

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California).

La investigación fue financiada por el CONAHCYT (Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México). El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo o titular de los Derechos de Autor.

CICESE© 2024. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias
en Ciencias de la Vida**

**Aislamiento y caracterización de hongos patógenos causantes
de canchros en cultivos de cítricos en huertas de Hermosillo,
Sonora**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestra en Ciencias

Presenta:

Paola Alejandra Rocha López

Ensenada, Baja California, México
2024

Tesis defendida por
Paola Alejandra Rocha López

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Rufina Hernández Martínez
Codirectora de tesis

Dra. Luz América Córdoba Castro
Codirectora de tesis

Dr. Domingo Martínez Soto

Dr. Daniel Saucedo Carvajal



Dr. Edgardo Alfredo Sepúlveda Sánchez Hidalgo
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Ana Denise Re Araujo
Directora de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **Paola Alejandra Rocha López** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestría en Ciencias en Ciencias de la Vida.

Aislamiento y caracterización de hongos patógenos causantes de canchros en cultivos de cítricos en huertas de Hermosillo, Sonora

Resumen aprobado por:

Dra. Rufina Hernández Martínez

Codirectora de tesis

Dra. Luz América Córdoba Castro

Codirectora de tesis

A nivel mundial, los hongos de la madera tienen un fuerte impacto en el rendimiento y longevidad de los árboles de cítricos, ocasionando síntomas de canchro, muerte regresiva y gomosis. Sonora es uno de los estados con mayor producción de cítricos en México, principalmente en la costa de Hermosillo, donde predomina la producción de naranjas orgánicas. En varias huertas se han observado síntomas relacionados a hongos de la madera, por lo que este trabajo tuvo como objetivo: identificar a los agentes causales de enfermedades de la madera en cítricos y proponer estrategias de control. Para ello, se realizó un muestreo de plantas sintomáticas en 42 huertas de Hermosillo, Sonora, obteniendo alrededor de 300 aislados fúngicos. Con base en su morfología colonial, se seleccionaron 179 aislados que se caracterizaron por amplificación de los fragmentos de TEF1 α , identificando a los géneros: *Lasiodiplodia*, *Colletotrichum*, *Dothiorella* y *Fusarium*, como los más prevalentes. La caracterización morfológica se complementó con la observación de las estructuras macro y microscópicas y en algunos casos, por la medición de esporas. Adicionalmente, se realizó la caracterización molecular de 75 aislados con la secuenciación de fragmentos de ITS. Las principales especies identificadas fueron: *Lasiodiplodia iraniensis*, *L. subglobosa* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Con base en la identificación molecular y morfológica, se seleccionaron 32 cepas para evaluar su patogenicidad en árboles de naranja. Las especies de *Lasiodiplodia iraniensis* y *L. subglobosa* fueron las más virulentas, capaces de causar gomosis al quinto día y marchitamiento a los 15 días post-infección. Finalmente, para evaluar estrategias de control, se seleccionaron las cuatro cepas más virulentas para hacer ensayos *in vitro* con fungicidas y organismos de control biológico. Los ensayos permitieron la selección de los fungicidas Proud y Switch, una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, tres de *Trichoderma asperellum* y una de *Chaetomium megalocarpum*. Este trabajo contribuye al conocimiento de los agentes causales de enfermedades de la madera en la costa de Hermosillo y sirve como base para establecer estrategias para su control.

Palabras clave: hongos de la madera, gomosis, naranja, control biológico.

Abstract of the thesis presented by **Paola Alejandra Rocha López** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Science. of Life.

Isolation and characterization of pathogenic fungi that cause wood cankers in citrus crops in orchards in Hermosillo, Sonora.

Abstract approved by:

Dra. Rufina Hernández Martínez

Thesis Co-director

Dra. Luz América Córdoba Castro

Thesis Co-director

Globally, wood fungi have a negative impact on the fitness and longevity of citrus trees, causing symptoms such as canker, dieback, and gummosis. Sonora is one of the states with the highest citrus production in Mexico, mainly along the coast of Hermosillo, where organic orange production predominates. Symptoms related to trunk diseases fungi have been observed in several orchards, so the aim of this study was to identify the causal agents of wood diseases in citrus and propose control strategies. To achieve this, symptomatic plants were sampled in 42 orchards in Hermosillo, Sonora, yielding around 300 fungal isolates. Based on their colonial morphology, 179 isolates were selected for characterization through the amplification of TEF1 α fragments, identifying the genera: *Lasiodiplodia*, *Colletotrichum*, *Dothiorella*, and *Fusarium* as the most prevalent. Morphological characterization was complemented by the observation of macro and microscopic structures and, in some cases, spore measurements. Additionally, molecular characterization of 75 isolates was conducted through ITS fragment sequencing. The main species identified were: *Lasiodiplodia iraniensis*, *L. subglobosa* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Based on molecular and morphological identification, 32 strains from the Botryosphaeriaceae were selected to evaluate their pathogenicity on orange trees. The species *L. iraniensis* and *L. subglobosa* were the most virulent, capable of causing gummosis by the fifth day and wilting by the fifteenth day post-infection. Finally, to evaluate control strategies, the four most virulent strains were selected for *in vitro* trials with fungicides and biological control agents. The trials led to selecting the fungicides Proud and Switch, one strain of *Bacillus amyloliquefaciens*, three of *Trichoderma asperellum*, and one of *Chaetomium megalocarpum*. This work contributes to the understanding of the causal agents of wood diseases along the coast of Hermosillo and serves as a basis for establishing control strategies.

Keywords: trunk diseases fungi, gummosis, orange, biological control.

Dedicatoria

A mis sobrinos, Alan y Sebastián.

Más les vale que yo siempre sea su tía favorita.

Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California, por darme la oportunidad de realizar la maestría en Ciencias de la Vida. Esta experiencia del posgrado me ha ayudado a mejorar como estudiante y profesionalista.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el apoyo de la beca de manutención durante mi tiempo en el posgrado.

A la Dra. Rufina, por su ayuda en todos los aspectos; por recibirme en su laboratorio, apoyarme con la caracterización molecular, sus enseñanzas tanto fuera como dentro del laboratorio, y por su retroalimentación durante los ensayos de los avances y de los seminarios. Gracias por alentarme, motivarme y darme la oportunidad como su estudiante para presentar este trabajo. Las experiencias con usted me las llevo por siempre conmigo, porque lo bien vivido no se olvida, o algo así iba ¿no?

A la Dra. América, por su ayuda en el desarrollo de este trabajo, por quedarse conmigo hasta tarde en el laboratorio para procesar muestras y por permitirme colaborar con ella para otros trabajos. Gracias por abrirme las puertas de tu casa y prácticamente adoptarme como tu hija académica, por escucharme cuando lo necesitaba y brindarme ese cariño que tanto te caracteriza.

A los miembros de mi Comité, al Dr. Domingo Martínez y al Dr. Daniel Saucedo les agradezco por su tiempo y retroalimentación durante las reuniones, así como sus aportaciones para el desarrollo de este proyecto.

A la Junta Local de Sanidad Vegetal de Hermosillo y a los Productores de cítricos por todo el apoyo y el financiamiento de este proyecto.

A la Dra. Edelweiss, gracias por apoyar con el análisis filogenético, responder siempre a todas mis dudas y por las pláticas que teníamos entre descansos (teníamos la ventaja de solo movernos con las sillas).

Sin ponernos sentimentales, porque ya hemos visto que eso se nos da muy bien, a todo el Fitolab muchísimas gracias por acompañarme en este camino de la maestría: Edel, Luis, Ame, Grecia y, Dra. Rufina. No pude haber pedido a mejor equipo de laboratorio que este. Gracias por todo el aprendizaje, por apoyarme a crecer y mejorar en mis trabajos y presentaciones, por ayudarme cuando lo necesitaba y por ser mi segunda familia. En este laboratorio fue donde pude ver con mis propios ojos lo que es el verdadero trabajo en equipo y estoy muy orgullosa de poder decir que fui parte de ese grupo.

A todos los estudiantes que se acercaron al laboratorio para hacer su servicio o prácticas de la carrera, gracias infinitas por todo su apoyo en el trabajo de laboratorio e invernadero, su amistad y los momentos para echar chismecito entre descansos: Ally, Andrea, Gema y JC. Especialmente Sofi, gracias por llegar al laboratorio y continuar con la historia de *Colletotrichum*, tienes todo mi apoyo para que esa tesis sea exitosa.

Karem Figueroa, gracias por apoyar con la caracterización de los aislados de *Fusarium*, espero que hayas disfrutado tu estancia trabajando con estos hongos y te hayas llevado algo bonito en tu experiencia con nosotros.

A mis chicos de San Luis, gracias por llegar al laboratorio y brindar tanta alegría con sus ocurrencias, por ayudar con el mantenimiento del invernadero (no Cesar, esas siguen siendo MIS hijas), por echar chismecito en los descansos (aunque a veces era durante el trabajo ¿verdad Ramón?), pero especialmente, gracias por su bella amistad, espero que hayan aprendido algo de nosotros, así como yo aprendí de ustedes.

A mis solecitos, Alan y Martín, gracias por haber elegido trabajar en este laboratorio, pues me han apoyado muchísimo en el trabajo del invernadero, tanto, que dejé a uno de ustedes POR ACCIDENTE bajo llave en él. Pero creo que a partir de ahí empezó la amistad ¿apoco no? En fin, gracias por su ayuda y amistad en mi etapa final de la maestría, les deseo lo mejor a los dos en su futuro.

Para no hacer este apartado más largo, finalmente quiero agradecer a mi familia. A mis papás por su apoyo incondicional, sus palabras de aliento, por acompañarme a distancia en este viaje llamado maestría, por constantemente mostrar interés y querer entender en lo que me encontraba trabajando, y por siempre procurar que nada me faltara. A mi hermana, gracias por siempre motivarme a hacer lo que me gusta, por ser mi hermana/confidente (aunque no le quede de otra, soy la única y mejor hermana que ella tiene) y por ser una figura de quien puedo seguir su ejemplo. Por último y permítanme decirlo, a los más importantes, mis sobrinos Alan y Sebastián, que a pesar de que todavía ni entiendan lo que es la fotosíntesis (ni mucho menos citar en formato APA), les agradezco por ser mi alegría, simplemente con fotos o videos de ustedes me sacaban la mayor de las sonrisas y me recordaban lo que es disfrutar de la vida, por ello, con mucho amor va dedicado para ustedes este trabajo.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	xi
Lista de tablas	xiv
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	2
1.1.1 Generalidades de los cítricos	2
1.1.2 Producción en el sector citrícola	2
1.1.3 Enfermedades de los cítricos en México	3
1.1.4 Enfermedades por hongos de la madera	4
1.2 Justificación	6
1.3 Hipótesis	6
1.4 Objetivos	6
1.4.1 Objetivo general	6
1.4.2 Objetivos específicos	6
Capítulo 2. Metodología	8
2.1 Diagrama de flujo del presente estudio	8
2.2 Recolecta y procesamiento de muestras	8
2.3 Aislamiento de hongos de la madera	10
2.3.1 Observación de los síntomas en las ramas	10
2.3.2 Aislamientos fúngicos	10

2.4	Caracterización morfológica inicial	10
2.5	Caracterización molecular	11
2.5.1	Extracción de ADN	11
2.5.2	Amplificación y secuenciación para identificación de hongos	12
2.5.3	Análisis filogenético	12
2.6	Caracterización morfológica	12
2.6.1	Crecimiento en medios de cultivo PDA y MEA	12
2.6.2	Observación de estructuras macroscópicas y microscópicas	13
2.6.3	Ensayos de temperatura	13
2.7	Ensayos de patogenicidad	14
2.8	Ensayos de control de hongos seleccionados	15
2.8.1	Ensayos <i>in vitro</i> usando productos comerciales químicos y orgánicos	15
2.8.2	Agentes de control biológico	16
Capítulo 3.	Resultados	18
3.1	Procesamiento de muestras	18
3.2	Caracterización molecular	18
3.2.1	Análisis filogenético de la familia Botryosphaeriaceae	21
3.3	Caracterización morfológica de cepas seleccionadas	22
3.3.1	Familia Botryosphaeriaceae	22
3.3.1.1	<i>Barriopsis</i>	22
3.3.1.2	<i>Dothiorella</i>	23
3.3.1.3	<i>Lasiodiplodia</i>	25
3.3.1.4	<i>Phaeobotryon</i>	28
3.3.1.5	<i>Pseudofusicoccum</i>	29
3.3.1.6	<i>Oblongocollomyces</i>	30
3.3.2	Familia Glomerellaceae	31

