

TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

CAMPUS

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD VICTORIA

PROGRAMA

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA

TESIS

**MUERTE DESCENDENTE EN ÁRBOLES DE CÍTRICOS CAUSADO POR
HONGOS FITOPATÓGENOS Y *Candidatus liberibacter* ASIATICUS EN LA
ZONA CENTRO DE TAMAULIPAS**

PRESENTA

HÉCTOR FLORES HERNÁNDEZ

**PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA**

DIRECTOR

DR. JUAN FLORES GRACIA

CD. VICTORIA, TAMAULIPAS

ENERO DE 2023

Blvd. Emilio Portes Gil No. 1301, Cd. Victoria, Tamaulipas, México.

Tel. 01 (834) 1532000, Ext. 305 Depto. Ing. Química y Bioquímica

www.tecnm.mx | www.itvictoria.edu.mx





ASUNTO: Carta de Autorización

DR. AUSENCIO AZUARA DOMÍNGUEZ

Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación

Presente

At'n: DR. JOSÉ ANTONIO RANGEL LUCVIO

Coordinador Doctorado en Ciencias en Biología

Los numerales 2.15.4 y 2.15.5 de los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el TecNM (2018), establecen los requisitos para la obtención del examen de grado de Doctorado en Ciencias. En tal sentido, el H. Comité Tutorial del C. **Héctor Flores Hernández**, estudiante del programa de Doctorado en Ciencias en Biología, con No. de control **G-16381083**, después de haber realizado la revisión del contenido y formato de la tesis: **"Muerte descendente en árboles de cítricos causada por hongos fitopatógenos y Candidatus liberibacter asiaticus en la zona centro de Tamaulipas"**, tiene a bien emitir su **APROBACIÓN** a fin de continuar el proceso de obtención del grado académico correspondiente.

Por ese motivo se le pide a Usted, autorizar al C. Flores Hernández la impresión y reproducción electrónica de la tesis *in comento*.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica
"Verdad, Honestidad y Servicio"

Dr. Juan Flores Gracia
Director

Dr. Ausencio Azuara Domínguez
Co-Director

Dr. Sóstenes Edmundo Varela Fuentes
Vocal

Dr. Jesús García Jiménez
Vocal

Dr. Gonzalo Cueva Guerrero
Vocal

ccp.- Expediente de MC Juan Flores Hernández. Presente.
ccp.- Archivo. DEPI. ITC Victoria.



Bvld. Emilio Portes Gil No. 1301, Cd. Victoria, Tamaulipas.
01 (834) 153-2000, Ext. 180
e-mail: dir_cd victoria@tecnm.mx
www.tecnm.mx | cdvictoria.tecnm.mx





Instituto Tecnológico de Cd. Victoria
División de Estudios de Posgrado e Investigación
Coordinación de Doctorado en Ciencias en Biología

Ciudad Victoria, Tam. 26/09/2022

DEPENDENCIA: DEPI
No. de oficio: 154/2022

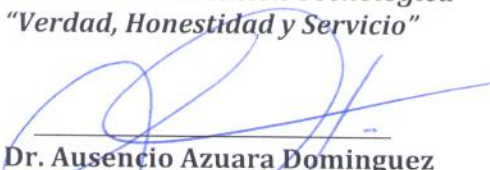
ASUNTO: Autorización de impresión de tesis

C. Héctor Flores Hernández
Estudiante de Doctorado en Ciencias en Biología
No. de control: G-16381083
Presente

Conforme a los numerales 2.15.4 y 2.15.5 de los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado en el TecNM (ver. 2018) y por recomendación del H. Comité Tutorial, esta división le **AUTORIZA** imprimir y reproducir digitalmente la Tesis: **"Muerte descendente en árboles de cítricos causada por hongos fitopatógenos y Candidatus liberibacter asiaticus en la zona centro de Tamaulipas"**, que tuvo a bien desarrollar en la División de Estudios de Posgrado e Investigación de este instituto.

Ruego a Usted dar puntual seguimiento al formato en vigor que, para tal caso, indica las características de diseño que deberá contener tan importante documento.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica
"Verdad, Honestidad y Servicio"


Dr. Ausencio Azuara Domínguez
Jefe de la División de Estudios de Posgrado
e Investigación



ccp.- Dr. Edgar Pérez Arriaga. Coordinador del programa de Doctorado en Ciencias en Biología. ITC Victoria. Presente.
ccp.- Expediente del estudiante. Presente.
ccp.- Archivo DEPI. ITC Victoria.



Blvd. Emilio Portes Gil No. 1301, Cd. Victoria, Tamaulipas Tel. 01 (834) 153-2000, Ext. 180
e-mail: dir_cd victoria@tecnm.mx | tecnm.mx | cdvictoria.tecnm.mx





EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO

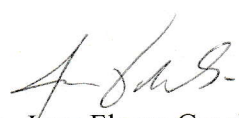
Instituto Tecnológico de Cd. Victoria
Subdirección de Planeación y Vinculación
Departamento de Comunicación y Difusión

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Tecnológico Nacional de México, campus Instituto Tecnológico de Cd Victoria, el que suscribe, **Héctor Flores Hernández** como estudiante de **Doctorado en Ciencias en Biología de esta institución**. Con numero de control G-16381083, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas o académicas de procedencia nacional o internacional, que deriven del trabajo de investigación que realicé bajo la dirección del Profesor **Dr. Juan Flores Gracia**. Por tal motivo, OTORGO LOS DERECHOS DE AUTORÍA DE MI TESIS, "**Muerte descendente en árboles de cítricos causado por hongos fitopatógenos y *Candidatus liberibacter asiaticus* en la zona centro de Tamaulipas**", y de LOS PRODUCTOS DE DICHA INVESTIGACIÓN al Instituto Tecnológico de Cd Victoria. Las patentes y secretos industriales que deriven de la tesis serán registradas a nombre del Tecnológico Nacional de México- Instituto Tecnológico de Cd Victoria y las regalías económicas distribuidas equitativamente entre la institución, el director de la tesis y quien suscribe, de acuerdo con las negociaciones entre las tres partes. También, ME COMPROMETO A NO REALIZAR NINGUNA ACCION que dañe el proceso de aprovechamiento comercial de dichos productos a favor de ésta misma Institución.

Cd Victoria, Tamaulipas México, a 20 de enero de 2023.


Héctor Flores Hernández
Estudiante


Dr. Juan Flores Gracia
Director de Tesis
Vo. Bo



Blvd. Emilio Portes Gil No. 1301, Cd. Victoria, Tamaulipas Tel. 01 (834) 153-2000, Ext. 180
e-mail: dir_cd victoria@tecnm.mx tecnm.mx | cdvictoria.tecnm.mx



2022 *Ricardo Flores*
Año de Magón
PERCEPCIÓN DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA

INDICE

INDICE.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE CUADROS.....	IV
Resumen	V
Abstract	VI
1. INTRODUCCION.....	- 1 -
2. OBJETIVOS.....	- 3 -
2.1 Objetivo general	- 3 -
2.2 Objetivos específicos	- 3 -
3. ANTECEDENTES	- 4 -
3.1 Principales variedades de cítricos en Tamaulipas	- 4 -
3.2 Hongos asociados a daños y muerte descendente en cítricos.....	- 4 -
3.3 Taxonomía de los hongos fitopatógenos.	- 6 -
3.4 Sintomatología de la enfermedad en otros cultivares	- 6 -
3.5 Los hongos endófitos en árboles frutales y su relación con hongos fitopatógenos.	- 8 -
3.6 Factores climáticos y formas de diseminación del hongo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> ..	- 12 -
3.7 El Huanglongbing (HLB).....	- 13 -
3.8 Grado de susceptibilidad a las enfermedades entre los cítricos.	- 14 -
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 15 -
4.1 Sitio de estudio.....	- 15 -
4.2 Aislamiento, caracterización morfológica y molecular de hongos fitopatógenos	- 17 -
4.2.1 Colecta de muestras vegetales.	- 17 -
4.2.2. Aislamiento de los patógenos.....	- 18 -
4.2.3 Siembra de muestras vegetales en medio de cultivo.....	- 18 -
4.2.4 Identificación taxonómica.....	- 19 -
4.2.5 Caracterización molecular.	- 19 -
4.3 Aislamiento y caracterización molecular de <i>Candidatus liberibacter asiaticus</i>	- 20 -
4.3.1. Captura del psílido asiático.	- 20 -
4.3.2. Extracción del ADN.	- 20 -

4.3.3 Técnica de qPCR en Tiempo Real	- 21 -
5. RESULTADOS	- 22 -
5.1 Caracterización de daños en estructuras de los árboles	- 22 -
Figura 2.....	- 23 -
5.2 Caracterización morfológica	- 26 -
5.3 Análisis molecular	- 28 -
5.4 Árbol filogenético de Neighbor-Joining.	- 32 -
6. DISCUSIÓN	- 34 -
6.1 Manejo de las plantaciones de cítricos con la enfermedad del HLB.	- 40 -
7. CONCLUSIÓN.....	- 42 -
8. LITERATURA CITADA.....	- 43 -
ANEXO	- 51 -

LISTA DE FIGURAS

Figura No.	Título	Página
1	Ubicación de las 19 plantaciones comerciales bajo estudio sobre la muerte descendente en árboles de cítricos causado por hongos fitopatógenos en la zona citrícola del centro del estado de Tamaulipas	16
2	Caracterización de síntomas de enfermedades en los árboles. (2a) árbol con deterioro y base del tronco con pudrición, (2b) daños en corteza y leño, (2c) raíces con pudrición y muerte de ramificaciones y (2d) frutos momificados con muerte en ramas.	23
3	Estructuras muestreadas con síntomas y daños (3a) ramas y raíces, (3b) daños en sistema vascular, (3c) troncos con afectaciones en sistema vascular y (3d) frutos con pudrición en la pulpa.	25
4	Desarrollo de los hongos en cámara húmeda. (4a) Caracterización de los síntomas en laboratorio, (4b) Muestras vegetales puestas en cámara húmeda, (4c) desarrollo de micelio en las muestras y (4d) crecimiento de hongos después del procesamiento en cámara húmeda.	25
5	(5a) micelio de <i>Lasiodiplodia</i> sp. Donde se observa la parálisis hialina, (5b) Picnidios hialinos inmaduros y maduros ostiólados de <i>Lasiodiplodia</i> sp., (5c) Micelio de <i>Fusarium</i> sp. de color blanco algodonoso ligera pigmentación rosa y (5d) macro picnidios estriados y micro picnidios de <i>Fusarium</i> sp.	27
6	Ubicación geográfica de los huertos comerciales de cítricos donde se localizó a <i>C. liberibacter</i> asiaticus asociado con <i>L. theobromae</i> .	32
7	Análisis filogenético generado de las secuencias de la región del ITS ribosomal de las cepas aisladas de <i>L. theobromae</i> . El dendograma se obtuvo a partir del análisis por el método del ‘vecino más cercano’ basado en el método de Neighbor-Joining utilizando el programa Mega 7.	33
8	Análisis filogenético generado de las secuencias del factor de elongación EF-1 α del hongo <i>L. theobromae</i> . El dendograma se obtuvo a partir del análisis por el método del ‘vecino más cercano’ basado en el método de Neighbor-Joining utilizando el programa Mega 7.	33

LISTA DE CUADROS

Cuadro No.	Título	Página
1	Ubicación geográfica y geología de los sitios de estudio sobre la muerte descendente en árboles de cítricos causado por hongos fitopatógenos en la zona centro de Tamaulipas.	17
2	Relación de síntomas observados en las estructuras y cultivar de especie cítrica en plantaciones comerciales de la zona centro de Tamaulipas	24
3	Cepas aisladas y porcentaje de frecuencias de especies de hongos en estructuras de árboles cítricos en la zona centro de Tamaulipas, México.	26
4	Distribución de los hongos en las diferentes estructuras de los arboles prospectados de las plantaciones de cítricos en la Zona centro de Tamaulipas.	29
5	Distribución de la bacteria del HLB <i>Candidatus Liberibacter</i> en los diferentes cultivares y huertas con presencia de hongos fitopatógenos en la Zona centro de Tamaulipas.	30

Resumen

En México con la aparición del Huanglongbing (HLB) y la presencia de los fitopatógenos, hacen que la zona citrícola de Tamaulipas se encuentre ante un panorama fitosanitario complicado. Los frutales del género citrus en estado grave de enfermedad son las principales fuentes de transmisión de microorganismos patógenos. En este estudio se determinó la presencia de hongos fitopatógenos causantes del deterioro y la muerte descendente de cítricos y su posible interacción con *Candidatus liberibacter asiaticus*. Por lo que se prospectaron diecinueve huertas de la zona centro de Tamaulipas, con diferentes variedades cítricas como naranjo Valencia, pomelo doble rojo, Ortanique, Murcott, Marsh y limón italiano, injertados sobre patrones de naranjo agrio y *Volkameriana*, con árboles de más de 15 años de edad. Se recolectaron muestras de diferentes estructuras de los árboles y se trasladaron para su estudio al laboratorio del Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria (ITCV). Para la identificación de los patógenos encontrados, se realizó la caracterización morfológica y análisis de secuencias de ADN de la región del espaciador interno transcrito ITS y EF 1 α . Los datos arrojados de la determinación morfológica y análisis genético, determinaron la identificación de *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia jatrophiicola*, *Lasiodiplodia crassipora*, *Botryosphaeria rhodina*, *Nigrospora sphaerica*, *Fusarium keratoplasticum*, *Colletotrichum gloesporoides* y *Cypheliosphora eucalypti*, están presentes y son agentes causales de los síntomas de gomosis, pudrición y muerte regresiva en ramas y árboles.

