checkbox"/> Hormigas | Otra _____ |

14. Como realiza el manejo y control de esta(s) plaga (s).

- Control químico Control biológico Ninguno

15. Época del año en la que se presenta la plaga.

- Primavera Verano Otoño Invierno

16. Enfermedades comunes que afectan el cultivo de limón persa en el huerto.

- | | | | |
|----------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Gomosis | <input type="checkbox"/> Melanosis | <input type="checkbox"/> Fumagina | <input type="checkbox"/> Exocortis |
| <input type="checkbox"/> Huanglongbing (HLB) | <input type="checkbox"/> Antracnosis | <input type="checkbox"/> Virus de la tristeza (VTC) | <input type="checkbox"/> Caquexia o xiloporosis |
| <input type="checkbox"/> Mancha grasienta | <input type="checkbox"/> Roña o sarna | <input type="checkbox"/> Psorosis | Otra: _____ |



Encuesta a productores de limón persa

17. Qué enfermedad es la más significativa.

- | | | | |
|----------------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Gomosis | <input type="checkbox"/> Melanosis | <input type="checkbox"/> Fumagina | <input type="checkbox"/> Exocortis |
| <input type="checkbox"/> Huanglongbing (HLB) | <input type="checkbox"/> Antracnosis | <input type="checkbox"/> Virus de la tristeza (VTC) | <input type="checkbox"/> Caquexia o xiloporosis |
| <input type="checkbox"/> Mancha grasienta | <input type="checkbox"/> Roña o sarna | <input type="checkbox"/> Psorosis | Otra: _____ |

18. Época del año en la que se presenta la enfermedad.

- | | | | |
|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Primavera | <input type="checkbox"/> Verano | <input type="checkbox"/> Otoño | <input type="checkbox"/> Invierno |
|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|

19.Cuál es el manejo que le da a las enfermedades.

- | | | |
|------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Control químico | <input type="checkbox"/> Control biológico | <input type="checkbox"/> Ninguno |
|------------------------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|

20. Cómo afecta esta enfermedad en su cultivo.

- | | | |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Disminuye la producción | <input type="checkbox"/> Calidad del fruto | <input type="checkbox"/> Daño en planta |
| <input type="checkbox"/> Muerte de la planta | Otro: _____ | |




21. Los métodos de control de enfermedades que se han empleados son efectivos.

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Sí | <input type="checkbox"/> No |
|-----------------------------|-----------------------------|

22. El conocimiento del productor en enfermedades y plagas del cultivo se considera:

- | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Bueno | <input type="checkbox"/> Regular | <input type="checkbox"/> Malo |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|

10.2. Anexo 2. Escala de severidad

Referencia Fotográfica	Escala (1-9)	Daño en hojas y tallo
	1	Planta sin síntomas
	3	Clorosis y marchitez de hojas más bajas (cercanas a la lesión por inoculación) y ligera exudación de goma observable.
	6	Follaje 1/2 marchito 1/2 verde, defoliación y aumento de secreción de goma.
	9	Hojas y tallo muertos, defoliación total, no se observa tejido verde.