3.3.2.1 <i>Colletotrichum</i>	31
3.3.3 Familia Nectriaceae	33
3.3.3.1 <i>Fusarium</i>	33
3.3.4 Familia Diatrypaceae	36
3.3.4.1 <i>Diatrype</i>	36
3.3.4.2 <i>Eutypella</i>	37
3.3.5 Familia Apiosporaceae	38
3.3.5.1 <i>Nigrospora</i>	38
3.3.6 Familia Chaetomiaceae	38
3.3.6.1 <i>Chaetomium</i>	38
3.3.7 Ensayos de temperatura de la familia Botryosphaeriaceae	39
3.4 Virulencia de hongos de la Familia Botryosphaeriaceae	41
3.5 Control de hongos de <i>Lasiodiplodia</i>	46
3.5.1 Control <i>in vitro</i>	46
3.5.1.1 Productos comerciales	46
3.5.1.2 Agentes de control biológico (BCA)	48
Capítulo 4. Discusión	51
Capítulo 5. Conclusiones	59
Literatura citada	60
Anexos	68

Lista de figuras

Figura	Página
1. Diagrama de flujo de la metodología general del presente estudio	8
2. Ubicación de las 42 huertas de donde se tomaron muestras en la costa de Hermosillo. Los colores indican el tipo de árbol (naranja, toronja, limón o mandarina) de donde se colectaron las ramas	9
3. Sintomatología observada en árboles de huertas en la costa de Hermosillo. A. Muerte regresiva. B. Gomosis. C, D. Cancros	9
4. Síntomas más comunes observados en las ramas de plantas de cítricos que llegaron al Laboratorio de Fitopatología para la obtención de hongos. A. Cancros. B. Gomosis. C. Lesión necrótica y gomosis. D. Herida por insecto	11
5. Procedimiento para la inoculación de los hongos seleccionados en las ramas. A. Herida mecánica hecha con taladro. B. Inoculación del hongo usando discos de micelio colocados en las heridas provocadas con el taladro. C. Cubrimiento de la herida con Parafilm	14
6. Síntomas observados en las huertas y géneros prevalentes identificados. A. Gráfica de columnas apiladas de los síntomas observados en las ramas colectadas por huerta. B. Gráfico circular de los géneros identificados en las huertas, señalando la cantidad de huertas de donde los géneros prevalentes (<i>Lasiodiplodia</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Dothiorella</i> y <i>Fusarium</i>) fueron aislados.....	19
7. Diversidad de morfologías de las especies seleccionadas y su crecimiento en medio MEA (lado izquierdo) y PDA (lado derecho). A. <i>Barriopsis iraniana</i> 45-2. B. <i>Chaetomium megalocarpum</i> SCT26-1. C. <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> SCT22-2. D. <i>Diatrype</i> sp. SCT29-5. E. <i>Dothiorella mangifericola</i> SCT21-1. F. <i>D. citricola</i> SCT23-2. G. <i>Fusarium citri</i> SCT07-3. H. <i>F. incarnatum</i> SCT15-1. I. <i>F. nanum</i> SCT05-2. J. <i>F. nucidum</i> SCT51-5. K. <i>F. perambucanum</i> SCT58-2. L. <i>Lasiodiplodia iraniensis</i> SCT35-1. M. <i>L. subglobosa</i> SCT41-1. N. <i>Eutypella</i> sp. SCT06-3. O. <i>Nigrospora sphaerica</i> SCT45-3. P. <i>Phaeobotryon</i> sp. SCT04-2. Q. <i>Pseudofusicoccum stromaticum</i> SCT18-2. R. <i>Oblongocollomyces</i> sp. SCT31-1	20
8. Análisis filogenético de las cepas de la familia Botryosphaeriaceae a partir de las secuencias concatenadas de las regiones de TEF-1 α e ITS. Los aislados obtenidos de este trabajo están marcados en rojo	21
9. Características morfológicas del género de <i>Barriopsis</i> . A. <i>B. iraniana</i> SCT45-2: crecimiento en PDA, micelio y espora hialina. B. SCT55-2 <i>B. iraniana</i> : crecimiento en PDA, picnidio y esporas hialinas y pigmentadas. Escala: 10 μ m.....	22
10. Características morfológicas del género <i>Dothiorella</i> . A. <i>D. mangifericola</i> SCT21-1: crecimiento en medio PDA, esporas hialinas y pigmentadas septadas, y picnidio. B. <i>D. citricola</i> SCT23-2: crecimiento en PDA, esporas pigmentadas y septadas, y picnidios. C. <i>D. mangifericola</i> SCT32-1: crecimiento en PDA, esporas pigmentadas y septadas, y micelio blanquecino plano	23
11. Cepas de <i>Lasiodiplodia</i> seleccionadas, crecidas por 7 días en medios de MEA (izquierda) y PDA (derecha). A. <i>L. iraniensis</i> SCT07-2. B. <i>L. iraniensis</i> SCT35-1. C. <i>L. iraniensis</i> SCT41-2. D. <i>L. iraniensis</i>	

SCT43-1. E. <i>L. subglobosa</i> SCT07-1. F. <i>L. subglobosa</i> SCT26-3. E. <i>L. subglobosa</i> SCT27-2. E. <i>L. subglobosa</i> SCT41-1	25
12. Crecimiento en PDA a los 7 días, esporas y picnidios de cepas de <i>Lasiodiplodia</i> . A. SCT43-1 <i>L. iraniensis</i> . B. SCT41-2 <i>L. iraniensis</i> . C. SCT07-1 <i>L. subglobosa</i>	27
13. Crecimiento en PDA a los 7 días, esporas (escala: 10 µm) y picnidios de cepas de <i>Phaeobotryon</i> . A. <i>Phaeobotryon</i> sp. SCT04-2. B. <i>Phaeobotryon</i> sp. SCT34-1	28
14. Género de <i>Pseudofusicoccum</i> . A, D, F. <i>P. stromaticum</i> SCT18-2: crecimiento en medio PDA a los 7 días, micelio en placa, microscopía de hifas septadas y picnidio. B, C, E. <i>P. stromaticum</i> SCT18-6: crecimiento en PDA y MEA a los 7 días y micelio en placa	29
15. SCT 31-1 <i>Oblongocollomyces</i> sp. A, C: Crecimiento en PDA y MEA a los 7 días. B: Esporas maduras (melanizadas y septadas) e hifas. D: Micelio y picnidio en formación	30
16. Cepas de <i>Colletotrichum</i> seleccionadas y crecidas por 10 días en medios de MEA (izquierda) y PDA (derecha). A. SCT08-1 <i>Colletotrichum</i> sp. B. SCT11-2 <i>C. gloeosporioides</i> . C. SCT22-2 <i>C. gloeosporioides</i> . D. SCT48-1 <i>C. gloeosporioides</i> . E. SCT56-2 <i>C. gloeosporioides</i>	31
17. Crecimiento de cepas de <i>C. gloeosporioides</i> en medio PDA a los 10 días, masas naranjas de esporas y acérvulos visto en estereoscopio y esporas vistas en microscopio. A. SCT11-2. B. SCT22-2. C. SCT56-2	33
18. Cepas de <i>Fusarium</i> seleccionadas y crecidas por 15 días en medios de MEA (izquierda) y PDA (derecha). A. SCT07-3 <i>F. citri</i> . B. SCT15-1 <i>F. incarnatum</i> . C. SCT05-2 <i>F. nanum</i> . D. SCT51-5 <i>F. nucidum</i> . E. SCT58-2 <i>F. pernambutanum</i>	34
19. Crecimiento en PDA, micelio y macroconidios de cepas del género <i>Fusarium</i> . A: SCT07-3 <i>F. citri</i> . B: SCT11-2 <i>F. incarnatum</i> . C: SCT05-2 <i>F. nanum</i> . D: SCT51-5 <i>F. nucidum</i> . E: SCT58-2 <i>F. pernambutanum</i>	35
20. SCT 29-5 <i>Diatrype</i> sp. A: Crecimiento en PDA a los 15 días. B: Ascosporas. C: Crecimiento en MEA a los 15 días. D: Micelio plano con crecimiento irregular, color amarillo	36
21. <i>Eutypella microtheca</i> SCT 01-1. A: Crecimiento en PDA a los 10 días de las cepas SCT01-1 de <i>E. microtheca</i> y <i>Eutypella</i> sp. SCT06-3, SCT13-1, y SCT30-7 (izquierda a derecha). B: Conidia. C: Picnidio. D: Crecimiento de micelio en acículas de pino	37
22. <i>Nigrospora sphaerica</i> SCT45-3. A. Crecimiento en medio MEA a los 7 días. B. Crecimiento en medio PDA a los 7 días. C. Esporas	38
23. <i>Chaetomium megalocarpum</i> SCT26-1. A. Crecimiento en MEA y PDA a los 17 días. B. Macroscopía de micelio y esporulación. C,D. Microscopía de esporas	39
24. Síntomas observados en las plantas inoculadas con las cepas del género <i>Lasiodiplodia</i> . A, C. Gomosis provocada por <i>L. iraniensis</i> SCT 07-2 y <i>L. subglobosa</i> SCT26-3 respectivamente. B, D. Tizón en las ramas ocasionado por <i>L. iraniensis</i> SCT 07-2 y <i>L. subglobosa</i> SCT26-3.....	43
25. Evaluación de las ramas inoculadas con las cepas de <i>Lasiodiplodia</i> spp.	44

26. Lesión externa (rama izquierda) e interna (rama derecha) de las ramas inoculadas con las cepas de *Lasiodiplodia iraniensis* y de *L. subglobosa*. Las flechas blancas señalan el área donde se hizo la herida para la inoculación. 44
27. Diagrama de cajas del tamaño de lesión en las ramas inoculadas con cepas seleccionadas de *Lasiodiplodia*. *Lasiodiplodia iraniensis*: SCT07-2, SCT35-1, SCT41-2 y SCT43-1 ($p < 0.05$). *Lasiodiplodia subglobosa*: SCT07-1, SCT26-3, SCT41-1 y SCT27-2. A. Lesión externa de las ramas. B. Lesión interna de las ramas 45
28. Ensayos en medio envenenado con productos comerciales orgánicos y químicos, ordenados de menor a mayor inhibición. Cepas patógenas evaluadas: *Lasiodiplodia iraniensis* SCT07-2, *L. iraniensis* SCT43-1, *L. subglobosa* SCT07-1 y *L. subglobosa* SCT26-3 47
29. Ensayos de confrontación entre agentes de control biológica (lado derecho de la placa) y la cepa *Lasiodiplodia iraniensis* SCT07-2 (lado izquierdo) a los 7 días 49
30. Gráfico circular de la distribución por familia de los aislados y los géneros más prevalentes de la familia Botryosphaeriaceae 80

Lista de tablas

Tabla	Página
1. Productos comerciales químicos y orgánicos evaluados	15
2. Agentes de control biológico evaluados	16
3. Dimensiones de las conidiosporas de cepas seleccionadas de <i>Barriopsis iraniana</i> aisladas de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora	23
4. Listado de incidencia de <i>Dothiorella</i> en las huertas	24
5. Dimensiones de las conidiosporas de cepas seleccionadas de <i>Dothiorella</i> spp. aisladas de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora	24
6. Listado de incidencia de <i>Lasiodiplodia</i> en las huertas	25
7. Dimensiones de las conidiosporas de cepas seleccionadas de <i>Lasiodiplodia</i> spp. aisladas de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora.....	28
8. Dimensiones de las conidiosporas de cepas seleccionadas de <i>Phaeobotryon</i> spp. aisladas de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora	29
9. Dimensiones de las conidiosporas de la cepa de <i>Oblongocollomyces</i> sp. aislada de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora	31
10. Listado de incidencia de <i>Colletotrichum</i> en las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora	32
11. Listado de incidencia de <i>Fusarium</i> en las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora	36
12. Listado de incidencia de <i>Eutypella</i> en las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora	38
13. Tasas de crecimiento (mm/día) a diferentes temperaturas de cepas del género <i>Lasiodiplodia</i> ($p < 0.05$)	40
14. Tasas de crecimiento (mm/día) a diferentes temperaturas de cepas pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae ($p < 0.05$)	41
15. Listado de las cepas de la familia Botryosphaeriaceae inoculadas en plantas de naranja para evaluar su patogenicidad	42
16. Listado de los productos comerciales evaluados para los ensayos de control de las cepas de <i>Lasiodiplodia</i> seleccionadas	46
17. Evaluación del porcentaje de inhibición de los agentes de control biológico en los ensayos <i>in vitro</i> con la cepa SCT07-2 <i>L. iraniensis</i>	48

18. Lista de GenBank y números de acceso de cultivos de Botryosphaeriaceae spp. utilizados en este estudio para el análisis filogenético 71

19. Cepas fúngicas identificadas por huerta, hospedante de donde se aislaron y los síntomas que se observaron 75

Capítulo 1. Introducción

El género *Citrus*, comúnmente conocido como el grupo de los cítricos, pertenece a la familia Rutaceae, el cual comprende algunas de las especies de grandes arbustos perennes frutales de mayor relevancia económica mundial (Stampella *et al.*, 2014). Sus frutos se caracterizan por su contenido en vitamina C y ácido cítrico, lo que les concede un sabor ácido. Los cítricos se encuentran conformados por tres especies principales, y de estos se derivan una gran variedad de híbridos, nombrados de acuerdo con la región en la que se cultiven (Klein, 2014). Estas especies son *Citrus medica* (limones), *C. maxima* (pomelo) y *C. reticulata* (mandarinas, clementinas y tangerinas).