Abstract

In Mexico, with the appearance of Huanglongbing (HLB) and the presence of phytopathogens, the citrus zone of Tamaulipas is faced with a complicated phytosanitary scenario. Fruit trees of the citrus genus in a serious state of disease are the main sources of transmission of pathogenic microorganisms. In this study, the presence of phytopathogenic fungi that cause deterioration and descending death of citrus fruits and their possible interaction with *Candidatus liberibacter asiaticus* was determined. Therefore, nineteen sites in the central area of Tamaulipas were prospected, with different citrus varieties such as Valencia orange, double red grapefruit, Ortanique, Murcott, Marsh and Italian lemon, grafted on rootstocks of sour orange and *Volkameriana*, with trees over 15 years old. Samples of different tree structures were collected and transferred for study to the laboratory of the Technological Institute of Ciudad Victoria (ITCV). For the identification of the pathogens found, Morphological characterization and analysis of DNA sequences of the transcribed internal spacer region ITS and EF 1 α were performed. The data obtained from the morphological determination and genetic analysis determined the identification of *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia jatrophiicola*, *Lasiodiplodia crassipora*, *Botryosphaeria rhodina*, *Nigrospora sphaerica*, *Fusarium keratoplasticum*, *Colletotrichum gloesporoides* and *Cypheliosphora eucalypti*. are present and are causal agents of the symptoms of gummosis, rot and regressive death in branches and trees.

1. INTRODUCCION

La actividad citrícola es una de las más importantes y relevantes prácticas agrícolas en el mundo. México se encuentra en los primeros lugares a nivel mundial (FAO, 2019) y Tamaulipas ocupa el segundo lugar en producción de naranja y principal productor y exportador de limón italiano a nivel nacional (SDR 2018). Los frutales del genero *citrus* son afectados por diversas enfermedades, causadas por un gran número de fitopatógenos; en su mayoría hongos y bacterias (Sampaio, 2005). A nivel mundial, las pérdidas poscosecha se estiman alrededor del 50% de la producción total y la mayoría de éstas se deben a enfermedades causadas por hongos y bacterias (EI-Ghaouth, 1997). Mientras que en Tamaulipas el SIAP en 2018 reportó una perdida poscosecha del 40 % de la produccion. Los árboles de cítricos que presentan síntomas de enfermedades son consideradas fuentes de inóculos de fitopatógenos que causan graves daños en estas plantas, aminoran la productividad, el rendimiento y en ocasiones provocan la muerte súbita (Cabrera *et al.*, 2012). Uno de los fitopatógenos presentes desde hace años en la citricultura es el hongo *Lasiodiplodia theobromae* quien en interacción con otros hongos del mismo género tal como *L. jatrophiicola* *L. pseudotheobromae*, *L. crassipora* además de otras especies como *Colletotrichum gloesporoides*, *Fusarium keratoplasticum*, *Cyphellophora eucalypti* y *Nigrospora sphaerica* provocan principalmente síntomas como muerte regresiva de ramas, caída de frutos, lesiones en tallos, presencia de goma y pudriciones post cosecha en frutos y quien también son responsables de severos daños en otros frutales (Cabrera, *et al.*, 2017). Con el arribo del huanglongbing (HLB) a México, la citricultura ha sufrido considerables pérdidas económicas y un empeoramiento acelerado, afectando negativamente no solamente

lo económico sino también el aspecto ecológico y social (Gottwald *et al.*, 2012). Este complejo está causando que la zona citrícola de Tamaulipas atraviese por un difícil panorama fitosanitario. Por tanto, en este estudio se pretende determinar el papel que juegan *Lasiodiplodia theobromae* y la interacción con otros hongos en la muerte indirecta de cítricos y su asociación con *Candidatus liberibacter asiaticus* en el deterioro final del árbol.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Conocer la presencia de síntomas y daños en cítricos por hongos del genero *Lasiodiplodia* y su interacción con otros fitopatógenos en la región citrícola del estado de Tamaulipas.

2.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar molecularmente las cepas de los hongos fitopatógenos presentes en árboles con síntomas de deterioro y daños en la región citrícola de Tamaulipas
2. Determinar la presencia de *Candidatus liberibacter asiaticus* en *Diaphorina citri* en las huertas estudiadas.

3. ANTECEDENTES

3.1 Principales variedades de cítricos en Tamaulipas

La citricultura en el estado se basa en la producción de distintas variedades como la naranja dulce Valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck) sobre patrones de naranja agria (*Citrus aurantium*) en 33 mil 231 hectáreas establecidas (SIAP 2017) y de limón italiano (*Citrus limon* Burm) sobre portainjertos de volkameriana (*Citrus volkameriana*) y naranja agria (*Citrus aurantium*), establecidos en 4 mil 700 hectáreas (SIAP 2015), pomelo rojo o toronja (*Citrus paradisi* Macfad) además de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco, 1837). Siendo los principales municipios productores: Padilla, Güémez, Hidalgo, Llera, Victoria y González (SDR 2019).

3.2 Hongos asociados a daños y muerte descendente en cítricos

La citricultura es de las principales actividades agrícolas de Tamaulipas, sin embargo, existen pérdidas económicas significativas en poscosecha de hasta un 40% (SIAP 2018). Estas pérdidas son ocasionadas por hongos, a lo que las aplicaciones de fungicidas pueden reducir significativamente los daños (Ismail y Zhang, 2004). La existencia de hongos fitopatógenos que están presentes en la raíz, tronco, hojas y frutos establecen un alto riesgo para la salud de este cultivo. Algunos de estos hongos causantes de enfermedades en cítricos son: *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium italicum*, *Penicillium digitatum*, *Geotrichum candidum* y *Colletotrichum acutatum* (Altieri et al., 2005; Benyahia et al., 2003), además de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl y *Fusarium solani* (Vázquez et al., 2009; Urbez y Gubler, 2011). En otro estudio se determinó la presencia del hongo *L. theobromae* en localidades en Cuba que se prospectaron, ocasionando daños frecuentes sobre: naranja

valencia [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], toronja pomela (*Citrus paradisi* Macf.) variedad Marsh, Henderson y Ruby Red (Cabrera *et al.*, 2016). El contagio por hongos acontece durante la plantación, el manejo del cultivo, durante la cosecha, en el proceso de almacenamiento, empaque, distribución, puntos de venta e incluso después de llegar al consumidor final (Amiri y Bompeix, 2005). El deterioro comienza a manifestar cuando los hongos fitopatógenos empiezan a colonizar el fruto, tallo, raíz y hojas, en muchas ocasiones, se ve un cambio de coloración y deterioro del tejido con el surgimiento de lesiones (Droby *et al.*, 2002). Contreras y Rondon (1985) aislaron y caracterizaron los hongos fitopatógenos *Alternaria citri* Ellis y *C. gloeosporioides* Penz. De acuerdo a la investigación, revelaron que *A. citri* era el principal agente infeccioso capaz de contagiar por si solo el tejido inoculado; por otra parte, el hongo *Colletotrichum* interviene como un patógeno incidental que magnifica los síntomas de la enfermedad. Mientras que McGover *et al.*, (2012) en su estudio comenta que *Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo con disminuida capacidad patogénica, que es un colonizador oportunista cuya capacidad de fructificar se da sobre tejidos debilitados o muertos que fueron dañados por el clima, agroquímicos o heridas. Incluso está presente en tejidos sanos sin causar daños. En su estudio Parra *et al.*, (2019) encontró que *Fusarium* spp. es el patógeno causante del marchitamiento en naranja. “Valencia” en Sonora, México. Así también, se ha reportado en el suroeste de Estados Unidos, a *Fusarium solani* y *Phytophthora* spp. como los fitopatógenos causantes de la descomposición oscura, enfermedad de las raíces y la parte inferior del tronco, así también causante de clorosis foliar y marchitamiento en árboles de naranjas y limones (Adesemoye *et al.*, 2011). Por otro lado, Fogliata *et al.*, (2013) reportó la existencia de *Fusarium* en la pudrición en árboles de limón, y determinaron que *Fusarium oxysporum* es el agente causal.

3.3 Taxonomía de los hongos fitopatógenos.

Los hongos *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Lasiodiplodia jatrophiicola* y *Lasiodiplodia crassipora* se catalogan dentro de los Ascomicetos en la familia Botryosphaeriaceae (Schoch *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2013). Otro del mismo orden y no tan común es *Botryosphaeria rhodina*, aunque, no existen recientes caracterizaciones de su estado sexual, se ha reportado que éste se encuentra en un estado de extravío (Phillips *et al.*, 2008). Sin embargo, otros autores lo consideran un telemorfo de *L. theobromae* (Mohali *et al.*, 2005). Por otro lado, *Colletotrichum gloeosporioides*, se encuentra clasificado en los Ascomicetes, familia Glomerellaceae (Kirk *et al.*, 2001). El hongo *Fusarium keratoplasticum* se clasifica dentro de los ascomicetos, en la clase de los Ascomycota, orden Hipocreales y familia Nectriaceae (Martínez *et al.*, 2015). En la clase de Ascomycota también se clasifica a *Cyphellophora eucalypti* perteneciente a la familia Chaetothyriaceae. *Nigrospora sphaerica* se clasifica dentro del orden Trichosphaeriales de la familia Trichosphaeriaceae del phylum Ascomycota (Cheol *et al.*, 2001).

3.4 Sintomatología de la enfermedad en otros cultivos

La muerte descendente no es una enfermedad exclusiva de los cítricos, se reportan casos con los mismos síntomas en otros frutales, uno de los principales problemas es la infección del pedúnculo en frutos donde se describe como un problema sanitario de poscosecha de diversos cultivos en muchas regiones del mundo y cuya etiología es incierta (Slippers *et al.*, 2009). La especie *Lasiodiplodia theobromae* se asocia comúnmente con ramas secas y en la mayoría de los frutales con muertes regresivas y súbitas. Causado grandes pérdidas a la agricultura. Fue reportada por primera vez en Venezuela en el año 1941; en la actualidad, se distribuye

en todo el territorio. Esta patología se presenta en ramas, tallos, raíces y frutos, restringiendo la capacidad de fotosíntesis, productiva y comercial. En muchos casos es responsable de la muerte de los injertos (Rumbos *et al.*, 2007).

Las especies de la familia Botryosphaeriaceae como *L. theobromae*, *Neofusicoccum mangiferum* y *Neofusicoccum parvum* están asociados asocian habitualmente con enfermedades de mango, principalmente trastornos de inclinación de árboles, además de pudriciones del apéndice de las frutas (Sakalidis *et al.*, 2011). Por otra parte, Khanzada *et al.* (2004), refiere que los trastornos de declive de árboles, abarcan patologías como tizón, cancrrosis, gomosis y muerte descendente de ramas y tallos, estos comparten síntomas similares con las pudriciones del pedúnculo.

Se encontró que las plantaciones de mango en diferentes áreas de la India sufren de una enfermedad de declive mostrando síntomas de secamiento de las ramas desde la punta, a la par de un fuerte exudado de color marrón amarillento en tallo y ramas, además de pardeamiento de los tejidos vasculares. Las hojas de las ramas afectadas se vuelven marrones en sus márgenes y caen dejando la rama muerta. 11 hongos se aislaron de las raíces, tallo y brotes de las plantas, de estos, *L. theobromae* fue el hongo más abundante que se aisló de todas las partes de la planta. (Khanzada 2004).

En el caso de la muerte regresiva en ramas y de la pudrición de la parte basal en frutos de mango, diversas especies de la familia Botryosphaeriaceae han sido relacionadas a estos síntomas, siendo *L. theobromae*, *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum* y *Neofusicoccum mangiferae* las principales. En Brasil, estos daños eran atribuidos únicamente a *L. theobromae*, pero estudios realizados por Marques *et al.* en el 2013 con 235 aislados de Botryosphaeriaceae obtenidos de mango, usando la combinación de análisis morfológicos y biotecnológicos este último basado en análisis genético de las regiones ITS y EF1- α ,

encontrando que la pudrición del pedúnculo era ocasionado por siete especies del genero *Lasiodiplodia*, (*L. crassispora*, *L. egyptiaca*, *L. hormozganensis*, *L. iraniensis*, *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae* y *Lasiodiplodia* spp. Por otro lado Michereff (2013), en su investigación encontró otras especies patógenas de la familia Botryosphaeriaceae, estas son *B. dothidea*, *Botryosphaeria mamane*, *Fusicoccum fabicercianum*, *N. parvum*, *Neoscytalidium dimidiatum* y *Pseudofusicoccum stromaticum*) y reportó una nueva especie (*Neofusicoccum brasiliense*)

En otro estudio realizado en Brasil por Neto *et al.*, en 2013, trabajó con 166 aislados de *Lasiodiplodia* obtenidos de papaya, utilizando técnicas morfológicas y filogenéticas, usando secuencias de las regiones génicas ITS y EF1- α , encontrando que la pudrición del pedúnculo era originada por tres especies del genero *Lasiodiplodia*; *L. theobromae*, *L. hormozganensis* y *L. pseudotheobromae*.

La Antracnosis del olivo, es una grave enfermedad causada por especies del género *Colletotrichum*. Esta especie está ampliamente distribuida en todas las regiones productoras de olivo. La vulnerabilidad de la planta a esta enfermedad varía en función de la variedad, el clima y la patogenicidad del hongo, se ha indicado que son dos las especies del genero *Colletotrichum* (*C. acutatum* y *C. gloeosporioides*) responsables de la Antracnosis y cuyo principal síntoma es la podredumbre de las aceitunas, asociada con una considerable pérdida de peso y caída prematura del fruto, originando aceites con notable acidez y mala calidad organoléptica (Oliveira *et al.*, 2005).

3.5 Los hongos endófitos en árboles frutales y su relación con hongos fitopatógenos.

Los hongos endófitos se establecen en las plantas en simbiosis con ellas sin causar daños aparentes o enfermedad. El estrecho vínculo que hay entre el endófito y su hospedera es

fundamental ya que el hongo es capaz de producir metabolitos secundarios conocidos como sustancias bioactivas, así como la capacidad de modificar los mecanismos de defensa de su hospedera, permitiendo la sobrevivencia de ambos organismos ya que los endófitos tienen una gran capacidad para producir moléculas bioactivas que le dotan de defensa a su planta hospedera contra la agresión de patógenos (Sánchez *et al.*, 2013).