Los frutos más comercializados en el mundo de la citricultura son el limón (*Citrus x limon*), la naranja (*C. sinensis*), la lima (*Citrus x aurantifolia*) y la toronja (*Citrus x paradisi*). En México, los cítricos son un producto básico, pues además de formar parte de la dieta de la población, son muy importantes en la generación de empleos. De acuerdo con el Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (2022), el país se ubica en la cuarta posición en el mundo en la producción de cítricos; el 12% se destina a la venta a otros países o al mercado de exportación, y el 88% restante para el consumo interno.

En los últimos años se han observado árboles con muerte regresiva, es decir, ramas muertas de las puntas hacia abajo, en huertas de cítricos del estado de Sonora. Las ramas pueden presentar canchales y gomosis, lo que perjudica el crecimiento y desarrollo de las plantas. Esto se traduce en la disminución en el valor de los productos que se comercializan para la exportación a otros países, pues influyen en la cantidad de los frutos.

En estudios hechos en otros países, se han caracterizado hongos patógenos de la madera asociados a este tipo de síntomas, como los pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae (Adesemoye *et al.*, 2013; Piattino *et al.*, 2024). Estos han demostrado ser virulentos, ocasionando lesiones en la madera e interfiriendo en el flujo de nutrientes en la planta, lo cual afecta el desarrollo de la planta y la cosecha de los frutos. En la actualidad, se cuentan con registros de agentes asociados a enfermedades de la madera que afectan a los cítricos en México (Valle *et al.*, 2019; Polanco *et al.*, 2020), pero no se han reportado en el estado de Sonora.

Por ello, este trabajo tiene como objetivo principal caracterizar a los agentes fúngicos causantes de muertes de ramas en las huertas de Hermosillo, para entender el comportamiento que tienen en las

plantas de cítricos y los daños que estos causan. Del mismo modo, se evalúan medidas para controlar a los hongos patógenos.

1.1 Antecedentes

1.1.1 Generalidades de los cítricos

El género *Citrus* comprende a las especies de arbustos grandes perennes (entre 5 y 15 metros de altura) y pertenece a la familia de las rutáceas. Se cultivan mayormente en regiones tropicales y subtropicales, con un amplio rango de temperatura de 10°C hasta 39 °C, es decir, tienen una alta capacidad de adaptación a condiciones climáticas, lo que les permite ser cultivados en varias regiones del mundo (González y Tullo, 2019).

Una característica principal de este género de plantas es su fruto, el cual es un hesperidio; una baya modificada, carnosa y con cubierta endurecida. Los frutos son un producto muy versátil y se comercializan en distintas presentaciones: frescos, jugo, aceite, cáscara y puré. Se distinguen por su alto contenido de ácido cítrico, el cual es un componente utilizado en la industria farmacéutica como digestivo (WHOCC, 2023).

1.1.2 Producción en el sector cítrícola

De acuerdo con la FAOSTAT (2019), se tienen destinadas 9,898,643 hectáreas para la producción cítrícola en el mundo, de las cuales, 641,899 ha le corresponden a México, es decir, casi el 7% de la producción total, lo que lo posiciona en el quinto lugar a nivel mundial en la producción de cítricos. Entre la diversidad de estos frutos, el país ocupa el segundo lugar en la exportación de lima y limón, aportando alrededor de un 13% del porcentaje a mundial (SENASICA, 2022).

En México, los cítricos constituyen un producto base por su alto consumo en la dieta diaria de la población. La zona productora del país comprende a 28 entidades federativas; Sonora se ubica entre los 10 estados con mayor producción de cítricos de la república, con más de 101,000 toneladas producidas en el 2021, predominando la producción de naranja, el cítrico que más se produce y que más consumen los mexicanos (SENASICA, 2022).

1.1.3 Enfermedades de los cítricos en México

Las enfermedades que afectan a los cítricos alteran la apariencia de las plantas, su fisiología y calidad. Esto influye en el proceso de cosecha, pues cuando estas enfermedades se encuentran en condiciones favorables para su propagación, las plantas pierden su valor implicando, pérdidas económicas para los agricultores. Entre las principales enfermedades de estas afectaciones, se encuentra el Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV, por sus siglas en inglés), el ahogamiento o “*damping-off*” y el Huanglongbing (Sáenz, et al. 2019).

El Virus de la Tristeza de los Cítricos (CTV) es causado por el patógeno de cadena sencilla de ARN, Closterovirus, el cual es transmitido por áfidos de forma semipersistente como *Toxoptera citricida* (Yokomi et al., 1994, como se citó en Rivas et al., 2017). El CTV se encuentra en casi todas las zonas citrícolas en el mundo, y se ha reportado en al menos, más de 15 estados de la república mexicana. El virus se ha presentado mayormente en el estado de Veracruz en plantas de limón, en conjunto con un reporte más reciente en Yucatán de marzo de 2023 en plantas de naranjo agrio (INIFAP, 2023). El CTV ocasiona síntomas en combinaciones de injertos y porta injertos de frutos, como la clorosis en las hojas, disminución del follaje, y posteriormente, el decaimiento de la planta (tristeza). Esto provoca un menor florecimiento, y, por consiguiente, una disminución en el volumen y calidad de los frutos.

Por otro lado, el ahogamiento, también conocido como “*damping-off*”, es una enfermedad que ataca durante el proceso de germinación de las plantas y es causado por patógenos de suelo como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp. Estos afectan a plántulas jóvenes y semillas en germinación, y se mueven de suelos contaminados a otros libres de patógenos por medio de herramientas de poda infectadas, los extremos de mangueras, por el contacto de las manos de los trabajadores y el agua (Mercure, 2019). Los síntomas provocados por estos patógenos de suelo son la coloración amarilla en las puntas de las hojas y su marchitez, terminando con la muerte de las plántulas (Medrano y Ortuño, 2007). Esta enfermedad afecta principalmente la producción de limón en el país; su severidad radica en que mata a los cultivos desde su etapa de plántula.

El Huanglongbing (HLB) es una enfermedad en los cítricos ocasionada por la bacteria *Candidatus liberibacter*, la cual es transmitida por el vector *Diaphorina citri* (a corta distancia) o por material de propagación infectado, como yemas, ramillas o plantas enfermas (transmisión a otros territorios). El HLB provoca manchas amarillas foliares y retraso del crecimiento de plantas en desarrollo debido a problemas en la traslocación de asimilados en las plantas, ocasionando eventualmente una deformación en los frutos

(Robles *et al.*, 2013). Esta plaga es relevante debido a su expansión a nivel mundial, alcanzando una incidencia de árboles sintomáticos del 100% en China y del 90% en México. Debido a esta enfermedad, el limón mexicano ha sufrido pérdidas productivas a nivel mundial del 62% (Robles-González *et al.*, 2013). La mayoría de estas enfermedades en cultivos de cítricos en México se han concentrado en las áreas noreste, centro y sur. Por ello, es importante realizar diagnósticos sobre los casos emergentes que se han presentado en los últimos años en el área noroeste, los cuales difieren de las características que estas enfermedades presentan.

1.1.4 Enfermedades por hongos de la madera

Los hongos de la madera son patógenos oportunistas que entran por heridas en el tejido leñoso de las plantas, por causas de poda o insectos. En condiciones favorables de temperatura y humedad, estos se establecen en el sistema vascular de la planta, generando la pudrición y muerte prematura de las células del tejido (Apablaza, 2022). Entre los síntomas que más se presentan en estas infecciones fúngicas, están los canchros, la marchitez, la muerte regresiva y la gomosis, lo que conlleva a un menor rendimiento de frutos. La familia Botryosphaeriaceae se distingue por causar síntomas de canchros, gomosis y muerte regresiva. Se encuentra conformada por 23 géneros de hongos que inducen enfermedades en plantas, especialmente cuando se encuentran bajo estrés o con heridas que facilitan su infección (Slippers *et al.*, 2017). Los géneros que se destacan por contar con un amplio rango de hospedantes, y con una distribución geográfica mundial son: *Diplodia*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Neofusicoccum*. Estos agentes fitopatógenos cuentan con la capacidad de migrar entre hospedantes, lo que facilita su propagación, resultando en una gran amenaza para los cultivos, pues al estar en condiciones favorables de temperatura, se vuelven más agresivos (Piskur *et al.*, 2011).

Al-Sadi *et al.* (2014) realizaron una evaluación en 166 huertas en Omán donde observaron síntomas de muerte regresiva y gomosis en árboles de lima ácida y lima dulce, en la cual identificaron a las especies de *Lasiodiplodia hormozganensis*, *L. theobromae* y *Fusarium solani* como las más comunes. Posteriormente Mayorquin *et al.* (2016) realizaron una recolección de ramas en campos de árboles de limón en el estado de California que mostraban síntomas de cancro y muerte regresiva, los cuales fueron asociados a las especies *Neoscytalidium hyalinum*, *Eutypella citricola*, y *E. microtheca*. Posteriormente, Espargham *et al.* (2020) observaron síntomas de cancro y muerte regresiva en ramas de árbol de lima ácida en Irán, y al hacer los aislamientos y caracterización, identificaron a las especies *Dothiorella viticola*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Neoscytalidium hyalinum*, *Phaeoacremonium parasiticum* (y otras), *Cadophora luteo-*

olivacea, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium* spp. Entre ellos, *L. theobromae* fue la más virulenta.

En estudios realizados en México muestran que, en el estado de Morelos, Valle *et al.* (2019) aislaron las especies de *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *L. citricola*, causando síntomas de canchros, gomosis y muerte regresiva en cultivos de lima persa. Posteriormente, Polanco *et al.*, (2020) reportaron la presencia de los hongos *L. theobromae*, *Fomitopsis meliae* y *Eutypella citricola* en plantas de naranjo dulce que presentaban muerte regresiva, y al aislarlos e inocularlos en plantas en invernadero, volvieron a observar muerte regresiva, además de marchitez y lesiones necróticas en las plantas inoculadas.

En los estados de Veracruz y Puebla, Bautista-Cruz *et al.* (2019) obtuvieron 60 aislados de ramas con síntomas de gomosis y canchros en la madera de limón persa, de especies del hongo de *Lasiodiplodia*: *L. pseudotheobromae*, *L. theobromae*, *L. brasilense*, *L. subglobosa*, *L. citricola* y *L. iraniensis*. Realizaron inoculaciones con discos de micelio de estos aislados en ramas de plantas de limón persa, donde observaron síntomas de gomosis y lesiones necróticas a los 30 días de haberlas inoculado, siendo *L. iraniensis* y *L. subglobosa*, seguido de *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*, las que causaron la mayor lesión interna promedio. Este trabajo reveló el grado de virulencia de estas cepas de *Lasiodiplodia* en plantas de limón; este género ya se ha reportado como uno de los hongos más virulentos de la familia Botryosphaeriaceae (Belair *et al.* 2023).

Para el año 2020, Polanco *et al.*, realizaron un muestreo en árboles de naranjo dulce de ramas con síntomas de muerte regresiva y con áreas necróticas en huertas de Nuevo León y Tamaulipas. En este muestreo dirigido aislaron los hongos *Fomitopsis meliae*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Eutypella citricola*. Realizaron ensayos de patogenicidad inoculando discos miceliales en plantas de naranjo dulce de estos aislados. Los inóculos de *F. meliae* demostraron ser los más agresivos, ocasionando síntomas de marchitez y necrosis a solo cuatro días de haber hecho la inoculación, y provocando lesiones necróticas exteriores de entre 9.5 y 29 cm de largo a los 32 días.

En general, las enfermedades por hongos de la madera han demostrado ser un problema para el sector agrícola, afectando el desarrollo de los cultivos de cítricos no solo en México, sino en todo el mundo. En especial los hongos que pertenecen a la familia Botryosphaeriaceae, debido al incremento de reportes en los últimos años y su alto grado de virulencia. De igual manera, numerosas especies de esta familia no han demostrado tener una especificidad en el rango de hospedantes, lo que representa un problema para los cultivos de cítricos a nivel mundial.

La mayoría de los estudios de estas enfermedades en cultivos de cítricos en México se han concentrado en las áreas noreste, centro y sur (Valle *et al.*, 2019; Bautista *et al.*, 2019; Polanco *et al.*, 2020). Por ello, es importante realizar diagnósticos sobre los casos emergentes que se han presentado en los últimos años en el área noroeste, pues difiere en las características climáticas y destaca por tener una producción de cultivos orgánicos.

1.2 Justificación

La citricultura representa un alto porcentaje de ingresos para el país, su exportación forma parte de una de las actividades económicas más importantes en el sector agrícola, además de generar una fuente importante de empleos. En los últimos años, se han detectado plantas con síntomas de muerte regresiva en huertas en Hermosillo, muy probablemente ocasionado por hongos patógenos de la madera. Dado que no se cuentan con estudios de hongos de la madera en el área noroeste, y al ser Sonora uno de los estados con mayor producción de cítricos en el país, especialmente de naranja, se propone caracterizar a los agentes causales de la muerte regresiva de los cítricos en huertas de este Estado.

1.3 Hipótesis

Considerando las condiciones de altas temperaturas y bajas precipitaciones en el estado de Sonora, los agentes causales de muerte regresiva en las huertas de cítricos de la costa de Hermosillo, son diferentes a las especies de hongos encontrados en otras regiones de México.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Identificar a los agentes causales de enfermedades de la madera en cítricos de Hermosillo, Sonora.

1.4.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar morfológica y molecularmente los hongos aislados de madera de cítricos.

2. Estimar la virulencia de hongos de la madera seleccionados en árboles de cítricos.
3. Buscar estrategias de control para hongos de la madera de cítricos.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Diagrama de flujo del presente estudio

A continuación, se presenta en la Figura 1 el diagrama de flujo de la metodología general que se siguió para el trabajo.

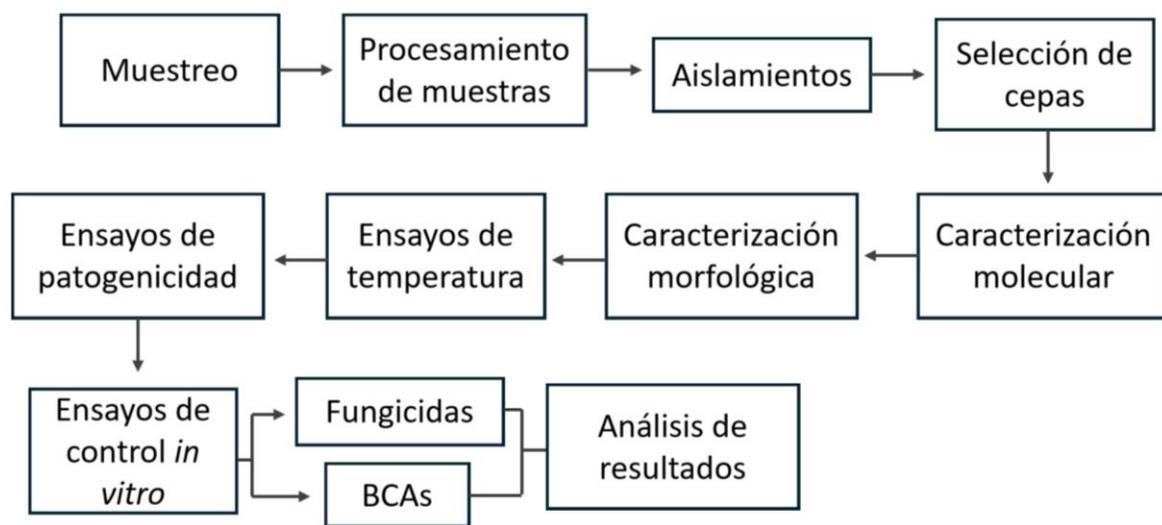


Figura 1. Diagrama de flujo de la metodología general del presente estudio.

2.2 Recolecta y procesamiento de muestras

Para realizar este muestreo, se seleccionaron 42 huertas distribuidas en toda la costa de Hermosillo. Se tomaron muestras en 58 puntos (Figura 2). Para cada punto, se hizo una colecta de 5 a 10 ramas de 15 cm de largo aproximadamente, que presentaban síntomas de canchros o gomosis (Figura 3) y se guardaron en bolsas de papel.

Las bolsas fueron etiquetadas con el nombre de la huerta de procedencia, las coordenadas geográficas, el hospedante (naranja, toronja, limón o mandarina), el nombre del recolector y el número de muestra. La mayoría de las huertas donde se hizo la recolecta de las ramas, fueron de naranja, seguido del resto de los diferentes cultivos. Las muestras se mantuvieron en una hielera durante su traslado al Laboratorio de Fitopatología del CICESE para su posterior evaluación.

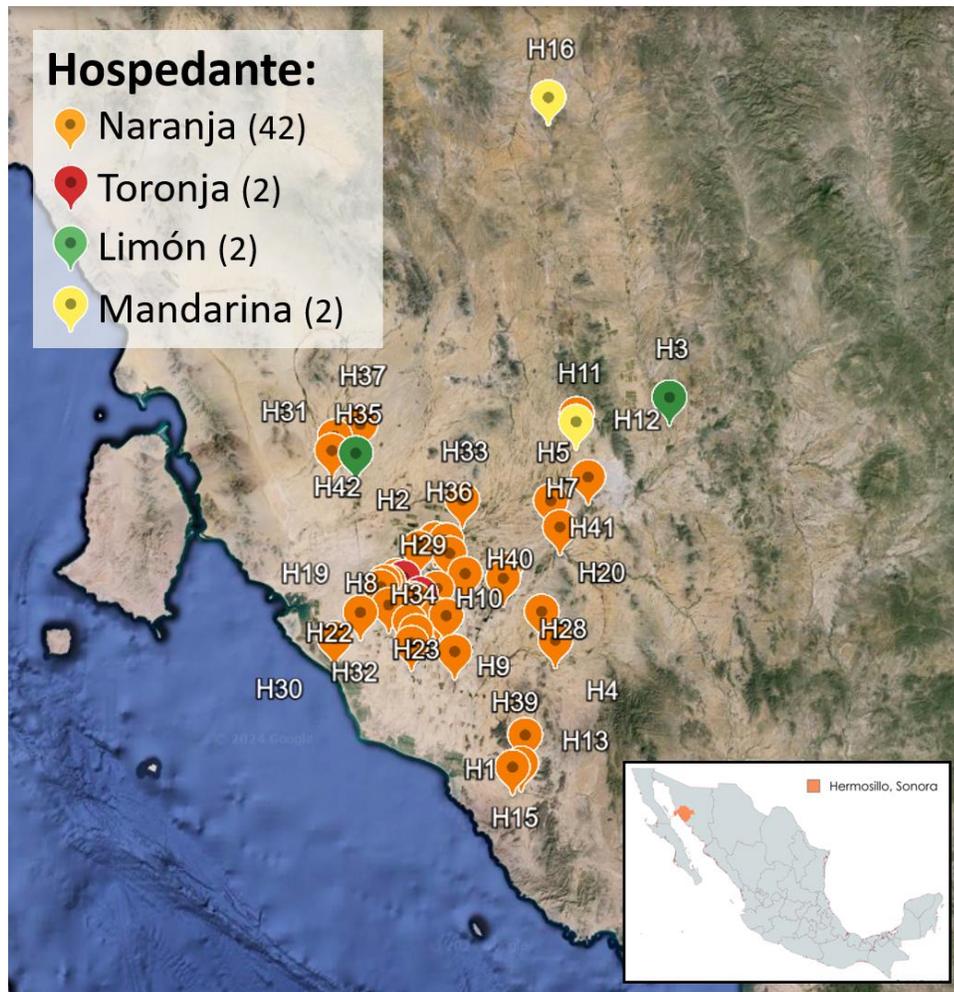


Figura 2. Ubicación de las 42 huertas de donde se tomaron muestras en la costa de Hermosillo. Los colores indican el tipo de árbol (naranja, toronja, limón o mandarina) de donde se colectaron las ramas.

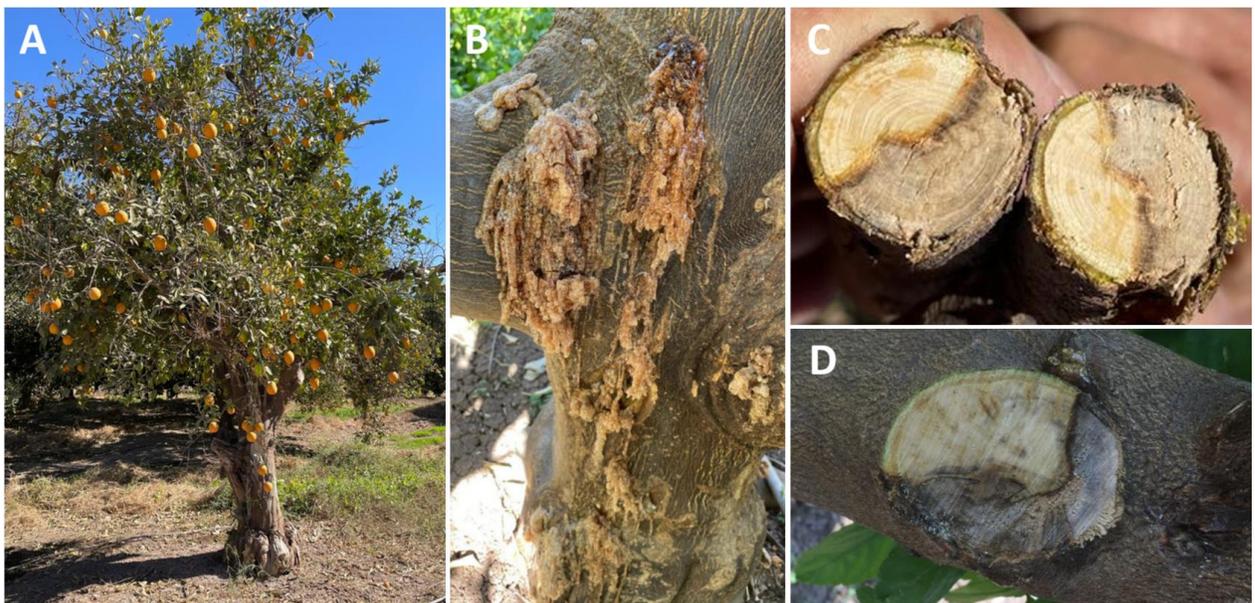


Figura 3. Sintomatología observada en árboles de huertas en la costa de Hermosillo. **A.** Muerte regresiva. **B.** Gomosis. **C, D.** Cancros.

2.3 Aislamiento de hongos de la madera

2.3.1 Observación de síntomas en las ramas

En las muestras recibidas, se observaron en las ramas síntomas de cancro, gomosis, necrosis, entre otros (Figura 4). De igual manera, se realizó registro de los 58 puntos muestreados y de las huertas a las que pertenecían.

2.3.2 Aislamientos fúngicos

Una vez identificadas las partes de las ramas con síntomas, se cortaron con tijeras de jardinería en trozos de 0.5 cm de largo, se les retiró la corteza y se reservaron en cajas Petri (por cada punto de muestreo). Para esterilizar superficialmente los trozos de madera, se sumergieron en alcohol y se pasaron rápidamente por la flama de un mechero Bunsen. Después, se colocaron 5 trozos de forma equidistante por placa Petri de 9 cm de diámetro, con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) casero (Anexo A) suplementado con cloranfenicol (15 mg/mL).