El primer vínculo o interacción importante se da entre el hongo endófito y la planta hospedero, esto en principio es por la alta importancia de que en estas asociaciones ambos organismos elaboran sustancias bioactivas potencialmente tóxicas para otros microorganismos, es aquí donde se genera la interacción con los hongos fitopatógenos pues el hongo endófito produce elementos de virulencia, como exoenzimas y metabolitos secundarios tóxicos, mientras que la planta hospedera produce defensas, tanto mecánicas, biológicas y bioquímicas, estas composiciones también suelen ser antibióticos con propiedades antibacterial, antifúngicas, e insecticidas. Por lo que un hongo endófito produce sustancias que inhiben a un fitopatógeno en particular o incluso a otros hongos endófitos (Rodríguez *et al.*, 2009).

González *et al.*, (2009) señala que el hongo endófito *Muscador yucatanensis* actúa contra los patógenos *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia solani* mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles. Estos metabolitos actúan como mecanismos de defensa de la hospedera y son letales para los fitopatógenos quienes producen daños como la podredumbre en frutos, estos compuestos también atacan a *Phytophthora* quien actúa a nivel de raíz dañando el sistema vascular de diversos frutales tal como cítricos, mango, aguacate entre otros. Otro Mecanismo de defensa se da en las raíces cuando el endófito *Piriformospora indica* coloniza esta estructura y produciendo el ascorbato un compuesto antioxidante que afecta a *Fusarium* spp., agente causal que daña el sistema radicular y vascular de los cítricos y otros frutales.

También este antioxidante afecta a *Cochliobolus sativus* que causa enfermedades en la raíz, hoja y tallo de frutales, ayudando a evitar la pérdida de biomasa y deterioro causado por las enfermedades. Este antioxidante protege a la hospedera de muerte celular (Waller *et al.*, 2005).

Una de las más importantes e interesantes interacciones entre endófitos, huésped y fitopatógenos se da a nivel radicular pues la gran mayoría de árboles frutales forman micorrizas en condiciones ambientales naturales, estas representan las asociaciones simbióticas más interesantes entre plantas y hongos. Estas relaciones se basan en el intercambio de metabolitos y nutrientes. Las micorrizas son capaces de colonizar el sistema radicular de la mayoría de las plantas silvestres y cultivadas, independientemente de las condiciones abióticas, eficientizando de esta forma el intercambio de nutrientes y producción de los mismos, sobre todo en condiciones de nutrientes deficientes, ayudando al crecimiento y desarrollo (Pérez *et al.*, 2011). Otra ventaja de gran importancia en la simbiosis además de que las plantas se nutren del suelo, es incrementar su tolerancia a estrés biótico y abiótico además de reducir la competencia entre plantas por medio de la transferencia de carbono a través de la red de hifas extraradical (Simard y Durall, 2004). Por otra parte, también existe un efecto supresor de las micorrizas sobre algunos fitopatógenos mayores como en el caso del banano donde las micorrizaciones tienen un efecto directo sobre los nematodos endoparásitos sedentarios, así lo describe en su estudio, Elsen *et al.*, (2011), donde menciona que el nematodo *Radopholus similis* tanto en las raíces como en el suelo fueron eliminados en las plantas con micorrizas. También las micorrizaciones pueden promover la resistencia sistémica (RSI) en las plantas al prender su sistema de alarma al momento en que el hongo coloniza la raíz, también activa procesos metabólicos donde se encuentran involucradas fitohormonas importantes como el ácido jasmónico y el etileno que están implicadas en la

síntesis de moléculas tóxicas para los fitopatógenos, tales como fitoalexinas y péptidos relacionados con la patogénesis. También las micorrizaciones pueden modificar los patrones de secreción de la raíz posibilitando que microorganismos antagónicos a fitopatógenos se establezcan, como bacterias impulsoras del crecimiento vegetal. Lo anterior permite la bio protección del ataque y supresión de fitopatógenos del suelo como *Phytophthora* y *Fusarium* reduciendo la severidad de daños en la raíz (García *et al.*, 2010).

Beauveria bassiana es otro ejemplo de hongo endófito ya que este produce una gama de metabolitos bioactivos que reduce el ataque causado por *Pythium* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Fusarium* spp., hongos fitopatógenos que se encuentran en el suelo (Posada *et al.*, 2010).

Otro tipo de interacción es la presencia de fitopatógenos con comportamientos endófitos que contribuyen a aumentar los daños de la planta, tal como *L. theobromae* y *Cladosporium* sp., que fueron detectados adentro de los sacos polínicos junto con los gránulos de polen. Estas deducciones señalan que la colonización endófitica por hongos fitopatógenos representa una ruta vital para el desarrollo de patologías relevantes en diversos frutales como los cítricos y otros, donde se presentan síntomas como son la muerte descendente, antracnosis y escoba de bruja cuyos agentes causales son *L. theobromae*, *C. gloeosporioides* y *F. decemcellulare*, respectivamente (Morales y Rodríguez 2009).

Interacciones a nivel radical entre *Radopholus similis* y especies fungosas del género *Cylindrocladium* y *Acremonium* hongos endófitos asociados con la podredumbre radical cuya coparticipación contribuye a aumentar los daños causados a la raíz (Pocasangre *et al.*, 2000).

En su trabajo Aimé *et al.*, (2013) describe una cepa no virulenta de *Fusarium oxysporum* que inhibe a otra cepa patógena como *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* reduciendo los

daños de la raíz como son síntomas de pudrición, ambas especies compiten por la misma fuente de carbohidratos, lo que reduce la disponibilidad de nutrientes.

Tras muchos años de investigación se afirma que todas las plantas cuando se encuentran en un ambiente natural son simbioses ya sea con hongos micorrizicos o endófitos, al respecto Rodríguez *et al.*, (2009), señala la importancia de los hongos endófitos en árboles frutales considerándolos de gran valor por la producción de metabolitos secundarios biosintetizados que poseen actividad antimicrobiana y fitotóxica inhibiendo a un gran número de fitopatógenos. Lo anterior permite obtener información de los diversos tipos de microorganismos que existen en la planta, pues se identifica cuáles de estos endófitos son utilizados para la obtención de metabolitos secundarios biosintetizados como fuente potencial de fármacos (Kusari *et al.*, 2012). Por otro lado, el establecimiento de una asociación específica entre hongos endófitos y el hospedero, genera un beneficio mutuo, como proveer al hongo nutrientes, alojamiento y refugio y por su parte los endófitos proporcionan gran capacidad adaptativa a las plantas hospederas frente a condiciones desfavorables que generen estrés abiótico o biótico (Nisa *et al.*, 2015).

3.6 Factores climáticos y formas de diseminación del hongo *Lasioidiplodia theobromae*

La muerte regresiva es una enfermedad causada por el hongo *Lasioidiplodia theobromae* y el proceso de infección está influenciado por diversos factores abióticos como la luminosidad, clima, longevidad de la planta y la alta densidad de inóculo. Los daños más severos se producen en el momento en que las condiciones de temperaturas y humedad relativa son altas y se da un período prolongado seco, además del ataque de plagas y presencia de lesiones en los órganos de la planta. Estos factores potencializan a los hongos fitopatógenos, quienes provocan la obstrucción y colapso del sistema vascular, ocasionando la muerte (Rumbos *et*

al., 2005). Los agentes causales de la muerte regresiva entran a la planta aprovechando las heridas causadas por la poda, aberturas naturales o heridas causadas por insectos y a través de las cuales invaden el sistema vascular (Serra *et al.*, 2008).

Umaña (2011), expresa que algunos patógenos como *Lasiodiplodia theobromae*, en frutales como el mango se encuentran de forma endófitica en los tejidos del tallo esto es antes de que emerjan las inflorescencias por lo que alcanzan el tejido del pedúnculo de los frutos jóvenes ocho semanas después de la floración, por lo tanto, esta colonización endófitica de la inflorescencia y del pedúnculo es considerada una ruta primaria de infección del fruto y del ápice de las ramas. Sin embargo, se considera que la podredumbre poscosecha es causada por este hongo en la fruta y que ocurre durante la cosecha al entrar el fruto en contacto en las cajas de recolecta y con el suelo, donde las esporas están presentes (Johnson, 1994).

3.7 El Huanglongbing (HLB)

El cítrico es un cultivo de gran importancia en Latinoamérica, donde existen cerca de 700 mil hectáreas cultivadas correspondiente a 210 millones de árboles aproximadamente (OIRSA 2009). Una de las enfermedades más devastadoras de los cítricos que ha hecho su aparición recientemente es el Huanglongbing (HLB), enfermedad asociada a una bacteria y a un insecto vector y de acuerdo a Machado *et al.* (2010) esta patología se encuentra relacionada a tres especies de proteo bacterias condicionadas al floema, estas son: *Candidatus liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. Liberibacter africanus* (Laf) y *Ca. Liberibacter americanus* (Lam), bacterias del tipo Gram negativas, son los agentes causales de la enfermedad del HLB y son transferidas a los cítricos por el insecto vector *Diaphorina citri* K. En México, este padecimiento, que es de origen asiático, y ha sido reportada por SAGARPA en enero del

2018, donde dictaminó la presencia del HLB en el estado de Tamaulipas y actualmente se considera el estado como zona bajo control fitosanitario. (SDR 2018).

Las plantas, una vez infectadas por la bacteria del HLB, desarrollan síntomas posteriormente seguido de un período de incubación de entre 6 y 12 meses. La planta infectada al inicio presenta síntomas como clorosis de varios brotes que en un lapso de tiempo se manifiesta por completo en la planta acelerando su muerte en meses o años, dependiendo del tiempo en que el árbol fue infectado por la bacteria (Canales *et al.* 2016).

3.8 Grado de susceptibilidad a las enfermedades entre los cítricos.

En la zona citrícola de Tamaulipas la mayor parte de la superficie establecida con naranja se encuentra sobre un patrón de naranja agria resistente a enfermedades y estrés hídrico, pero vulnerable a la enfermedad de la tristeza de los cítricos, en cambio el limón italiano está en porta injertos de volkameriana y naranjo agrio resistentes al virus de la tristeza (Cruz 2000). Los hongos fitopatógenos *fusarium* spp. y *L. theobromae* que se encuentran presentes en raíces los portainjertos de *C. volkameriana* y cleopatra, estos interactúan en distintos niveles con *Fusarium solani* y *Phytophthora* spp, ocasionando la pudrición de las raíces (Cabrera *et al.*, 2012).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Sitio de estudio

El trabajo de investigación fue desarrollado durante 2017-2018 en los municipios de Victoria, Llera, Padilla, Villa de Casas y Güémez, Tamaulipas, México (Figura 1), en esta región centro norte predomina un clima moderadamente cálido con precipitaciones escasas y más al meridiano en verano, se presentan temperaturas más elevadas y húmedas. La cercanía de la región citrícola al océano, es afectado por vientos húmedos y ciclones que provocan lluvias en gran parte de la zona. Así también, las lluvias anuales en invierno como los nortes (masas de aire), causan una elevada humedad, ocasionando abundantes precipitaciones (Conagua 2020). El suelo predominante en la región, es el vertisol, que son suelos por lo general muy fértiles, originado de rocas básicas como el basalto, proviene de zonas fluviales, es de textura arcillosa, hinchable, pesada que forma grietas anchas y profundas en la época de lluvia seguida de una prolongada sequía. Son de tonos oscuros a marrones y grises. De alta resistencia a la erosión, generalmente son suelos de regiones semiáridas. También se encuentran suelos como litosol, rendzina y chernozem (Conagua 2020). La descripción, ubicación geográfica y tipo de suelo se muestra en el cuadro 1.



Figura 1. Ubicación de las 19 plantaciones comerciales bajo estudio sobre la muerte descendente en árboles de cítricos causado por hongos fitopatógenos en la zona citrícola del centro del estado de Tamaulipas

Cuadro 1. Ubicación geográfica y geología de los sitios de estudio sobre la muerte descendente en árboles de cítricos causado por hongos fitopatógenos en la zona centro de Tamaulipas.

			Coordenadas	
Municipio	Nombre de la huerta	Tipo de suelo	Latitud	Longitud
Victoria	San Francisco	Vertisol - pelico	23.9289580	-99.2327920
Victoria	Real del 14	Rendzina	23.7591850	-99.0723000
Victoria	El Huichol	Vertisol - pelico	23.8771210	-99.2389290
Victoria	San José	Rendzina	23.9031970	-99.1637590
Victoria	El 12	Vertisol - pelico	23.8275010	-99.0822000
Victoria	El Encino	Vertisol - pelico	23.7842400	-99.0639620
Victoria	El Anheló	Vertisol - pelico	23.7739750	-99.0741200
Güémez	Tres Sabinos	Vertisol - pelico	23.8967450	-99.0512050
Güémez	Las Lomas	Vertisol - pelico	23.9205950	-99.0500120
Güémez	Los Cascabeles	Rendzina	23.9118410	-99.1536150
Güémez	Macabeos III	Vertisol - pelico	23.9232060	-99.0416650
Padilla	San Juan	Chernozem - cálcico	24.0474000	-99.0312500
Padilla	El Tejón	Litosol	24.0434330	-98.8912320
Padilla	Macarena	Chernozem - cálcico	24.1013000	-99.0193000
Padilla	Caluche	Chernozem - cálcico	24.1013930	-99.0184910
Güémez	Providencia	Vertisol - crómico	23.9275470	-99.0786190
Llera	Las Angélicas	Vertisol - crómico	23.2495810	-98.8396270
Llera	La Cecilia	Vertisol - crómico	23.2257300	-98.8267500
Villa de Casas	Santa Isabel	Vertisol - pelico	23.6930590	-98.8421780

4.2 Aislamiento, caracterización morfométrica y molecular de hongos fitopatógenos

4.2. 1 Colecta de muestras vegetales.

El material vegetal muestreado, fue recolectado en 19 huertos comerciales de cítricos, en árboles con síntomas de afección por hongos fitopatógenos. Las muestras fueron colectadas en 21 árboles de limón de la variedad italiano (*Citrus limon* Burm), 11 árboles de naranja

valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck), un árbol de toronja pomela rojo (*Citrus paradisi* Macfad) y un árbol de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco, 1837).