Las cajas Petri se mantuvieron en una incubadora bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de 30 °C y se revisaron diariamente para observar si había crecimiento de micelio. Las cajas en donde no se observó crecimiento micelial después de los 15 días, se descartaron. Para la obtención de cultivos puros - del micelio observado-, se recuperaron puntas de hifas con la ayuda de palillos de dientes estériles, y se inocularon en el centro de cajas Petri nuevas con medio PDA casero adicionado con cloranfenicol. De todos los cultivos puros se hicieron resguardos en microtubos de 2 ml con medio de PDA y se mantuvieron en refrigeración a -4°C.

2.4 Caracterización morfológica inicial

De cada punto de muestreo se recuperaron solamente cepas que presentaban características morfológicas similares a hongos de la madera, de acuerdo con su morfología colonial y en algunos, de sus esporas. Las cepas que se consideraron contaminantes, tales como *Penicillium* y *Alternaria* se descartaron. El resto de las cepas se mantuvieron en resguardo.

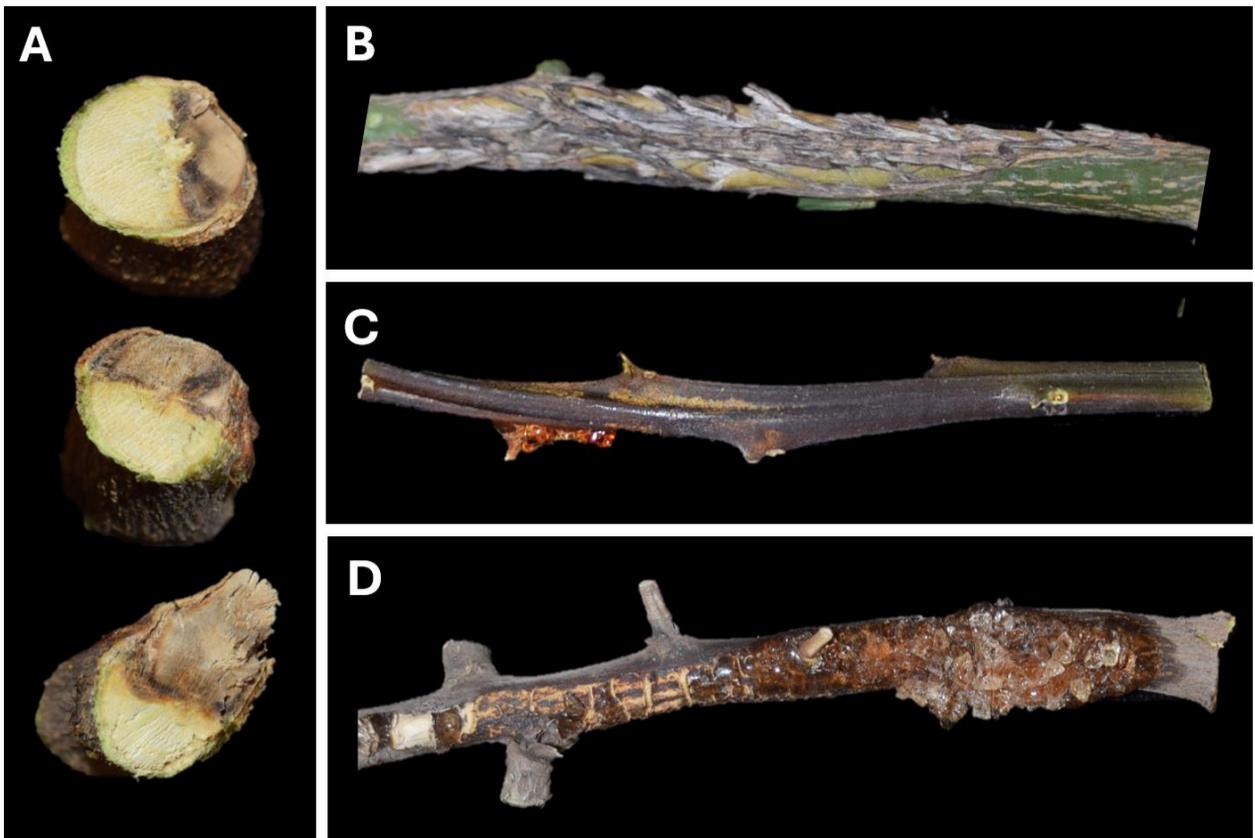


Figura 4. Síntomas más comunes observados en las ramas de plantas de cítricos que llegaron al Laboratorio de Fitopatología para la obtención de hongos. **A.** Cancros. **B.** Gomosis. **C.** Lesión necrótica y gomosis. **D.** Herida por insecto.

2.5 Caracterización molecular

2.5.1 Extracción de ADN

Para la obtención del micelio de las cepas seleccionadas, se inoculó cada uno de los hongos en tubos de 50 ml conteniendo 20 ml de medio de cultivo líquido PDB (caldo papa dextrosa) y se mantuvieron en agitación constante a 200 rpm por 2 a 3 días a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se sacaron los tubos del agitador orbital. Para recuperar el micelio, se decantó el medio de cultivo líquido de los tubos, se pasaron los micelios a microtubos de 1.5 ml y se guardaron en congelación hasta su procesamiento.

Para la extracción de ADN, el micelio congelado se descongeló y se maceró utilizando pistilos de polipropileno estériles, perlas de vidrio y un taladro. Una vez triturado, se siguió el protocolo de CTAB (Wagner *et al.*, 1987) con modificaciones (Anexo B).

2.5.2 Amplificación y secuenciación para identificación de hongos

Para las amplificaciones por PCR del factor de elongación TEF-1 α se utilizaron los oligonucleótidos EF1-688F (5'-CGGTCCTTGATCTACAAGTGC-3') y EF1-1251R (5'-CCTCGAACTCACCAGTACCG-3'). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Bio-rad T-100 con un ciclo inicial de 95 °C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 s, y 72 °C durante 1 minuto, concluyendo con un ciclo final de 72 °C por 10 minutos. Una vez observados en el gel de electroforesis, se procedió a purificar los productos utilizando un protocolo de purificación casero (Anexo C). Los productos purificados fueron enviados para su secuenciación a la compañía *Eton Bioscience Inc.*

Con las secuencias obtenidas del TEF-1 α , se hizo un análisis de BLAST en la base de datos de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Esto sirvió para obtener las secuencias de especies de hongos cercanas y seleccionar cepas para realizar amplificaciones usando el marcador para la región de ITS. Los oligonucleótidos usados para amplificar ITS fueron ITS-1 (5') e ITS-4 (5') (White *et al.* 1990). Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Bio-rad T-100 como se describió con el otro marcador.

2.5.3 Análisis filogenético

Una vez obtenidas las secuencias de los hongos seleccionados con ambos marcadores, se hizo un análisis concatenado de las secuencias y se realizó un alineamiento múltiple usando ClustalW con parámetros por defecto, para hacer un análisis filogenético utilizando el software MEGA-X.

2.6 Caracterización morfológica

2.6.1 Crecimiento en medios de cultivo PDA y MEA

Las cepas seleccionadas a partir del análisis filogenético se crecieron en medios de cultivo de PDA y agar extracto de malta (MEA) para observar las diferencias en el crecimiento de los hongos. Se crecieron las cepas en medio de cultivo PDA durante 5 días a 28 °C, después se tomaron discos de micelio de 5 mm de cada una y se colocaron en el centro de cajas Petri con los medios correspondientes. Las placas se incubaron a 28 °C hasta que los hongos completaron su crecimiento en la caja.

2.6.2 Observación de estructuras macroscópicas y microscópicas

Para la caracterización morfológica de los hongos, los aislados de la familia Botryosphaeriaceae se inocularon en medio de cultivo PDA con trozos de madera de naranjo o acículas de pino estériles colocados sobre el medio de cultivo previamente vaciado en las cajas Petri, para inducir la producción de picnidios. Las cajas se mantuvieron en la incubadora en condiciones de oscuridad a 28 °C por 7 días, transcurrido este tiempo, se mantuvieron bajo luz natural hasta observar los picnidios. Los picnidios maduros se tomaron con ayuda de un palillo de dientes estéril, se colocaron en un portaobjetos con una gota de KOH al 10%. Encima de ello se colocó una cinta adhesiva transparente y se realizó una ligera presión con el dedo pulgar para liberar las conidiosporas.

La observación de las estructuras microscópicas se hizo en un microscopio invertido Axiovert 200 Zeiss en campo claro, se tomaron fotografías con una cámara Rising View Rc y se procesaron usando el software AxioVision ver. 4.70, colocando las escalas microscópicas. Posteriormente, se realizaron las mediciones de las dimensiones de las esporas formadas por aislados seleccionados. Se utilizó la aplicación de ImageJ para tomar las medidas de la longitud y el ancho de las esporas. En una tabla se colocaron por cepas, las tallas mayores y menores registradas por los conidios, el valor que más se repitió de estas medidas (moda), el promedio y la desviación estándar.

2.6.3 Ensayos de temperatura

Para evaluar la temperatura óptima de crecimiento de las cepas de la familia Botryosphaeriaceae, se seleccionaron cepas de los hongos con mayor incidencia en las huertas de Hermosillo. Consistieron en colocar un disco de micelio de 5 mm de cada hongo en el borde de una caja Petri con medio PDA y sellarlas con cinta. Las placas inoculadas se expusieron a temperaturas de 25 °C, 28 °C, 30 °C, 35 °C, 37 °C y 40 °C. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada cepa. Las cajas se monitorearon diariamente hasta observar que el crecimiento de los hongos completara la caja, dando por terminado el ensayo. Una vez retiradas de las incubadoras, se aplicó la ecuación 1, utilizada por Rangel *et al* (2021) para estimar la tasa de crecimiento de $\text{mm} \cdot \text{día}^{-1}$.

$$TC = \frac{(R_f - R_i)}{T_f - T_i} \quad (1)$$

Donde: TC = tasa de crecimiento, Rf = radio final, Ri = radio inicial, Tf = tiempo final y Ti = tiempo inicial.

2.7 Ensayos de patogenicidad

Para realizar los ensayos de patogenia de cepas seleccionadas, se utilizaron plantas de naranja valencia de 2 años. Primero, se pusieron a crecer las cepas en medio de cultivo PDA durante 5 días a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se obtuvieron discos de micelio de 5 mm de diámetro para inocularlas en las ramas de al menos 15 cm de largo (Figura 5).

Para ello, a las ramas se les realizó una herida mecánica de 5 mm de profundidad con un taladro, utilizando una broca de 3 mm. En esa herida se colocó un disco de micelio y se cubrió con Parafilm. Se hicieron 10 réplicas por cada cepa y se monitoreó el progreso de los síntomas a 7, 14, 30, 60 y 90 días. Como control negativo, se inocularon ramas con discos de medio PDA, siguiendo el mismo protocolo que con los discos de micelio.



Figura 5. Procedimiento para la inoculación de los hongos seleccionados en las ramas. **A.** Herida mecánica hecha con taladro. **B.** Inoculación del hongo usando discos de micelio colocados en las heridas provocadas con el taladro. **C.** Cubrimiento de la herida con Parafilm.

Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero sin control de temperatura, bajo un diseño totalmente al azar. Al finalizar el experimento se evaluó el tamaño de la lesión y la presencia de síntomas de (gomosis, cancro y marchitamiento). El tamaño de la lesión se comparó usando un análisis estadístico con la prueba de Tukey en el programa de RStudio para realizar una comparación entre los diferentes tratamientos.

2.8 Ensayos de control de hongos seleccionados

2.8.1 Ensayos *in vitro* usando productos comerciales químicos y orgánicos

Para evaluar estrategias de control, se realizaron ensayos *in vitro* con fungicidas químicos y orgánicos contra las cepas que demostraron ser las más virulentas en los ensayos de patogenicidad. En la Tabla 1 se indican los productos evaluados y las concentraciones empleadas. Para ello, se hicieron medios envenenados consistentes en una combinación de medio PDA y la concentración sugerida por el fabricante de cada producto. Una vez solidificado el medio, se sembró un disco de micelio del hongo seleccionado en el centro de la caja y se evaluó su crecimiento.

Como control, se sembró un disco de micelio de las cepas patógenas en medio de PDA sin tratamiento. De cada cepa se hicieron tres réplicas para poder obtener un promedio de la inhibición de cada cepa. Se realizaron mediciones a los 4 y 5 días del crecimiento de las hifas para estimar la inhibición de cada fungicida sobre los hongos seleccionados.

Tabla 1. Productos comerciales químicos y orgánicos evaluados para el ensayo de inhibición de cepas de hongos aislados de cítricos.

Producto comercial	Ingrediente activo	Tipo	
		Químico	Orgánico
Switch	Cyprodinil y fludioxonil	X	
Proud	Aceite de tomillo		X
Derosal	Carbendazim	X	
Fubagro	Extracto de gobernadora, extracto de pino y ácido cítrico		X
Tebuconazol	Benzimidazol	X	
Double-Nickel	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>		X
Pyraclostrobina	Piraclostrobin	X	
Cabrio	Boscalid y Pyraclostrobin	X	
Tachigaren	Hymexazol	X	

Para calcular el porcentaje de inhibición, se utilizó la ecuación 2, propuesta por Vincent (1947).

$$I = \frac{C - T}{T} \times 100 \quad (2)$$

Donde: I = porcentaje de inhibición, C = crecimiento radial de la colonia control, T = crecimiento radial de

la colonia con el tratamiento.

2.8.2 Agentes de control biológico

Para seleccionar los organismos más eficientes para inhibir al hongo patógeno más agresivo, se realizaron ensayos de confrontación con agentes de control biológico. Los hongos antagonistas que se evaluaron fueron cepas de *Trichoderma* aisladas de diferentes fuentes, de *Chaetomium* aisladas de distintos hospedantes y cepas de bacterias del género de *Bacillus*. Las cepas usadas y su fuente se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Agentes de control biológico evaluados.

Cepa	Origen	Especie	Organismo
M2-A	Endófito de vid	<i>Trichoderma</i> sp.	Hongo
M3 Ph	Endófito de naranjo	<i>T. harzianum</i>	Hongo
Tricho-sin	Producto comercial	<i>T. harzianum</i>	Hongo
T-ORO	Producto comercial	<i>T. asperellum</i>	Hongo
EF09BCMX	Endófito de plantas de vid	<i>T. asperellum</i>	Hongo
EF11BCMX	Endófito de plantas de vid	<i>T. asperellum</i>	Hongo
Tat	Producto comercial	<i>T. atroviride</i>	Hongo
Tasp	Producto comercial	<i>T. asperellum</i>	Hongo
T06BCMX	Endófito de vid	<i>T. harzianum</i>	Hongo
T09BCMX	Endófito de vid	<i>T. asperellum</i>	Hongo
T11BCMX	Endófito de vid	<i>T. asperellum</i>	Hongo
NLC62	Endófito de nogal	<i>Chaetomium globosum</i>	Hongo
LCCH4-d	Endófito de vid	<i>Chaetomium</i> sp.	Hongo
SCT26-1	Endófito de naranjo	<i>C. megalocarpum</i>	Hongo
BEVP26BCMX	Endófito de vid	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Bacteria
BEVP31BCMX	Endófito de vid	<i>B. amyloliquefaciens</i>	Bacteria
BEVP01BCMX	Endófito de vid	<i>B. mojavensis</i>	Bacteria

Para los ensayos de confrontación con *Trichoderma*, se colocó un disco micelial de 5 mm del patógeno en un borde de la caja Petri con medio de cultivo PDA y del otro lado se depositó un disco de micelio del mismo tamaño, del hongo antagonista. A las cepas de *Chaetomium* se les dio una ventaja de 4 días antes de colocar el disco del patógeno, debido a que tiene una tasa de crecimiento lenta.

Por otro lado, de las bacterias de *Bacillus* se colocaron 10 µl de cultivo (crecido por 24 horas en medio PY), se dejaron secar y posteriormente se colocó el disco del hongo patógeno.

Los ensayos se realizaron por triplicado para cada uno de los agentes de control biológico evaluados y se incubaron a 28 °C. A los 4 días, se retiraron las cajas de las incubadoras y se aplicó la ecuación 3, de Méndez-Bravo *et al.* (2018) para calcular el crecimiento radial del fitopatógeno en los diferentes tratamientos:

$$\% \text{inhibición} = \frac{(R - r)}{R} \times 100 \quad (3)$$

En donde: R = radio de colonia del hongo patógeno (control) y r = radio de colonia del hongo patógeno en confrontación con los tratamientos.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Procesamiento de muestras

Las muestras que fueron colectadas de las huertas de Hermosillo presentaron síntomas de cancro, lesiones necróticas, gomosis y tizón (Figura 2 y 3). De las 42 huertas y 58 puntos de muestreo se obtuvieron más de 300 aislados, de los cuales se seleccionaron 173 para su caracterización molecular. Cada uno de estos aislados fue nombrado de acuerdo con el lugar del muestreo (S = Sonora), el tipo de cultivo (CT = cítrico), el punto de muestreo al que pertenecía (1 – 58), y seguido de un guion, el número correspondiente al aislado por punto.

3.2 Caracterización molecular

De acuerdo con las secuencias obtenidas de la amplificación por PCR de los fragmentos de factor de elongación TEF-1 α de los 173 aislados, se recabaron los códigos de acceso del GenBank de los diferentes aislamientos de cada especie de la familia Botryosphaeriaceae para su análisis filogenético (Anexo D). A partir de este análisis, se seleccionaron los 32 aislados de mayor interés para hacer la amplificación de la región de ITS.

Se observó una gran diversidad de aislamientos fúngicos en las muestras, demostrado por la variedad de morfologías. De los 58 puntos de muestreo distribuidos en las 42 huertas, se observaron cuatro síntomas diferentes en las ramas: cancro, gomosis, tizón y heridas causadas por insectos (Anexo E). El síntoma prevalente en las ramas fue el de tizón, seguido por los canchros y después la gomosis (Figura 6, A). Los hongos con mayor número de aislados fueron los géneros de *Lasiodiplodia*, *Colletotrichum*, *Dothiorella* y *Fusarium* (Figura 6, B).

El hongo de *Lasiodiplodia* se distinguió por tener una mayor incidencia en las huertas con dos especies identificadas, mientras que *Fusarium* destacó por tener la mayor variedad de especies. A partir de la incidencia y relevancia, se seleccionaron 32 cepas con las que se trabajó a lo largo del proyecto para su caracterización (Figura 7). Del total de aislados obtenidos, se encontró que más de la mitad pertenecieron a la familia Botryosphaeriaceae (Anexo F). De esta familia se encontraron hongos de los géneros *Lasiodiplodia*, *Dothiorella*, *Phaeobotryon*, *Oblongocollomyces*, *Barriopsis* y *Pseudofusicoccum*. Por ello, se

hizo un enfoque en la caracterización de los géneros pertenecientes a esta familia y para los ensayos de patogenicidad y control.

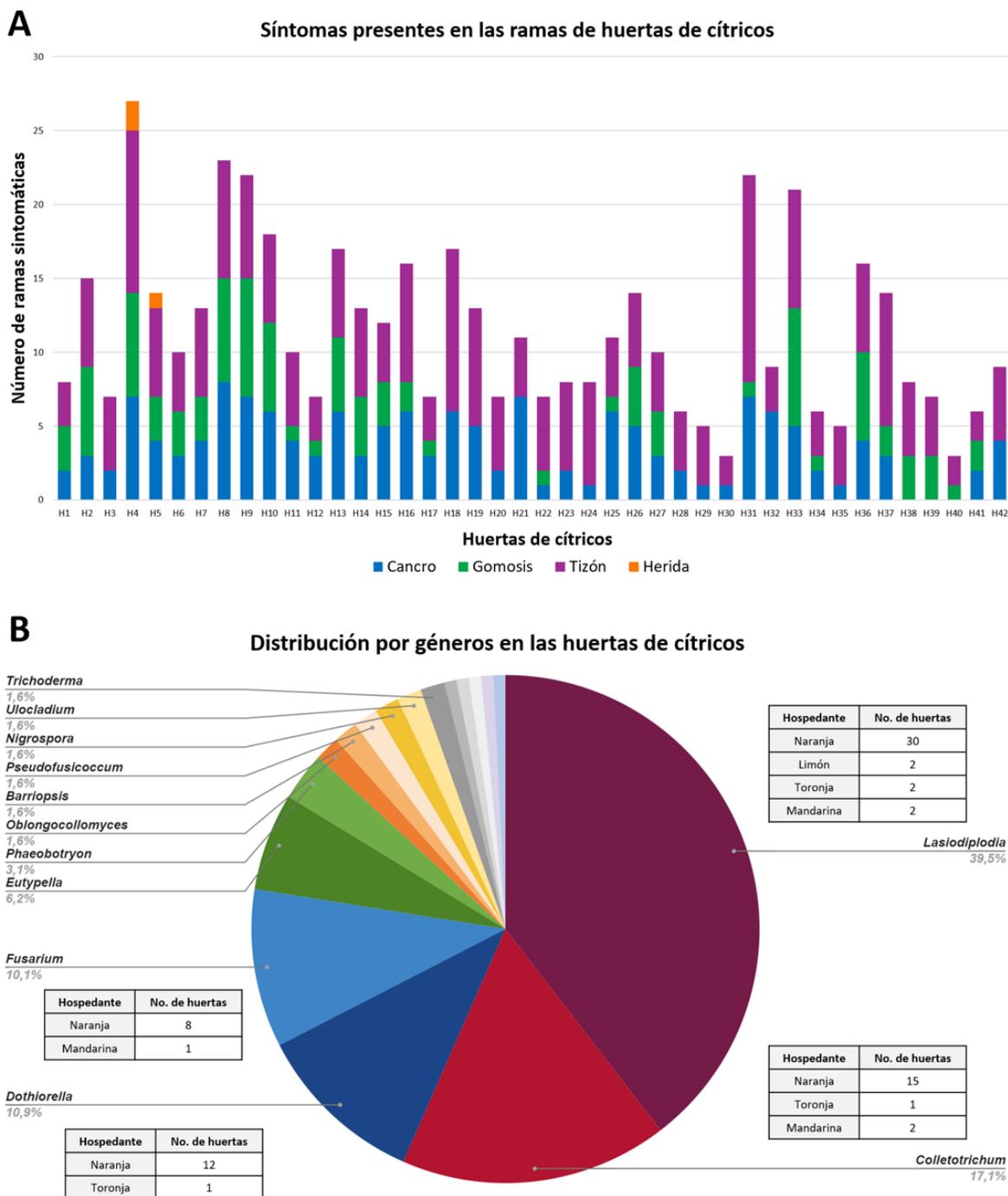


Figura 6. Síntomas observados en las huertas y géneros prevalentes identificados. **A.** Gráfica de columnas apiladas de los síntomas observados en las ramas colectadas por huerta. **B.** Gráfico circular de los géneros identificados en las huertas, señalando la cantidad de huertas de donde los géneros prevalentes (*Lasiodiplodia*, *Colletotrichum*, *Dothiorella* y *Fusarium*) fueron aislados.