El material vegetal con síntomas de enfermedad fue recolectado de las ramas, frutos, hojas, corteza del tronco y raíces. El material muestreado se colectó en bolsas estériles de polietileno de baja densidad, fueron etiquetadas y transportadas en hieleras a temperaturas de 4 grados centígrados al laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto Tecnológico de Victoria.

4.2.2. Aislamiento de los patógenos.

Se llevó a cabo la incubación de las muestras de acuerdo al procedimiento de Faraj *et al.*, (2016). Esto en cámara húmeda, lo cual permite el desarrollo de síntomas y signos de la enfermedad, para ello se procedió a colocar las muestras vegetales dentro de bolsas de nylon con un trozo de algodón humedecido con agua, sobre papel absorbente grueso y liso que permitió una adecuada observación y retención suficiente humedad para el desarrollo del patógeno.

4.2.3 Siembra de muestras vegetales en medio de cultivo.

De acuerdo al procedimiento de Cabrera *et al.*, (2012), se desarrolló de la siguiente manera; se seccionaron cinco partes de tejido de un tamaño de 5 mm por cada muestra. Las partes seccionadas, fueron desinfectadas con NaClO (hipoclorito de sodio) al 1.0 % por un tiempo de tres minutos, enseguida fueron lavadas con agua destilada estéril, se pusieron a secar en una estufa a 30 °C por 35 minutos para luego ser sembradas por separado en cajas de Petri con PDA (papa dextrosa) agar. Las muestras sembradas fueron puestas en una incubadora en luz blanca a 25 °C por tres días. Se obtuvieron aislamientos que se pasaron a tubos de ensaye

con agua agar (se disolvieron 18 gramos de agar agregados a litro de agua destilada). para realizar cultivos monospóricos

4.2.4 Identificación taxonómica.

Los hongos recolectados y aislados, se identificaron hasta género con base en las características taxonómicas mediante las claves dicotómicas taxonómicas para hongos fitopatógenos ascomicetos y basidiomicetos publicadas por Punithalingam 1976, Burgess *et al.*, 2006 y Barnett y Hunter 2006.

4.2.5 Caracterización molecular.

Se extrajo ADN de los hongos aislados utilizando la técnica de Ahrens y Seemüller (1992). Con el ADN obtenido, se amplificaron las secuencias de los espaciadores internos transcritos; el ITS1 y el ITS2 y del gen EF-1 α (factor de elongación alfa). La región ITS se amplificó utilizando los primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5') que amplifican un fragmento de 642 pb. Los reactivos de PCR utilizados para amplificar ambas regiones de acuerdo a la técnica de Rehner,(2001). fueron: agua ultra pura (13.22 μ L), disolución buffer TBE 1X (2.5 μ L), cloruro de magnesio (MgCl) a 2.5 mM (2.08 μ L), nucleótidos (dNTPs) (2 μ L), primers (2 μ L de cada uno), DNA polimerasa del laboratorio Biogénica a 1U (0.2 μ L) y 1 ml de ADN.

Los parámetros para clonación de las regiones genómicas por PCR fueron 94 °C por 5 min., seguidos de 35 lapsos de 94 °C por 5 min., 60 °C por 1 min., 72 °C por 15 min. y un lapso final de 72 °C por 5 min. Las regiones ITS amplificadas fueron purificadas con el kit comercial Promega y los productos obtenidos fueron secuenciados utilizando un

secuenciador modelo 3100, realizados en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

4.3 Aislamiento y caracterización molecular de *Candidatus liberibacter asiaticus*.

4.3.1. Captura del psílido asiático.

Para la captura de especímenes del insecto vector *Diaphorina citri*, esta se realizó de acuerdo al manual operativo de la campaña contra el HLB (SENASICA 2016), este insecto es ubicado en los brotes tiernos y mediante un aspirador manual, es atrapado por succión, después se colocaron en viales con DNAzol. La captura de muestras de psílicos se realizó en las 19 huertas en estudio y fueron trasladados al laboratorio para su procesamiento.

4.3.2. Extracción del ADN.

Para la extracción del ADN de los psílicos, de acuerdo a la técnica desarrollada por Yamamoto *et al.*, 2006. Se procedió de la siguiente manera; se maceraron con un pistilo los insectos recolectados, el material se pasa a micro tubos de 1.5 ml con 400 µl de solución buffer de extracción (composición de la solución: 100 mM Tris HCl pH8, 20 mM EDTA pH 3, 1.4 M NaCl, 1% PVP10 y 2% CTAB). Después se colocan en una incubadora a 65°C durante 30 min en este lapso los micro tubos se agitaron esporádicamente. Enseguida los ácidos nucleicos son extraídos con 300 µl de una solución mezclando cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 24:1. Posteriormente se tomó la parte que se formó arriba y se realizó la precipitación a través de una centrifuga de alta velocidad ICB-FUGE, utilizando para este fin etanol absoluto. El material precipitado se disolvió en 30 µl de agua destilada estéril y se guardó para su conservación a -20°C, en un ultra congelador Whirlpool modelo WHA20ABTE.

4.3.3 Técnica de qPCR en Tiempo Real.

El diagnóstico de la presencia de la bacteria *C. liberibacter* en tejido vegetal y muestras de especímenes de *D. citri*, se llevó a cabo en el Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria de la Dirección General de Sanidad Vegetal con dirección en carretera Nacional México Pachuca km 37.5, Tecámac Estado de México. Se realizó través de PCR tiempo real o qPCR. En el diagnóstico se utilizaron los iniciadores HLBP (5' TCG AGC GCG TAT GCA ATA CG 3'), HLBr (5' GCG TTA TCC CGT AGA AAA AGG TAG 3'), y la sonda (5' AGA CGG GTG AGT AAC GCG 3'), desarrolladas por Li *et al.* (2006). Se utilizó un par de iniciadores y sondas basados en la enzima citocromo-oxidasa (COX) como control interno positivo. La qPCR fue realizado con base en el protocolo validado por el USDA-APHIS-PPQ-CPHST para la detección de *C. Liberibacter asiaticus* (Li *et al.*, 2006). Las pruebas de qPCR se realizaron en un termociclador Stratagene Mx3005P en una mezcla de 25 µl que contenía: Tris HCl 20 mM, pH 8,8, KCl 10 mM y 10 mM, MgSO₄, Triton X-100 al 0,1%, 250 µM dNTPs, 250 nM de cada uno de los iniciadores, 150 nM de cada una de las sondas y 2,5 unidades de Taq ADN polimerasa del fabricante New England Biolabs. Cada qPCR contenía los siguientes controles: dos tubos con agua como controles de PCR negativos, un tubo sin muestra de extracciones como control de extracción, dos tubos que contienen diluciones de plásmido ADN pLas (que contiene la secuencia de ADN de *Ca. L. asiaticus* en el plásmido pGEMT), y un tubo que contiene *Ca. L. asiaticus* 'positivo como controles positivos. Las condiciones de la PCR fueron: 95 °C por 5 min seguido por 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos y 58°C por 45 segundos. Las emisiones se midieron en cada uno de los 40 pasos de extensión. Un plásmido pGEMT conteniendo un fragmento clonado de 16S rDNA de *Ca. L. asiaticus* ' (pLas) se utilizó para la normalización inicial de la qPCR. La optimización

preliminar de las concentraciones de los reactivos, los iniciadores y las sondas se realizó utilizando controles positivos y negativos, así como diluciones del plásmido pLas.

5. RESULTADOS

En este estudio, la pudrición del pedículo en frutos y la muerte descendente por secamiento de ramas en frutales del genero *citrus*, así como otros síntomas como gomosis y necrosis son asociadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae y es la primera prospección de especies de esta familia donde está asociada principalmente especies del genero *Lasiodiplodia*.

5.1 Caracterización de daños en estructuras de los árboles

Se tomaron 106 muestras en las 19 huertas prospectadas donde se realizó la caracterización sintomatológica de los daños presentes en árboles de los diferentes cultivares visitados (Figura 2). Se observó una gran cantidad de síntomas y sus posibles agentes causales; Las plantaciones muestreadas presentaban daños en ramas como secamiento y muerte regresiva que iniciaba en la punta y avanzaba hacia el tronco, también presentaban necrosis y exudados marrones. Además de presentar un avanzado deterioro por muerte descendente, los árboles mostraron también defoliación parcial con ramas con hojas secas y verdes, frutos momificados de color pardo y otros con pudrición color café claro a oscuro, los troncos presentaban síntomas de necrosis y pudrición. Procediendo a realizar una relación de los síntomas encontrados en las diferentes estructuras de los cultivares (Cuadro 2).



Figura 2. Caracterización de síntomas de enfermedades en los árboles. (2a) árbol con deterioro y base del tronco con pudrición, (2b) daños en corteza y leño, (2c) raíces con pudrición y muerte de ramificaciones y (2d) frutos momificados con muerte en ramas.

Así mismo se tomaron muestras vegetales con daños de diferentes estructuras de los arboles prospectados. (Figura 3), lo anterior para el diagnóstico presuntivo de los agentes causales de cada sintomatología. Después del procesamiento de las muestras se observó el desarrollo de los hongos en las estructuras con síntomas puestas en cámara húmeda (Figura 4).

Cuadro 2. Relación de síntomas observados en las estructuras y cultivar de especie cítrica en plantaciones comerciales de la zona centro de Tamaulipas

Municipio	Huerto	Cultivar	Síntomas observados
Güémez	San Francisco	Naranja	Ramas secas con goma
Victoria	Real del 14	Naranja	Ramas secas y fruto podrido
Victoria	Real del 14	Limón	Fruto podrido
Padilla	San Juan	Mandarina	Leños y ramas secas
Padilla	San Juan	Naranja	Pudrición en leño y ramas secas
Padilla	San Juan	Limón	Pudrición en leño y ramas con goma
Padilla	San Juan	Limón	Ramas secas con goma
Güémez	Las Lomas	Limón	Pudrición en leño y ramas secas
Güémez	Los Cascabeles	Limón	Pudrición en leño y ramas secas
Güémez	Los Cascabeles	Limón	Pudrición en leño, xilema con micelio blanco
Güémez	Los Cascabeles	Naranja	Pudrición de corteza y leño muerto
Güémez	Los Cascabeles	Naranja	Ramas secas con hongo
Güémez	Los Cascabeles	Naranja	Frutos con hongo
Güémez	Los Cascabeles	Limón	Xilema con hongo
Güémez	Los Cascabeles	Limón	Raíz seca podrida
Llera	Las Angélicas	Naranja	Pudrición del xilema y corteza
Güémez	Macabeos III	Limón	Daños en leño y ramas con canchales
Güémez	Macabeos III	Limón	Daños en las raíces y corteza con goma
Victoria	El Huichol	Limón	Daños en el leño y xilema
Victoria	El Huichol	Limón	Daño en el xilema y corteza
Victoria	El Huichol	Limón	Daños en madera
Victoria	San José	Naranja	Daños en la madera, corteza y ramas secas
Padilla	El Tejón	Toronja	Daños en el xilema y ramas secas
Padilla	La Cecilia	Limón	Daños en el xilema y ramas con goma
Padilla	Macarena	Naranja	Pudrición y necrosis en el leño
Padilla	Macarena	Limón	Lesión en leño y xilema
Padilla	Caluche	Limón	Daños en el xilema, rama y tronco
Güémez	Providencia	Limón	Pudrición en el leño y corteza
Victoria	Casa Graciela	Naranja	Rama
Victoria	El 12	Naranja	Pudrición del leño en ramas
Victoria	Tres Sabinos	Limón	Rama seca
Victoria	El Encino	Limón	Xilema dañado
Victoria	El Anhelito	Limón	Xilema y ramas con micelio negro



Figura 3. Estructuras muestreadas con síntomas y daños (3a) ramas y raíces, (3b) daños en sistema vascular, (3c) troncos con afectaciones en sistema vascular y (3d) frutos con pudrición en la pulpa.

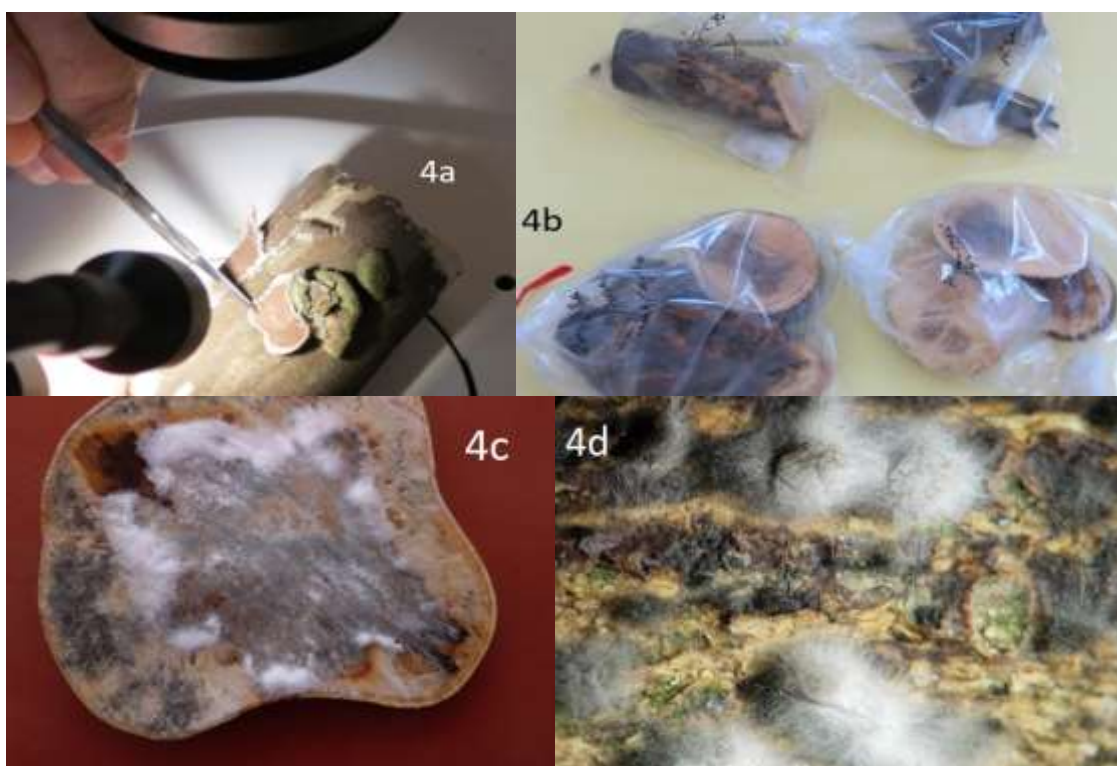


Figura 4. Desarrollo de los hongos en cámara húmeda. (4a) Caracterización de los síntomas en laboratorio, (4b) Muestras vegetales puestas en cámara húmeda, (4c) desarrollo de micelio en las muestras y (4d) crecimiento de hongos después del procesamiento en cámara húmeda.