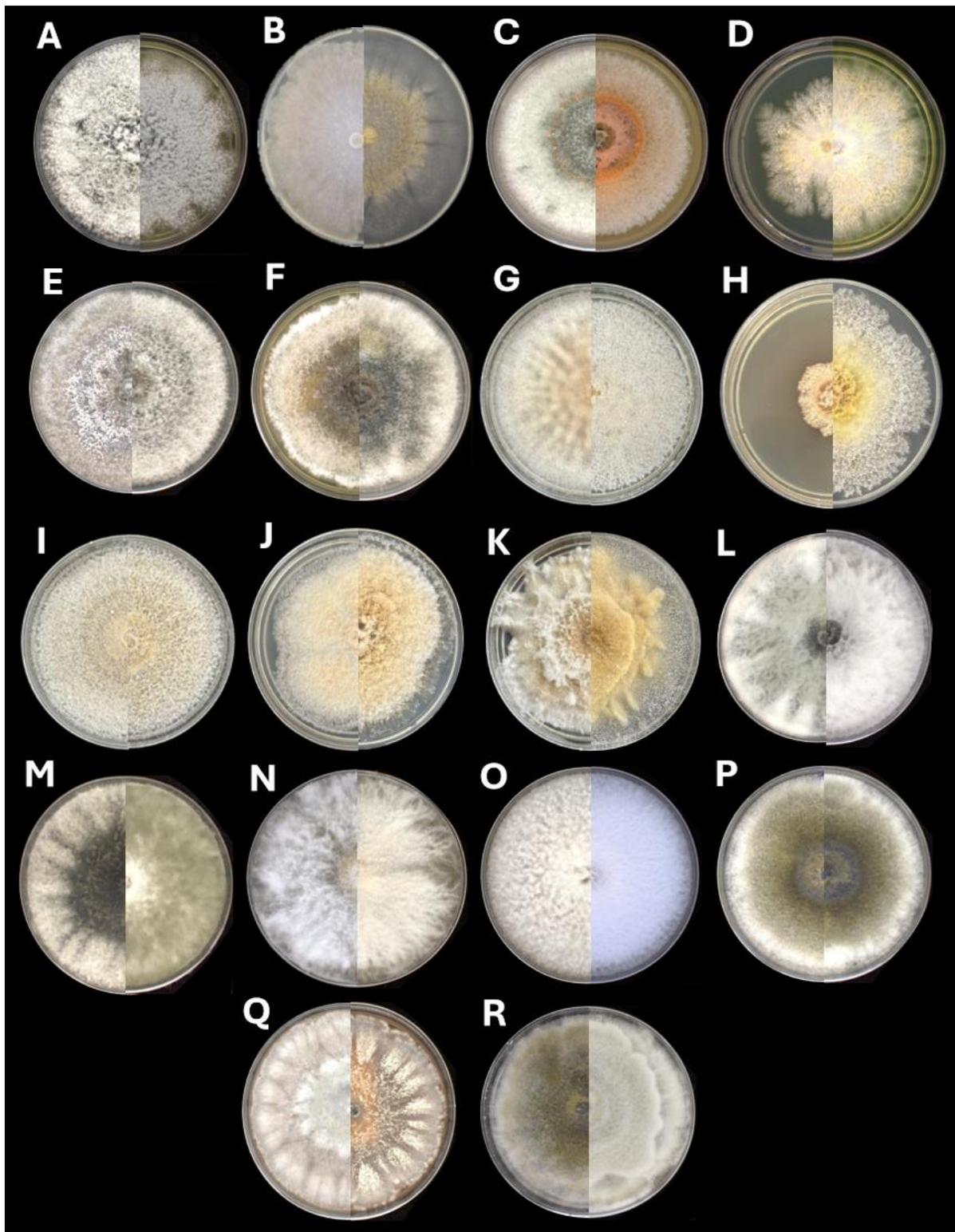


Figura 7. Diversidad de morfologías de las especies seleccionadas y su crecimiento en medio MEA (lado izquierdo) y PDA (lado derecho). **A.** *Barriopsis iraniana* 45-2. **B.** *Chaetomium megalocarpum* SCT26-1. **C.** *Colletotrichum gloeosporioides* SCT22-2. **D.** *Diatrype* sp. SCT29-5. **E.** *Dothiorella mangifericola* SCT21-1. **F.** *D. citricola* SCT23-2. **G.** *Fusarium citri* SCT07-3. **H.** *F. incarnatum* SCT15-1. **I.** *F. nanum* SCT05-2. **J.** *F. nucidum* SCT51-5. **K.** *F. pernambucanum* SCT58-2. **L.** *Lasiodiplodia iraniensis* SCT35-1. **M.** *L. subglobosa* SCT41-1. **N.** *Eutypella* sp. SCT06-3. **O.** *Nigrospora sphaerica* SCT45-3. **P.** *Phaeobotryon* sp. SCT04-2. **Q.** *Pseudofusicoccum stromaticum* SCT18-2 **R.** *Oblongocollomyces* sp. SCT31-1.

3.2.1 Análisis filogenético de la familia Botryosphaeriaceae

A partir del análisis filogenético (Figura 8), se identificaron las siguientes especies de la familia Botryosphaeriaceae: *Barriopsis iraniana*, *Dothiorella mangifericola*, *D. citricola*, *Lasiodiplodia iraniensis*, *L. subglobosa*, *Phaeobotryon* sp., *Pseudofusicoccum stromaticum* y *Oblongocollomyces* sp.

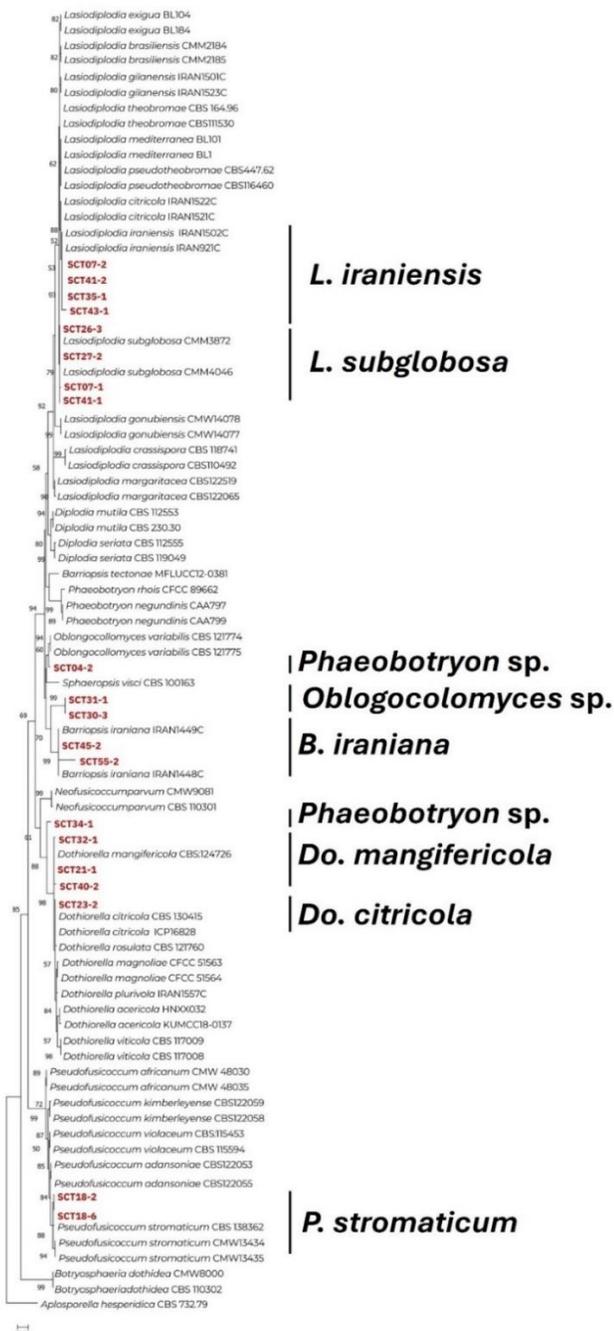


Figura 8. Análisis filogenético de las cepas de la familia Botryosphaeriaceae a partir de las secuencias concatenadas de las regiones de TEF-1 α e ITS. Los aislados obtenidos de este trabajo están marcados en rojo.

3.3 Caracterización morfológica de cepas seleccionadas

3.3.1 Familia Botryosphaeriaceae

A continuación, se describen las especies de la familia Botryosphaeriaceae encontradas en este estudio, sus características más relevantes y sus tolerancias a distintas temperaturas.

3.3.1.1 *Barriopsis*

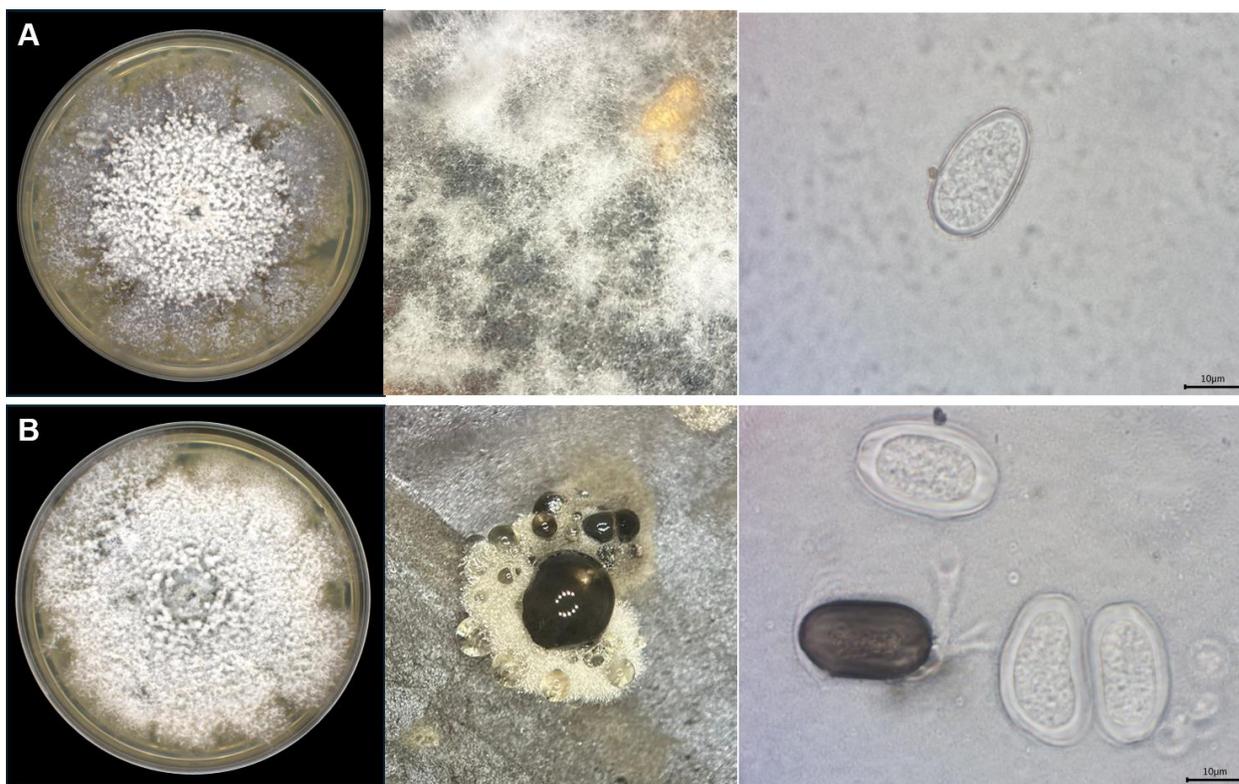


Figura 9. Características morfológicas del género de *Barriopsis*. A. *B. iraniana* SCT45-2: crecimiento en PDA, micelio y espora hialina. B. SCT55-2 *B. iraniana*: crecimiento en PDA, picnidio y esporas hialinas y pigmentadas. Escala: 10 μ m.

Se identificó a la especie *Barriopsis iraniana*. Los aislados del género de *Barriopsis* tuvieron un crecimiento irregular en los medios de PDA y MEA, con un micelio blanco y polvoso a la semana, oscureciéndose hasta un gris claro entre los 7 y 10 días (Figura 9). Sus esporas tenían forma de elipsoide; las inmaduras eran hialinas y las maduras pigmentadas, aseptadas y estriadas, con una dimensión promedio de 24.8 μ m x 15.1

μm (Tabla 3). Estos hongos fueron aislados de cultivos de naranja de dos huertas diferentes (H22 y H34), abarcando un 0.2% de los aislados pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae.

Tabla 3. Dimensiones de las conidiosporas de cepas seleccionadas de *Botryosphaeria iraniana*, aisladas de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora.

Especie	Cepa	Origen	Tamaño de conidio (μm)	Promedio \pm Desviación estándar (μm)
<i>B. iraniana</i>	SCT45-2	H22	27.0 - 22.1 (23.2) x 18.3 - 13.8 (16.2)	20.5 \pm 2.3 x 9.1 \pm 0.76
<i>B. iraniana</i>	SCT55-2	H34	22-1 - 15.8 (17.5) x 12.8 - 8.3 (9.7)	17.7 \pm 1.5 x 9.8 \pm 0.98

*Talla mayor – talla menor (moda) x ancho mayor – ancho menor (moda) de 20 conidios seleccionados.