5.2 Caracterización morfológica

Se aislaron en placas de Petri y luego a tubos de ensayo, 34 cepas de hongos, presentes en siete cultivares y dos patrones diferentes de los cuales resultaron que 27 cepas pertenecen a *Lasiodiplodia* spp., tres de *Botryosphaeria* spp., una de *Nigrospora* spp., una de *Fusarium* spp., una de *Colletotrichum* spp. y una de *Cyphellophora* spp. El género *Lasiodiplodia* fue recolectado con mayor frecuencia en el tronco (38.24 %) seguido por las ramas (29.41%) y frutos (4%). En contraste, en las hojas y en las raíces no fue encontrado. *Botryosphaeria* sp. fue recolectado solo en las ramas. Mientras que, *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. y *Cyphellophora* spp. fueron colectados solo en las raíces, y *Nigrospora* spp. en las hojas (Cuadro 3)

Cuadro 3. Cepas aisladas y porcentaje de frecuencias de especies de hongos en estructuras de árboles cítricos en la zona centro de Tamaulipas, México.

	Tronco	Rama	Raíz	Fruto	Hoja
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	38.24%	29.41%		4%	
<i>Botryosphaeria</i> sp		8.82%			
<i>Fusarium</i> sp			2.94%		
<i>Colletotrichum</i> sp.			2.94%		
<i>Cyphellophora</i> sp			2.94%		
<i>Nigrospora</i> sp					2.94%

El género *Lasiodiplodia* en medio de cultivo. Presenta una apariencia de color gris oscuro, con micelio aéreo, los picnidios presentan estructuras ostíolados y se encontraron solos o adheridos en el tejido conjuntivo o estromático, también se observaron conidios prematuros

hialinos, ovalados, granulados y de base inconclusa, y conidios maduros de color marrón, ovalados, con surcos longitudinales y base inconclusa mientras que *Fusarium* presenta el desarrollo de un micelio blanco con coloración rosa y presenta conidios donde se observan macro y micro conidios cilíndricos, los macro conidios presentan varias estrías mientras que los micro conidios no se observan ostíolados (Figura 5).

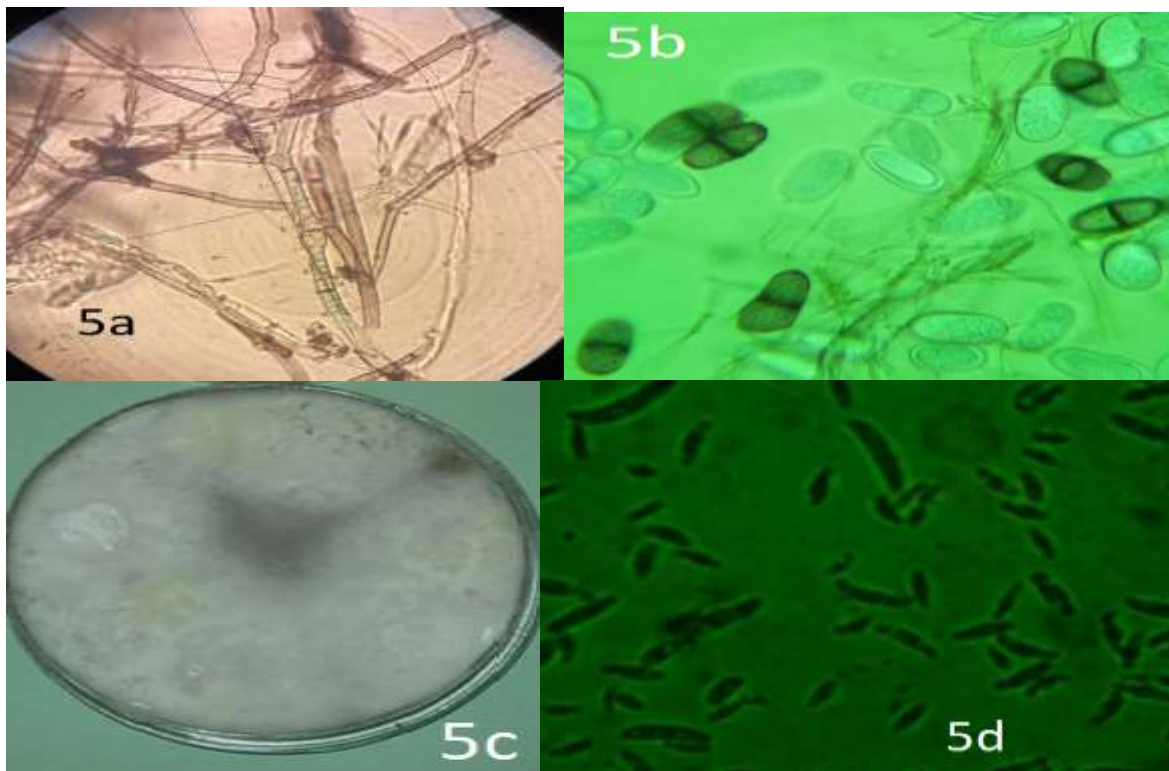


Figura 5. (5a) micelio de *Lasiodiplodia* sp. Donde se observa la parálisis hialina, (5b) Picnidios hialinos inmaduros y maduros ostíolados de *Lasiodiplodia* sp., (5c) Micelio de *Fusarium* sp. de color blanco algodonoso ligera pigmentación rosa y (5d) macro picnidios estriados y micro picnidios de *Fusarium* sp.

5.3 Análisis molecular

Las secuencias obtenidas de la región ITS fueron editadas en el software BioEdit y se equipararon con la base de datos de secuencias depositadas en el banco de genes (Genbank) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). El análisis de las 34 secuencias genéticas mostro similitud al comparase que 27 secuencias correspondieron al género *Lasiodiplodia* sp. las secuencias de este hongo se homologaron al 100 % con *L. theobromae* (n=17 secuencias), *L. jatrophiicola* (n= 6), *L. crassipora* (n= 2) y *L. pseudotheobromae* (n= 2) depositadas en el banco de genes del (Genbank) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, con referencia de acceso KF294005 para *Lasiodiplodia theobromae* (542 pb) KU507480, KY052971 y KY052959 para *L. jatrophiicola*, *L. crassipora* y *L. pseoditheobromae* respectivamente. Mientras que, las cinco secuencias del género *Botryosphaeria* se homologaron en un 99 % con la especie *Botryosphaeria rhodina* EF564147 y la secuencia de *Nigrospora* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp. y *Cyphellospora* spp. se homologaron a las especies *Nigrospora sphaerica* MH290447, *Fusarium keratoplasticum* KR425650, *Colletotrichum gloesporoides* GU066701 y *Cyphellospora eucalipti* GQ303274. Las secuencias genéticas de *L. theobromae* encontradas en el presente trabajo, fueron depositadas en el NCBI con número de acceso MK886711 para la región ITS y con numero de acceso de MK531139 para el factor de elongación 1 alfa. De acuerdo a las secuencias obtenidas y al análisis espacial de los hongos, podemos relacionar las especies y en que estructura del árbol se encontraron (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución de los hongos en las diferentes estructuras de los arboles prospectados de las plantaciones de cítricos en la Zona centro de Tamaulipas.

Municipio	Huerta	Variedad	Patrón	Estructura muestreada	Hongo aislado
Victoria	San Francisco	Ortanique	Volka	Rama	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Victoria	Real del 14	Naranja	Agrio	Fruto	<i>Lasiodiplodia</i>
Victoria	Real del 14	L	Volka	Raiz	<i>Fusarium</i>
Padilla	San Juan	Murcott	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Padilla	San Juan	N. Valencia	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Padilla	San Juan	L Italiano	Agrio	Rama	<i>Lasiodiplodia jatrophae</i>
Padilla	San Juan	L Italiano	Volka	Rama	<i>Lasiodiplodia jatrophae</i>
Guemez	Las Lomas	Limon 8A	Agrio	Rama	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabel	L Italiano	Volka	Rama	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabel	L Italiano	Volka	Fruto	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabel	N. Valencia	Volka	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabel	N. Valencia	Volka	Rama	<i>Botryosphaeria rhodina</i>
Guemez	Los Cascabel	N. Valencia	Volka	Fruto	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabel	L Italiano	Volka	Rama	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabel	L Italiano	Volka	Raiz	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
Llera	La Cecilia	Limon 8A	Volka	Rama	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Llera	Las Angélicas	N. Valencia	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Macabeos III	L Italiano	Agrio	Rama	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>
Guemez	Macabeos III	L Italiano	Agrio	Raiz	<i>Cyphellophora eucaipti</i>
Victoria	El Huichol	Limon 8A	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia jatrophae</i>
Victoria	El Huichol	Limon 8A	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Victoria	El Huichol	Limon 8A	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Victoria	San José	N. Valencia	Agrio	Rama	<i>Botryosphaeria rhodina</i>
Padilla	El Tejón	Torónja Doble	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Padilla	Macarena	N. Valencia	Cleop	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Padilla	Macarena	L Italiano	Agrio	Fruto	<i>Lasiodiplodia crassipora</i>
Padilla	Caluche	L Italiano	Volka	Tronco	<i>Lasiodiplodia jatrophae</i>
Guemez	Providencia	L Italiano	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Villa de casas	Santa Isabel	L Italiano	Agrio	Tronco	<i>Lasiodiplodia jatrophae</i>
Victoria	El 12	Marsh	Agrio	Rama	<i>Botryosphaeria rhodina</i>
Victoria	Tres Sabinos	Limon 8A	Agrio	Rama	<i>Lasiodiplodia jatrophae</i>
Victoria	El Encino	L Italiano	Volka	Tronco	<i>Lasiodiplodia crassipora</i>
Victoria	El Anhelito	L Italiano	Agrio	Hojas	<i>Nigrospora sphaerica</i>

Por otro lado, los análisis de PCR en tiempo real para detectar a *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Figura 6), nos muestran que la bacteria está presente en el 79% de las cultivares en estudio interactuando con los hongos fitopatógenos y de las cuales el 61 % son de limón italiano, el 25% de naranja valencia, el 7% de toronja y de mandarina el 7%. Se muestra en el cuadro 5 la distribución de la bacteria y los hongos.

Cuadro 5. Distribución de la bacteria del HLB *Candidatus Liberibacter* en los diferentes cultivares y huertas con presencia de hongos fitopatógenos en la Zona centro de Tamaulipas.

Municipio	Huerta	Variedad	Bacteria HLB	Hongo aislado
Victoria	San Francisco	Ortanique	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Victoria	Real del 14	Naranja	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Victoria	Real del 14	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Fusarium keratoplasticum</i>
Padilla	San Juan	Murcott	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Padilla	San Juan	N. Valencia	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Padilla	San Juan	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia jatrophi/a</i>
Guemez	Las Lomas	Limon 8A	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabeles	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabeles	N. Valencia	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Guemez	Los Cascabeles	N. Valencia	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Botryosphaeria rhodina</i>
Guemez	Los Cascabeles	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Colletotrichum gloeosporoides</i>
Llera	La Cecilia	Limon 8A	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Llera	Las Angélicas	N. Valencia	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>

Guemez	Macabeos III	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>
Guemez	Macabeos III	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Cyphellophora eucalipti</i>
Victoria	El Huichol	Limon 8A	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia jatrophico/a</i>
Victoria	El Huichol	Limon 8A	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Victoria	San José	N. Valencia		<i>Botryosphaeria rhodina</i>
Padilla	El Tejón	Toronja Doble Rojo	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Padilla	Macarena	N. Valencia	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Padilla	Macarena	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia crassipora</i>
Padilla	Caluche	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia jatrophico/a</i>
Guemez	Providencia	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
Villa de casas	Santa Isabel	L. Italiano		<i>Lasiodiplodia jatrophico/a</i>
Victoria	El 12	Marsh		<i>Botryosphaeria rhodina</i>
Victoria	Tres Sabinos	Limon 8A	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Lasiodiplodia jatrophico/a</i>
Victoria	El Encino	L. Italiano		<i>Lasiodiplodia crassipora</i>
Victoria	El Anheló	L. Italiano	<i>Candidatus liberibacter</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>



Figura 6. Ubicación geográfica de los huertos comerciales de cítricos donde se localizó a *C. liberibacter asiaticus* asociado con *L. theobromae*.

5.4 Árbol filogenético de Neighbor-Joining.

La construcción del árbol filogenético permitió agrupar las 17 secuencias ITS encontradas en ocho grupos o clados de acuerdo con la homología en las secuencias (Figura 7). Mientras que en el árbol filogenético de las secuencias TEF1 alfa, se agruparon en tres clados principales (Figura 8). En ambas construcciones se muestran una estrecha relación genética entre los aislados, Aunque las muestras provenían de diferentes municipios y localidades. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de unión de vecinos de Neighbor-Joining. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon

utilizando el método de máxima probabilidad compuesta. El análisis involucró 17 secuencias de nucleótidos. Las posiciones de codón incluidas fueron 1^a + 2^a + 3^a. Se eliminaron todas las posiciones que contenían lagunas y datos faltantes. Hubo un total de 507 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en Mega 7.

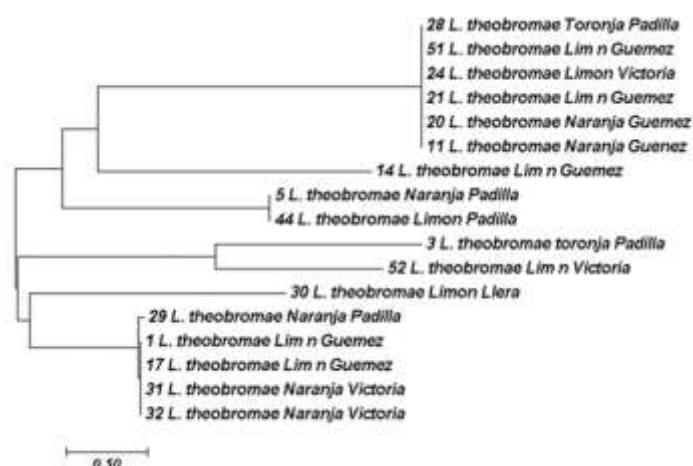


Figura 7. Análisis filogenético generado de las secuencias de la región del ITS ribosomal de las cepas aisladas de *L. theobromae*. El dendograma se obtuvo a partir del análisis por el método del ‘vecino más cercano’ basado en el método de Neighbor-Joining utilizando el programa Mega 7.

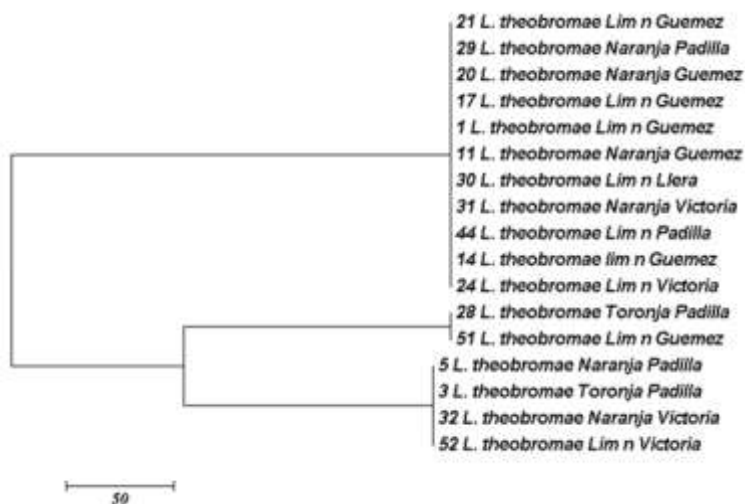


Figura 8. Análisis filogenético generado de las secuencias del factor de elongación EF-1α del hongo *L. theobromae*. El dendograma se obtuvo a partir del análisis por el método del ‘vecino más cercano’ basado en el método de Neighbor-Joining utilizando el programa Mega 7.

6. DISCUSIÓN

En este estudio las pudriciones de frutos y muerte descendente de ramas de los cítricos, así como otros síntomas son asociadas con hongos de la familia Botryosphaeriaceae y es la primera exploración de especies de esta familia donde estos síntomas están asociadas a *Lasiodiplodia* sp., que comúnmente produce enfermedades de ramas secas y en la mayoría de los frutales con muertes regresivas y súbitas siendo una enfermedad común en las zonas productoras. La especie de esta familia con mayor frecuencia en la zona de estudio fue *L. theobromae*, quien causa uno de los mayores problemas en huertas como es la pudrición del pedúnculo en frutos causando caída prematura y donde se reporta como una enfermedad de la postcosecha. (Slippers *et al.*, 2005). Esta especie se encuentra asociada a *Colletotrichum gloeosporioides* que causa la llamada antracnosis en frutos de diversos cultivares. En este estudio este fitopatógeno se localizó en las raíces de un árbol de limón italiano, aunque los ataques de este patógeno se han reportado en frutos. Además, se han descrito infecciones en pedúnculo, ramos, hojas (Oliveira, 2003). Por otro lado, Morales (1996) reportó diferentes variantes de *Colletotrichum gloeosporioides*, que se obtuvieron de frutos de aguacate con diferentes tipos de síntomas y lugares de procedencia, lo que reflejó un grado de variabilidad alto entre las poblaciones de este patógeno. En su investigación Gutiérrez *et al.* (2001), aislaron al hongo *Colletotrichum gloeosporioides* de la fruta del mango con síntomas de antracnosis con una severidad de 100%. En este trabajo también se reporta la presencia de *Fusarium keratoplasticum*, este hongo se localizó en las raíces del limón italiano sobre patrón volkameriana y está asociado a la pudrición radical y muerte súbita que sufren los árboles cítricos según Vial (2005).

Así mismo el hongo *Fusarium* spp., ataca diversidad de cultivos económicamente importantes en distintas regiones productoras. Este fitopatógeno, origina afecciones como marchitamientos del sistema vascular ocasionando el colapso y muerte de las plantas, el hongo se establece a nivel radicular atraído a por los exudados radicales que satisfacen los requerimientos nutricionales del fitopatógeno (Nelson 1981). Por otro lado, un estudio llevado a cabo por Felipe *et al.*, (2005) encontró que *Fusarium* spp., fue hallado en huertas de cítricos y en arvenses, comenta que provoca afectaciones a los tallos. y en poscosecha. Parra (2019), observó en el Valle del Yaqui, en México Muerte de naranjos (*Citrus sinensis* L. Osberck) var. “Valencia” Para identificar al patógeno, recolectó de árboles con síntomas, material vegetal como hojas, ramas y raíces, en los estudios en raíces, observaron oscurecimiento del sistema vascular. La caracterización macro y microscópicas en todos los aislados, fueron las típicas del género *Fusarium*. Otros hongos encontrados en este estudio: son *Cyphellophora eucalipti* en raíz de limón italiano y *Nigrospora sphaerica* en hoja de limón italiano, el primero se observó como levaduras negras en las raíces, tal vez su papel en los daños no es muy considerable, este hongo es muy común encontrarlo en la piel humana y se nutre de carbohidratos (Feng *et al.*, 2014). Mientras que *Nigrospora sphaerica*, se recolectó de hojas marchitas de limón italiano es considerado como un parásito débil y en la mayoría de los casos se comportan como saprófitos. Tanto como *C. eucalipti* y *N. sphaerica* fueron encontrados en un 2.94% por lo que no se considera evidencia en su participación en los daños de deterioro de los arboles estudiados. Por otra parte, en el presente trabajo, se precisó la presencia de la bacteria *C. liberibacter asiaticus* en psílicos en las huertas prospectadas y es el agente causal del HLB, esta se encontró en el 79 % de los cultivares muestreados donde también se localizó la presencia de hongos fitopatógenos y en el cual el 61% corresponden a limón italiano. Cabrera *et al* en el 2017, en su investigación, sugiere que

la bacteria *Candidatus liberibacter asiaticus* puede modificar de alguna forma los mecanismos de resistencia o de defensa de la planta a favor de fitopatógenos como hongos, algas entre otros y de ahí desatar la enfermedad con gran magnitud. De este modo, se deduce que la bacteria pudiera provocar una deficiencia inmunológica o de resistencia de los cítricos. Por otra parte, establece que el grado de incidencia de ramas secas está en función del avanzado desarrollo de una enfermedad y del intenso debilitamiento, presente principalmente, en aquellas plantas que muestran síntomas de HLB asociadas con la presencia de hongos fitopatógenos, por lo que se ha demostrado una interacción positiva acelerando el deterioro hasta la muerte que sufren los cítricos, principalmente cuando son afectados al mismo tiempo por *C liberibacter asiaticus* y *Lasiodyplodia theobromae*. Cabrera *et al.*, 2012, comprobó, mediante tratamientos de inoculación de hongos fitopatógenos en plantas sanas y en plantas enfermas con HLB, observando como en estas últimas plantas, se presentaron daños más severos, ocasionados por estos hongos patógenos, manifestando principalmente una muerte regresiva extrema. Nariani y Singh (1971), adjudicaron a los hongos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodyplodia theobromae* y *Fusarium* spp., como responsables del rápido avance del deterioro y de la muerte regresiva de los cítricos tras iniciada la defoliación causada por el HLB, responsables del deterioro final de la planta. Por lo que se pudiera reconocer que estos hongos patógenos, presentes en los cítricos, ejercen considerablemente un papel importante en la defoliación inicial.

Es importante considerar a los factores involucrados en el grado de susceptibilidad al HLB entre las variedades de cítricos. El principal factor de susceptibilidad que se involucra en la enfermedad del HLB, es que la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus*, infecta todas las especies del género *Citrus* (Bové 2006). Sin embargo, dentro de las variedades cítricas, se encontró en un estudio realizado por Velázquez *et al.*, (2012) donde se analizó el efecto de

Candidatus Liberibacter asiaticus, en cítricos dulces y agrios a partir de indicadores de relación de efectos asintomáticos y sintomáticos en proporción al área y anchura del floema, así como, la acumulación de almidón, dictaminaron que la lima mexicana es más vulnerable a la infección del HLB. Un efecto dentro de los tejidos vegetales producido por CLas es que induce la producción y acumulación intensa de almidón en las células parenquimatosas; esta acumulación es excesiva en cítricos agrios (Limón), que como resultado origina la degradación y colapso del floema estimulado por la hiperplasia en las células del tejido parenquimatoso del floema, es causa de la muerte súbita (Esquivel *et al.*, 2012).

Otro factor importante en la susceptibilidad a la enfermedad es que las especies cítricas que se cultivan comercialmente, utilizan diferentes patrones o porta injertos, estos son un importante factor debido a que estos atribuyen propiedades agronómicas convenientes para una mejor resistencia o tolerancia a distintas condiciones bióticas y abióticas (Albrecht, 2012), de tal forma que la planta debe resistir cualquier enfermedad incluyendo el HLB y por tanto debe ser tolerante al estrés. Es por eso el uso de ciertos patrones para los injertos comerciales como en Tamaulipas el más usado por su tolerancia al estrés hídrico y fitopatógenos del suelo es el naranjo agrio (*C. aurantium*). Flores *et al.*, (2015), determinaron que la concentración de la bacteria del HLB, es directamente proporcional con la severidad de la enfermedad. Esta proporción relativa está asociada con las alteraciones producidas a nivel celular, es decir, a partir del daño producido a nivel histológico que genera *Candidatus Liberibacter asiaticus* en el floema, por lo que se consideró que el portainjertos puede influir en el desplazamiento de la bacteria. Relacionado con lo anterior, Esquivel *et al.*, 2015 encontró que el incremento de la gravedad en los síntomas de HLB fue más alto en árboles de Limón mexicano injertados sobre *Citrus macrophylla*, así también, encontró que la más alta densidad de la bacteria *C. liberibacter* se halló en el limón mexicano injertado en *C.*

aurentium donde se produjo un aumento relevante en la hiperplasia del floema, dicho incremento fue estimado con la anchura del floema. El limón mexicano, Limón persa y Naranja dulce en las distintas combinaciones con portainjertos, manifestaron diferentes síntomas desde moderados a leves siendo evaluados por 32 meses. A nivel histológico en los tejidos del floema, las células parenquimatosas de la nervadura central de las hojas de limón mexicano injertado en *C. macrophylla* y en *C. volkameriana*; mostraron hiperplasia y el subsecuente descontrol del sistema vascular. Demostrando que, el limón mexicano fue la variedad cítrica más afectada por *C. liberibacter*. Dicho lo anterior, se concluye que la bacteria del HLB es transmitida por medio de los injertos y a través del tránsito de plantas infectadas (Futurcrop 2018). Hasta ahora el limón mexicano es la variedad más afectada por el HLB en México (Robles *et al.*, 2011).

Otro factor es la fluctuación de las poblaciones del insecto vector *Diaphorina citri* que está estrechamente relacionado con la brotación de retoños jóvenes en las plantas cítricas, porque las hembras ovipositan y se alimentan particularmente en estos y además también se alimentan ahí, por eso la preferencia del insecto a distribuirse en el haz de la hoja de los brotes susceptibles, independiente del punto cardinal (Gómez y Mendoza 2018).

Un factor importante a lo largo del año son las condiciones de temperatura favorables para el desarrollo de *Diaphorina citri* con la procreación de más de once generaciones por año. En Tamaulipas como en San Luis Potosí y Veracruz las condiciones agroclimáticas en el año son favorables para la producción de brotes vegetativos de cítricos que favorecen la reproducción y desarrollo del insecto (Quijano *et al.*, 2013). Entonces a estos factores de fluctuación de las poblaciones del insecto y las condiciones agroclimáticas favorables, está directamente relacionada a otro como principal fuente de dispersión del psílido vector y son

las corrientes de vientos, transporte pasivo de psílidos adultos desplazándolos de plantas infestadas, a huertas sanas (Arévalo *et al.*, 2016).

En cuanto a factores genéticos en plantas hasta hoy no se conocen mecanismos naturales de resistencia a la bacteria del HLB, sin embargo, Alqueazar y Peña (2016), creen que la única estrategia más viable y sustentable a largo tiempo para lograr una resistencia al HLB, consta en incorporar genes de resistencia en todas las variedades y porta injertos de plantas cítricas. Por otra parte, Gao *et al.*, (2015), declara que se podría trabajar con la identificación de genes relacionados con la Resistencia Sistémica Adquirida (RSA) de plantas, clonarlos utilizando técnicas biomoleculares para insertarlos en los cítricos y así se podría coadyuvar como parte de una estrategia integral del manejo del HLB, comentando que encender estos mecanismos de resistencia, se inicia mediante el reconocimiento de las células efectoras ejecutando respuesta por medio de efectores como flagelina, quitinas, glucoproteínas y lipopolisacáridos conocidos como Patrones Moleculares Generales Asociados a Patógenos (PMGAP).

Ventura y Gutiérrez en 2019, desarrollaron constructos con genes específicos constitutivos de la planta, como parte de la etapa inicial para generar plantas transgénicas, resistentes a *C. liberibacter asiaticus*. Los genes seleccionados fueron AZI-1, 1-inductor del ácido 'Azelaic', CsNDR-1 y el gen asociado con la síntesis de proteína 1 relacionada con la patogenicidad (PR-1). Estos genes se seleccionaron de acuerdo a la respuesta de los cítricos hacia una extensa gama de patógenos. Sin embargo, solo quedó en etapa de clonación dejando la posibilidad de que tal vez estos genes, podrían ser activados utilizando técnicas de ingeniería genética y ser usados para generar resistencia de la planta hacia diversos fitopatógenos entre ellos la bacteria *Candidatus liberibacter asiaticus*.

Otro factor genético es con respecto al insecto y es la adquisición de resistencia a plaguicidas, esta es hereditaria y se transmite de generación en generación. La frecuencia de genes de resistencia y la dominancia de los mismos pueden incrementar conforme la población se expone a un insecticida y a la dosis aplicada, por lo anterior es posible que el riesgo de que *D. citri* desarrolle resistencia a plaguicidas es muy alto (Ortega *et al.*, 2013).

Tiwari *et al.*, 2011, comenta que desde que se reportó la presencia del insecto vector en huertos de cítricos en Florida, se ha manejado un programa de control con organofosforados y argumentan que esta presión de selección ha dado como resultado la disminución a la sensibilidad a estos insecticidas. Los insectos desarrollan resistencia a la molécula que causa directamente la toxicidad en la población.

6.1 Manejo de las plantaciones de cítricos con la enfermedad del HLB.

Desde el punto de vista sanitario se considera que un buen manejo de una enfermedad, es cuando se logra retardar la afección del agente patógeno, se logra la reducción de la carga de inóculo inicial o un letargo que le impide a la enfermedad desarrollarse en cierto tiempo. El manejo de una enfermedad se fundamenta en el conocimiento de la misma y en las características principales que determinan el desarrollo de un padecimiento, como lo es, la vulnerabilidad del hospedero, el nivel de virulencia del patógeno y las condiciones ambientales favorables para su desarrollo (Ploetz, 2007). En el caso del manejo del HLB es una enfermedad muy complicada y difícil de manejar, por lo que requiere de una estrategia integrada, como es el uso de material vegetal de propagación y plantas certificados, también, es importante la eliminación de todas las fuentes de inóculo, como plantas enfermas e insectos vectores. En este sentido, González *et al.* (2010) realizó una investigación dirigida

a sentar las bases para el manejo del HLB en Cuba, entre otras cosas, estudio el comportamiento de la población del psílido vector y la incidencia con los enemigos naturales y predadores. En este ámbito, se logró identificar a seis especies de depredadores del psílido, entre estos a un parasitoide himenóptero y un hongo entomopatógeno, asociados a los diferentes estadios de desarrollo del insecto.

Cabrera *et al.* (2017), implementó acciones para la recuperación de árboles enfermos con hongos y HLB a la vez, en esta estrategia realizó actividades como la poda de ramas muertas, aspersiones foliar y de raíz de fungicidas sistémicos y de contacto, tal como, benomilo y oxiclورو de cobre, principalmente por la presencia de hongos como *Lasiodiplodia theobromae* y alga roja. Además de aplicaciones de plaguicidas como imidacloprid beta cyfluthrin y malathion para el control del psílido vector *Diaphorina citri* y otras plagas, tratamientos con micro y macro elementos con aplicaciones foliares y al suelo. Se constató que, por más de ocho años, se presentó una mejora en las condiciones fitosanitarias del plantío. Reportando que es la primera experiencia en Cuba con resultados exitosos en la recuperación de una plantación de naranja Valencia enferma con HLB y otras afecciones.

7. CONCLUSIÓN.

El cultivo de los cítricos en la región del centro del estado de Tamaulipas, es afectado por siete diferentes hongos fitopatógenos que causan deterioro y muerte descendente de árboles, de acuerdo a la caracterización e identificación molecular empleada, la especie con mayor frecuencia en los diferentes cultivares cítricos es *Lasiodiplodia theobromae* y por tanto factor importante a considerar en la sanidad del cultivo. La información generada en esta investigación permite establecer la relación de esta especie y su asociación a *Candidatus liberibacter asiaticus*, lo anterior permite señalar la pérdida de tolerancia de los árboles infectados con *C. Liberibacter* y la presencia de *L. theobromae*.

8. LITERATURA CITADA

- Aimé, S., C. Alabouvette, C. Steinberg y C. Olivain, C. 2013. The endophytic strain *Fusarium oxysporum* Fo47 a good candidate for priming the defense responses in tomato roots. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26:918-926.
- Adesemoye, A., Eskalen, A., Faber, B., O'Connell N. 2011. Current knowledge on *Fusarium* dry root rot of *citrus*. *Citrograph* 2(7):29-33.
- Albrecht, U. and Bowman, K. D. (2012). Tolerance of tri, foliate citrus rootstock hybrids to *Candidatus liberibacter asiaticus*. *Scientia Horticulturae* 147:71–80.
- Alquezar, B. y L. Peña. 2016. Estrategias biotecnológicas para hacer frente al HLB, la mayor amenaza de la citricultura española. *Phytoma España La revista profesional de sanidad vegetal*. 286: 48
- Altieri, G., G. Renzo and C., Lanza. 2005. Imazalil on-line control in post-harvest treatments of citrus fruit. *Acta Horticulturae* 682, 1773-1780.
- Ahrens, U. and E. Seemüller. 1992. Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832.
- Amiri, A.; Bompeix, G. 2005. Diversity and population dynamics of *Penicillium* spp. on apples in pre- and postharvest environments: Consequences for decay development. *Plant Pathology* 54, 74–81.
- Arévalo, E., King, W., Fuentes, O., Palacino, J.P. 2016. Vigilancia del huanglongbing (HLB) de los cítricos y su vector *Diaphorina citri* (Hemiptera: liviidae) en Colombia. Subgerencia de Protección Vegetal. Dirección Técnica de Epidemiología y Vigilancia Fitosanitaria. Medellín. Pp 202.
- Barnett, L. H., and B. B. Hunter. 2006. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Fourth Edition. Am. Phytopathol. Soc. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Benyahia, H.; Jriji, A.; Smaili, C.; Afellah, M.; Lamsetef, Y.; Timmer, L.W. 2003. First report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing wither tip on twigs and tear stain on fruit of citrus in Morocco. *Plant Pathology* 52: 798.
- Bové, J.M. 2006. Huanglogbing: A destructive, newly. emerging, century-old disease of citrus. *Jour. Plant. Pathol.* 88 (1): 7 – 37.
- Burgess, T. I.; Barber, P. A.; Mohali, S.; Pegg, G.; De Beer, W. y Wingfield, M. J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. From the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98: 423-435.
- Cabrera R.I., Ferrer J., Peña I., Zamora V. 2012. *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., sintomatología, afectaciones e impacto en la citricultura cubana actual. *Levante Agrícola* 51 (412):254-261.

- Cabrera, R., J. Ferrer, I. Peña, A. Banguela, S. Herrera, M.R. Hernández y G. Otero. 2016. Presencia y daños causados por *Lasioidiplodia theobromae* en los frutales de diferentes provincias y localidades de Cuba. Año LV - LEVANTE AGRICOLA 4º Trimestre Núm 434: 70-74
- Cabrera, R., M. Betancourt, J. Ferrer, O. Hernández, N.A. Reyes, J. Piñero, V. Pérez, R. Llauger y S. Herrera. 2017. Recuperación de una plantación de naranjo [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] cv. 'Valencia Late' con huanglongbing y otras enfermedades: Una experiencia cubana. LEVANTE AGRICOLA 1er Trimestre 2017 Depósito Legal: V-144-1962.
- Canales, E., Coll Y., Hernández I., Portieles R., Rodríguez M., López Y. 2016. *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Causal Agent of Citrus Huanglongbing, Is Reduced by Treatment with Brassinosteroids. PLoS ONE 11(1): 2 - 6
- Comision Nacional de Agua Tamaulipas 2020. subdirección general técnica. Pp 6 - 8
- Contreras N., A. Rondon. 1985. Etiología de la mancha parda de los cítricos en Venezuela. Agronomía Tropical (Venezuela). v. 35 (1-3) p. 111-116.
- Cruz, M. 2000. Efecto de patrones de cítricos tolerantes al virus tristeza de los cítricos en el contenido nutrimental en naranja valencia (*Citrus sinensis*. Osbeck). Universidad Autónoma de Nuevo León Facultad de Agronomía división de estudios de posgrado. Pp 11 - 13
- Droby S., Vinokur V., Weiss B., Cohen, L., Daus A., Goldschmidt E. and Porat R. 2002. Induction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. Phytopathology 92, 393-399.
- El-Ghaouth A. (1997). "Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases", en puma' of Industrial Microbiology& Biotechnology.19 (3): 160-162.
- Elsen, A., S. Declerck and D. De Waele. 2011. Efecto de tres hongos micorriza arbusculares sobre la infección de *Musa* con el nematodo nodulador de las raíces (*Meloidogyne* spp.). INFOMUSA Vol 11, N° 1: 317-320.
- Esquivel, F., Valdovinos-Ponce G., Mora-Aguilera G., Gómez-Jaimes R., Velázquez-Monreal J. J. Manzanilla-Ramírez M. Á., Flores-Sánchez J. L., López-Arroyo J. I. 2012. Análisis Histológico Foliar de Cítricos Agrios y Naranja Dulce con Síntomas Ocasionados por *Candidatus Liberibacter asiaticus*. Agrociencia 46: 769-782.
- Esquivel, F., G. Mora, G. Valdovinos, M. A. Gutiérrez, J. Velázquez y E. Loeza. 2015. Dinámica de la concentración bacteriana de *Candidatus liberibacter asiaticus* y su efecto en la expresión sintomática e histológica en cítricos. Memoria de avances de investigación Fitopatología Colegio de Posgraduados. Pp 220-222
- Faraj, A. A., Adel, O. A., Addalla, R. B. R. and Aldukali, A. A. (2016). Investigation of seedborne fungi associated with cucurbit seeds in two different regions of Libya: Al Sastil, 10(15), 37-53.
- López, L., I. Gutiérrez, E. Atahuichi, V. Ibrahim, Y. Santana y C. Casola. 2005. Organismos patógenos en especies de arvenses de cuatro cultivares de cítricos en la provincia deiego de Ávila. FITOSANIDAD vol. 9, no. 3: 54.

- Feng P., M. Javad and B. Gerrits. 2014. *Cyphellophora* and its relatives in *Phialophora*: Biodiversity and possible role in human infection. *Fungal Diversity* 65(1):17-45.
- Flores, J., G. Mora, E. Loeza, J. López, S. Domínguez, G. Acevedo y P. Robles. 2015. Pérdidas en Producción inducidas por *Candidatus Liberibacter asiaticus* en Limón Persa en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 33: 195-210.
- Fogliata, G., Martínez CV, Acosta ME, Muñoz ML, Ploper LD. 2013. First report of *Fusarium* rot caused by *Fusarium oxysporum* on lemon in Tucumán, Argentina. *Plant Disease*. 97(7):989-991
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Major Tropical Fruits Statistical Compendium 2019. Rome.
- Food and Agricultura' Organization of the United Nations. FAO. (2017). Estadísticas anuales 2006. [En línea]. Disponible en: http://wwwfao.org/ES/ESC/es/15/238/highlight_243.html.
- Futurcrop (2019). Prevención del Huanglongbing (HLB) a través del control del ciclo biológico y tratamiento de la Diaphorina citrus. Recuperado de <http://futurcrop.com/es/blog/post/prevencion-del-huanglongbing-hlb-a-traves-del-control-del-ciclo-biologico-y-tratamiento-de-la-diaphorina-citrus>.
- García, M., E. Almanza, P. Loeza, H. Godoy, E. Villordo, J. Pons, M. González y J. Anaya. 2010. Producción de chile ancho injertado sobre criollo Morelos 334 para el control de *Phytophthora capsici*. *Rev. Agrociencia*. 44(6):701-709.
- Gao Q., S. Zhu, P. Kachroo and A. Kachoroo. 2015. Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 6: 228. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>.
- González, M., A. Anaya, A. Glenn, M. Macías, B. Hernández y R. Hanlin. 2009. *Muscodora yucatanensis*, a new endophytic ascomycete from Mexican chakah, *Bursera simaruba*. *Mycotaxon* Volume 110, pp. 363–372.
- González, C., M. Gómez, M. Fernández, D. Hernández, J. L. Rodríguez, L. Batista, 2010. *Diaphorina citri* Kuw. (Hemiptera: Psyllidae), behaviour and natural enemies in Cuban citriculture. *Proceedings 17th IOCV Conference, Riverside, USA: IOCV: 203-205*.
- Gómez, A., C. Mendoza. 2018. Análisis de experiencias en el mundo sobre la investigación y el manejo del huanglongbing (hlb) de los cítricos y la aplicación en Colombia. Universidad Nacional abierta y a distancia – Unad Escuela de Ciencias Agrícolas, pecuarias y del medio ambiente- Ecapma especialización en biotecnología agraria Cead – Medellín. Pp 41-50
- Gottwald, T., J. Graham, M. Irey, T. McCollum, B. Wood. 2012. Inconsequential effect of nutritional treatment on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Crop Protection* 36: 73-82.
- Gutiérrez, J., D. Nieto, D. Téliz y Zavaleta E. 2001. Características de Crecimiento, Germinación, Esporulación y Patogenicidad de Aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de Frutos de Mango (*Mangifera indica* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología*. Volumen 19, Número 1: 91-93

- Herrera, L., H. Grillo, A. Pulgarón, B. Ruiz, G. Santos. 1993. La poda de saneamiento en cítricos. Centro Agrícola 20:33-44.
- Ismail, M.; Zhang, J. Z. 2004. Post-harvest citrus diseases and their control. Outlooks Pest Management 15, 29-35.
- Jin, K., Ch. Gyung Ja, P. Joong, T. Heung and Y. Kwang. 2001. Actividad contra hongos fitopatógenos de phomalactone aislado de *Nigrospora sphaerica*. Pest Management Science SCI. Volumen 57, Número 6. Pp 554-559.
- Johnson G. I. 1994. Stem end rot. Compendium of tropical fruit diseases. American Phytopathological Society. USA APS Press. Pp 31 – 41.
- Khanzada, M. A., A. M. Lodhi, and S. Saleem. 2004. Pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Fusarium solani* on mango. Pak. J. Bot. 36: 181-189.
- Kusari, S., Ch. Hertweck and M. Spiteller. 20012. Chemical Ecology of Endophytic Fungi: Origins of Secondary Metabolites. Chemistry and Biology Volume 19. Pp 792-798.
- Nariani, T.K. and Singh G.R. 1971. Epidemiological studies on the citrus die- back complex in India. Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Ser. 37B (5): 365-371.
- Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. Fungalwilt diseases of plants. Academic Press. New York. p 51 – 80.
- Netto, M.S.B.; Assunção, I.P.; Lima, G.S.A.; Marques, M.W.; Lima, W.G.; Monteiro, J.H.A.; Michereff, S.J.; Phillips, A.J.L. y Câmara, M.P.S. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. Fungal Diversity. pp 2
- Nisa, H., A. Kamili, I. Nawchoo, S. Shafi, N. Shameem and S. Bandh. 2015. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: A review. Microb Pathog 82:50-9.
- Micheref, S. 2013. Etiología y Epidemiología de las Especies (Basado en el Análisis Filogenético) de *Colletotrichum* y Botryosphaeriaceae de Papaya y Mango. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 31. Pp 52-53
- Morales, J. 1996. Caracterización cultural, morfológica, patogénica y molecular de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. causante de la antracnosis del aguacate en Michoacán. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 96 p.
- Morales, V. y M. Rodríguez. 2009. Micobiota endófitica asociada al cultivo del mango 'Haden' (*Mangifera indica* L.) en el oriente de Venezuela. Revista UDO Agrícola 9 (2): 393-402.
- Kirk, P.M. P. F. Cannon, J. C. Davis and J. A. Stalpers. 2001. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi. 9a eds. CAB International, Wallingford, Oxon, UK. 656 pp.
- Li, W., J. S. Hartung and L. Levy. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus huanglongbing. Journal of Microbiological Methods. Volume 66, Issue 1, Pp 104-115.

- Machado, M: A; E. Locali and H. Colleta. 2010. *Candidatus Liberibacter* spp., agentes do huanglongbing dos citros. Citrus Research and Technology, Cordeirópolis, v.31, n.1, p.25-35.
- Marques, M. W., N. B. Lima, M. A. Morais, M. A. G. Barbosa, B. O. Souza, S. J. Michereff, J. L. Phillips and M. P. Câmara. 2013. Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. Fungal Diversity 61:181-193.
- Martínez, K., C. Ceceña, D. Gonzalez y O. Grimaldo. 2015. Control de la marchitez *Fusarium oxysporum* f. sp. *Medicaginis* en alfalfa (*Medicago sativa* L.) en el valle de Mexicali, Baja California. OmniaScience Omnia Publisher Pp 18.
- McGover, R. J., T. E. Seijo, K. Hendricks, P. D. Roberts. (2015). New report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing post bloom fruit drop on citrus on Bermuda. Canadian Journal of plant pathology 34 (2): 187 – 194.
- Organismo internacional regional de sanidad agropecuaria (OIRSA). 2009. Plan regional de contingencia para la prevención y contención del Huanglongbing o greening de los cítricos en los países miembros de OIRSA. Cuarta edición. Pp. 223-230
- Oliveira, R. 2003. Etiología y control químico de la Aceituna Jabonosa causada por *Colletotrichum* spp. Tesis doctoral, ETSIAM, Universidad de Córdoba. 260 pp.
- Oliveira, R., J. Moral, K. Bouhmidi, A. Trapero. 2005. Caracterización morfológica y cultural de aislados de *Colletotrichum* spp. causantes de la Antracnosis del olivo. Bol. San. Veg. Plagas, 31: 531-548.
- Ortega, A., A. Villegas, A. J. Ramirez y E. E. Mendoza. 2013. Abundancia estacional de *Diaphorina citri* en plantaciones de cítricos en Cazones, Veracruz. México. Acta Zool. Mexicana 29(2): 317-333.
- Parra, F., J. García, G. Aviña y S. De Los Santos. 2019. Primer reporte de marchitamiento por *Fusarium* en *Citrus sinensis* var. Valencia en el Valle del Yaqui, México. Revista Mexicana de fitopatología vol.37 no.1. pp 195-195
- Pérez, C., S. Rojas y V. Montes. 2011. Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agro ecosistemas de praderas en el caribe colombiano. Rev. Colombiana cienc Anim. 3(2). Pp 367-369
- Phillips, A. J. L., A. Alves, S. R. Pennycook, P. R. Johnston, A. Ramaley, A. Akulov and P. W. Crous. 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. Persoonia 21:29-55.
- Ploetz, R. 2007. Diseases of Tropical Perennial Crops: Challenging Problems in Diverse Environments. Plant Dis. 91 (6): 644-663.
- Pocasangre L., R.A. Sikora, V. Vilich y R.P. Schuster. 2000. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). INFOMUSA Vol. 9, No. 1. pp

- Posada, F. J., F. C. Chaves, T. J. Gianfagna, M. Pava, P. Hebbar. 2010. Establecimiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* como endófito en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica vol.13 no.2. pp 21-24
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. [Description of pathogenic fungi and bacteria]. Commonwealth Mycological Institute. CAB International CABI Bioscience. No.52 pp. 519 pp Bakeham Lane, Egham, Surrey, England.
- Quijano J. A., I. Torres, J. López, R. G. Guevara y R. Peniche. 2013. Modelo de la dinámica poblacional de *Diaphorina citri* Kuwayama, vector de la enfermedad HLB de los cítricos. Universidad Autónoma de Querétaro, Facultad de Ingeniería. P. 67
- Rehner, S. A. and Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps teleomorphs*. Mycologia 97: 84–89.
- Robles, M., J. Vázquez. M. Manzanilla, M. Orozco, R. Flores y V. Medina. 2011. El HLB en arboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] Su dispersión y síntomas en Colima, México Segundo simposio nacional sobre investigación para el manejo del psílido asiático de los cítricos y el HLB en México. Montecillos Edo. De México. pp 43-53.
- Rodríguez, R., White, J., Arnold, A.E. & Redman, R. 2009. Fungal endophytes: Diversity and ecological roles. New. Phytol. 182, 314-330.
- Rumbos, R. Ramos G. y gomez A. 2005. La muerte regresiva en plantas de cacao. INIA Divulga 6 aspectos fitosanitarios. Centro de Investigaciones Agrícolas del Estado Zulia Venezuela. Pp-114-118
- Rumbos, R, Moya A, Quevedo H, Romero K, Parra D, Gutiérrez B, Sosa D, Monsalve LS, Pérez S. 2007 Primer reporte de la mancha de agua en frutos de cacao (*Theobroma cacao* L) causada por *Phytophthora megasperma* (Drechler) en el sector Bohardal Rio Chico Estado Sucre.II Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. Pp 76-79
- Sánchez, R. E., B. L. Sánchez, Y. K. M. Sandoval, Á. Ulloa, B. Armendáriz, M. C. García y M. L. Macías. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas. vol.16 no.2. pp 102-110
- Sakalidis, ML, Ray JD, Lanoiselet V, Hardy GES and Burgess TI 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae asociated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of Western Australia. European Journal of Plant Pathology 130:379-391.
- Sandoval, M., D. Nieto, J. S. Sandoval, D. Téliz, M. Orozco, y H. Silva. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). Agrociencia 47:61-73.
- Sampaio O. 2005. "El cultivo de cítricos en el mundo: producción y destino de la producción", en IX Symposium Internacional de Citricultura, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México [CD-room].

- Secretaria de Desarrollo Rural (SDR). 2019. <https://www.tamaulipas.gob.mx/desarrollorural/2019/12/incrementa-tamaulipas-produccion-de-citricos/>. Consultado en septiembre 2019
- Secretaria de Desarrollo Rural (SDR). 2018. (<https://www.tamaulipas.gob.mx/desarrollorural/2017/04/tamaulipas-segundo-lugar-a-nivel-nacional-en-produccion-de-citricos/>) consultado en noviembre 2018
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2016. Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria Estación Nacional de Epidemiología, Cuarentena y Saneamiento Vegetal. Área de Diagnóstico.
- Serra S. M. Mannoni, A. Ligios. 2008. Studies on the susceptibility of pruning wounds to infection by fungi involved in grapevine wood diseases in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 47, 234–46.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2018. <https://www.gob.mx/siap> consultado en noviembre de 2018
- Simard, S. and D. Durall. 2004. Mycorrhizal networks: A review of their extent, function, and importance. *Canadian Journal of Botany* 82(8):1140-1165.
- Slippers, B. G. I. Johnston, P. W. Crous, T. A. Coutinho, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 2005. Phylogenetic and morphological re-evaluation of the *Botryosphaeria* species causing diseases of *Mangifera indica* in Australia. *Mycologia* 97, 102–113.
- Slippers, B. T. Burgess, D. Pavlic, R. Ahumada, H. Maleme, S. Mohali, C. Rodas and M. Wingfield. 2009. A diverse assemblage of *Botryosphaeriaceae* infect *Eucalyptus* in native and non-native environments. *Southern Forests* 71:101-110.
- Slippers, B. E. Boissin, A. Phillips, J. Groenewald, L. Lombard, M. Wingfield, A. Postma, T. Burgess and P. Crous. 2013. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriales*: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology* 76:31-49.
- Schoch, C., R. Shoemaker, K. Seifert, S. Hambleton, J. Spatafora and P. Crous. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia* 98:1041-1052.
- Tiwari, S., R. S. Mann, M. E. Rogers and L. L. Stelinsky. 2011. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. *Pest management Science* 67:1258-1268.
- Umaña G. 2011. Principales problemas fitopatológicos en frutos tropicales de Costa Rica durante el transporte y alternativas para su control. Evaluación no destructiva de la calidad e implementación en la industria frutícola. Ed. LPF-TAGRALIA España Vol. 3 Pp28-38.
- Úrbez, J.R. and W. D. Gubler. 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathology* 60:261-270.
- Vásquez A., J. A. Mora, E. Cárdenas y D. Téliz. 2009. Etiología e histopatología de la muerte descendente de árboles de mamey (*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn) en el estado de Guerrero, México. *Agrociencia* 43:717-728.

- Velázquez, J., M. Manzanilla, G. Manzo, M. Robles, M. Orozco y S. Carrillo. 2012. Reacción del limón mexicano a *Candidatus Liberibacter asiaticus* mediante inoculación por injerto. In: Memorias de congreso Nacional de Fitopatología. Pp 198-210
- Ventura, P. I. y M. A. Gutiérrez. 2019. Identificación y clonación de tres genes endógenos que pueden conferir resistencia a patógenos en cítricos incluyendo CLas y CTV. Revista Mexicana de FITOPATOLOGÍA. 10.18781/R.MEX.FIT.1906-6.
- Vial, A. 2005. Agentes causales del decaimiento de los cítricos (*Citrus* spp.) en Chile. Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Universidad Católica de Chile. Fac. de Agronomía e Ingeniería Forestal. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/36631> (Consultado: 18 abril 2020).
- Waller, F., B. Achatz, H. Baltruschat, J. Fodor, K. Becker, M. Fischer, T. Heier, R. Hückelhoven, Ch. Neumann, D. V. Wettstein, Ph. Franken, and K. H. Kogel. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. PNAS vol. 102 no. 38. Pp 18-23
- Yamamoto, P.T., D. C. Teixeira, E. C. Martins, M. A. Santos, M. R. Felipe, L. F. Garbim, A. U. Carmo A., D. P. Abrahao, M. C. Souza and J. M. Bové. 2006. Detection of *Candidatus Liberibacter americanus* and *asiaticus* in *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Psyllidae). Resumen en: Proc. of Huanglongbing-Greening Intl. Workshop, Ribeirão Preto, Brazil: 87. Pp. 45-49

Reporte de Lasiodiplodia theobromae (Pat.) Griffon y Maubl. en árboles cítricos de Tamaulipas

Héctor Flores Hernández^{1 §}

Juan Flores Gracia¹

Sostenes Edmundo Varela Fuentes²

Amado Pérez Rodríguez³

Ausencio Azuara Domínguez¹

Abraham Monteon-Ojeda³

¹Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria-División de Estudios de Posgrado e Investigación. Boulevard Emilio Portes Gil núm. 1301, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. CP. 87010. (floresgracia@yahoo.com.mx; azuarad@gmail.com). ²Universidad Autónoma de Tamaulipas Facultad de Ingeniería y Ciencias-Centro Universitario Victoria, Ciudad Victoria, Tamaulipas, México. CP. 87149. (svarela@uat.edu.mx). ³Colegio de Postgraduados-Instituto de Fitosanidad. Carretera México Texcoco km 35.5, Montecillo, Estado de México, México. CP. 56230. (perez.amado@colpos.mx; abraham.monteon@gmail.com).

[§]Autor para correspondencia: hfhmex@hotmail.com.

Resumen

En el presente estudio se determinó la presencia de *Lasiodiplodia theobromae* en árboles de cítricos con deterioro y muerte descendente en la zona centro de Tamaulipas, México en el 2017 y 2018. En la zona de estudio, se recolectaron muestras vegetales en los árboles de naranja valencia, pomelo, mandarina y limón italiano. En laboratorio, las muestras fueron procesadas y los hongos fueron aislados e identificados con claves taxonómicas y mediante el análisis genético del espaciador interno transcrito y el factor de elongación 1 alfa TEF1. Se aislaron 33 cepas de hongos en las 19 huertas comerciales de cítricos, 26 pertenecieron al género *Lasiodiplodia* sp., 3 de *Botryosphaeria* sp., 1 de *Colletotrichum* sp., 1 de *Cyphellophora* sp., 1 de *Fusarium* sp. y 1 de *Nigrospora* sp. De las cepas del género *Lasiodiplodia* sp., estas fueron identificadas como *L. theobromae* en árboles de cítricos con gomosis, pudrición, muerte descendente en ramas y momificación de frutos.

Palabras clave: análisis genético, hongos, pudrición

Recibido: febrero de 2021

Aceptado: abril de 2021