3.3.1.2 *Dothiorella*

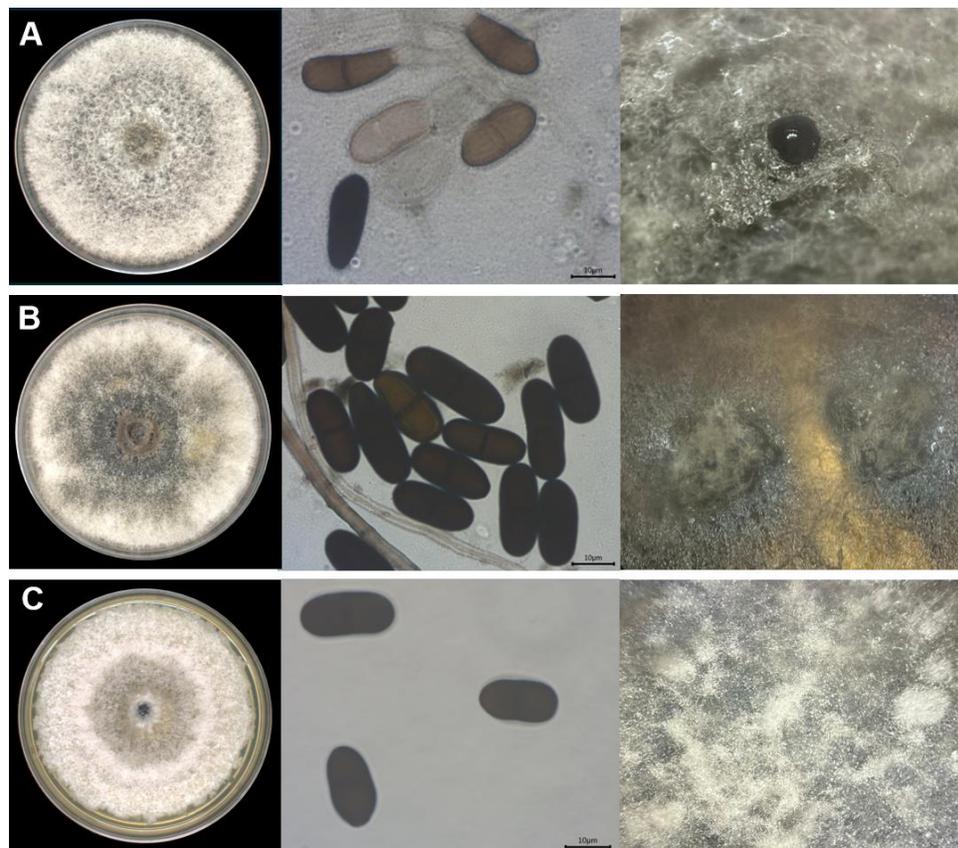


Figura 10. Características morfológicas del género *Dothiorella*. A. *D. mangifericola* SCT21-1: crecimiento en medio PDA, esporas hialinas y pigmentadas septadas, y picnidio. B. *D. citricola* SCT23-2: crecimiento en PDA, esporas pigmentadas y septadas, y picnidios. C. *D. mangifericola* SCT32-1: crecimiento en PDA, esporas pigmentadas y septadas, y micelio blanquecino plano.

Tabla 4. Listado de incidencia de *Dothiorella* en las huertas.

Huerta		Hospedante	Cepa	Especie
1	H5	Naranja	SCT05-4	<i>Dothiorella</i> sp.
2	H6	Naranja	SCT06-5	<i>Dothiorella</i> sp.
3	H7	Naranja	SCT52-1	<i>D. viticola</i>
4	H19	Naranja	SCT21-1	<i>D. mangifericola</i>
		Naranja	SCT22-2	<i>Dothiorella</i> sp.
5	H20	Naranja	SCT22-1	<i>D. plurivora</i>
6	H21	Naranja	SCT23-2	<i>D. citricola</i>
7	H23	Naranja	SCT26-2	<i>D. mangifericola</i>
			SCT26-4	<i>D. citricola</i>
8	H29	Naranja Toronja	SCT32-1	<i>D. mangifericola</i>
9	H30	Naranja	SCT33-1	<i>Dothiorella</i> sp.
10	H34	Naranja	SCT55-3	<i>Dothiorella</i> sp.
11	H36	Naranja	SCT39-2	<i>Dothiorella</i> sp.
12	H37	Naranja	SCT40-2	<i>D. mangifericola</i> .

El género de *Dothiorella* fue el tercer género con mayor número de aislados, con una incidencia del 28.57% en las huertas (Tabla 4) y con un porcentaje del 18.46% en la familia. Las cepas se caracterizaron por tener un micelio aéreo blanco, el cual se oscurecía con el paso del tiempo hasta tomar un color de gris oscuro a negro.

Estos aislados se distinguieron por presentar manchas grises en el reverso de la placa. La especie principal que se encontró fue *D. mangifericola*, que en comparación con la cepa de *D. citricola*, tenían un micelio de color más claro (Figura 10). Las dimensiones de esporas de *Dothiorella citricola* fueron mayores que las de *D. mangifericola* (Tabla 5).

Tabla 5. Dimensiones de las conidiosporas de cepas seleccionadas de *Dothiorella* spp. aisladas de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora.

Especie	Cepa	Origen	Tamaño de conidio (µm)	Promedio ± Desviación estándar (µm)
<i>D. citricola</i>	SCT23-2	H21	26.7 - 17.6 (23.0) x 11.4 - 9.1 (10.1)	22.8 ± 1.8 x 10.1 ± 0.6
<i>D. mangifericola</i>	SCT21-1	H19	23.6 - 16.3 (21.3) x 10.3 - 7.3 (8.7)	20.5 ± 2.3 x 9.1 ± 0.76
<i>D. mangifericola</i>	SCT32-1	H29	22.1 - 15.8 (17.5) x 12.8 - 8.3 (9.7)	17.7 ± 1.5 x 9.8 ± 0.98
<i>D. mangifericola</i>	SCT40-2	H37	20.2 - 17.1 (18.3) x 11.9 - 9.2 (9.7)	18.7 ± 1.0 x 10.1 ± 0.73

*Talla mayor – talla menor (moda) x ancho mayor – ancho menor (moda) de 20 conidios seleccionados.

3.3.1.3 *Lasiodiplodia*

Lasiodiplodia se destacó por ser el género con la mayor cantidad de aislados de los cuatro cultivos muestreados con un porcentaje total de todos los aislados del 39.5%, un 67.1% de la familia Botryosphaeriaceae y con una incidencia en las huertas del 76% (Tabla 6). *Lasiodiplodia iraniensis* fue la especie predominante, encontrándose en 24 huertas, mientras que *L. subglobosa* se encontró en 8 sitios. Solamente en cinco huertas H7, H16, H22, H24 y H38 se encontraron ambas especies.

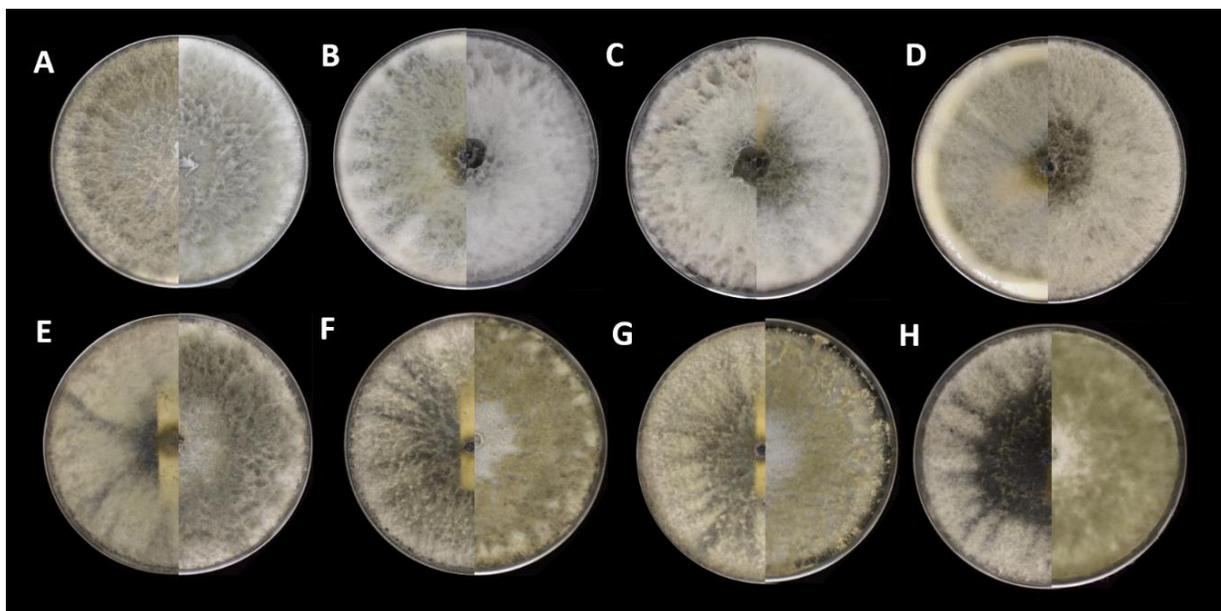


Figura 11. Cepas de *Lasiodiplodia* seleccionadas, crecidas por 7 días en medios de MEA (izquierda) y PDA (derecha). **A.** *L. iraniensis* SCT07-2. **B.** *L. iraniensis* SCT35-1. **C.** *L. iraniensis* SCT41-2. **D.** *L. iraniensis* SCT43-1. **E.** *L. subglobosa* SCT07-1. **F.** *L. subglobosa* SCT26-3. **G.** *L. subglobosa* SCT27-2. **H.** *L. subglobosa* SCT41-1.

Tabla 6. Listado de incidencia de *Lasiodiplodia* en las huertas.

Huerta	Hospedante	Cepa	Especie	
1	H2	Naranja	SCT02-1	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>
			SCT02-2	<i>L. iraniensis</i>
2	H3	Limón	SCT03-1	<i>L. iraniensis</i>
3	H4	Naranja	SCT04-1	<i>L. iraniensis</i>
4	H5	Naranja	SCT05-3	<i>L. iraniensis</i>
5	H7	Naranja	SCT07-1	<i>L. subglobosa</i>
			SCT07-2	<i>L. iraniensis</i>
8	H8	Toronja	SCT08-2	<i>L. iraniensis</i>
			SCT08-3	<i>L. iraniensis</i>
			SCT09-3	<i>L. iraniensis</i>
			SCT09-4	<i>L. iraniensis</i>

9	H9	Naranja	SCT10-1	<i>L. iraniensis</i>
10	H10	Naranja	SCT11-1	<i>L. iraniensis</i>
11	H11	Mandarina	SCT50-1	<i>L. iraniensis</i>
12	H12	Naranja	SCT14-1	<i>L. subglobosa</i>
13	H16	Naranja Mandarina	SCT18-3	<i>L. subglobosa</i>
			SCT51-2	<i>L. iraniensis</i>
14	H17	Naranja	SCT19-1	<i>L. iraniensis</i>
			SCT19-2	<i>L. iraniensis</i>
15	H18	Naranja	SCT20-1	<i>L. iraniensis</i>
			SCT53-2	<i>L. iraniensis</i>
16	H19	Naranja	SCT57-1	<i>L. iraniensis</i>
17	H22	Naranja	SCT24-1	<i>L. subglobosa</i>
			SCT45-1	<i>L. iraniensis</i>
18	H23	Naranja	SCT26-3	<i>L. subglobosa</i>
19	H24	Naranja	SCT27-2	<i>L. subglobosa</i>
			SCT49-1	<i>L. iraniensis</i>
			SCT49-2	<i>L. iraniensis</i>
20	H25	Naranja	SCT28-4	<i>L. iraniensis</i>
21	H26	Naranja	SCT29-4	<i>L. iraniensis</i>
22	H28	Naranja	SCT31-2	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
23	H29	Naranja Toronja	SCT32-2	<i>L. iraniensis</i>
			SCT42-2	<i>L. iraniensis</i>
24	H31	Naranja	SCT25-1	<i>L. iraniensis</i>
			SCT54-1	<i>L. iraniensis</i>
			SCT54-2	<i>L. iraniensis</i>
25	H32	Naranja	SCT35-1	<i>L. iraniensis</i>
			SCT58-4	<i>L. iraniensis</i>
26	H33	Naranja	SCT36-2	<i>L. iraniensis</i>
27	H34	Naranja	SCT55-1	<i>L. iraniensis</i>
28	H35	Limón	SCT38-1	<i>L. iraniensis</i>
29	H36	Naranja	SCT39-1	<i>L. iraniensis</i>
30	H37	Naranja	SCT46-2	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
31	H38	Naranja	SCT41-1	<i>L. subglobosa</i>
			SCT41-2	<i>L. iraniensis</i>
32	H39	Naranja	SCT43-1	<i>L. iraniensis</i>
			SCT43-3	<i>L. iraniensis</i>
33	H40	Naranja	SCT44-1	<i>L. iraniensis</i>
34	H41	Naranja	SCT47-1	<i>L. subglobosa</i>
			SCT47-2	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			SCT47-3	<i>Lasiodiplodia</i> sp.

Estas especies se distinguen por tener un rápido crecimiento, pues alcanzan a cubrir la caja Petri en los primeros 3 días en su temperatura óptima. Su micelio es aéreo y de color gris claro, el cual oscurece con el paso de los días, tomando una coloración entre café oscuro y negro.

Sus conidios tienen forma ovalada; los inmaduros son hialinos y aceptados, mientras que una vez maduros, son pigmentados, septados y con pared gruesa (Figura 12).

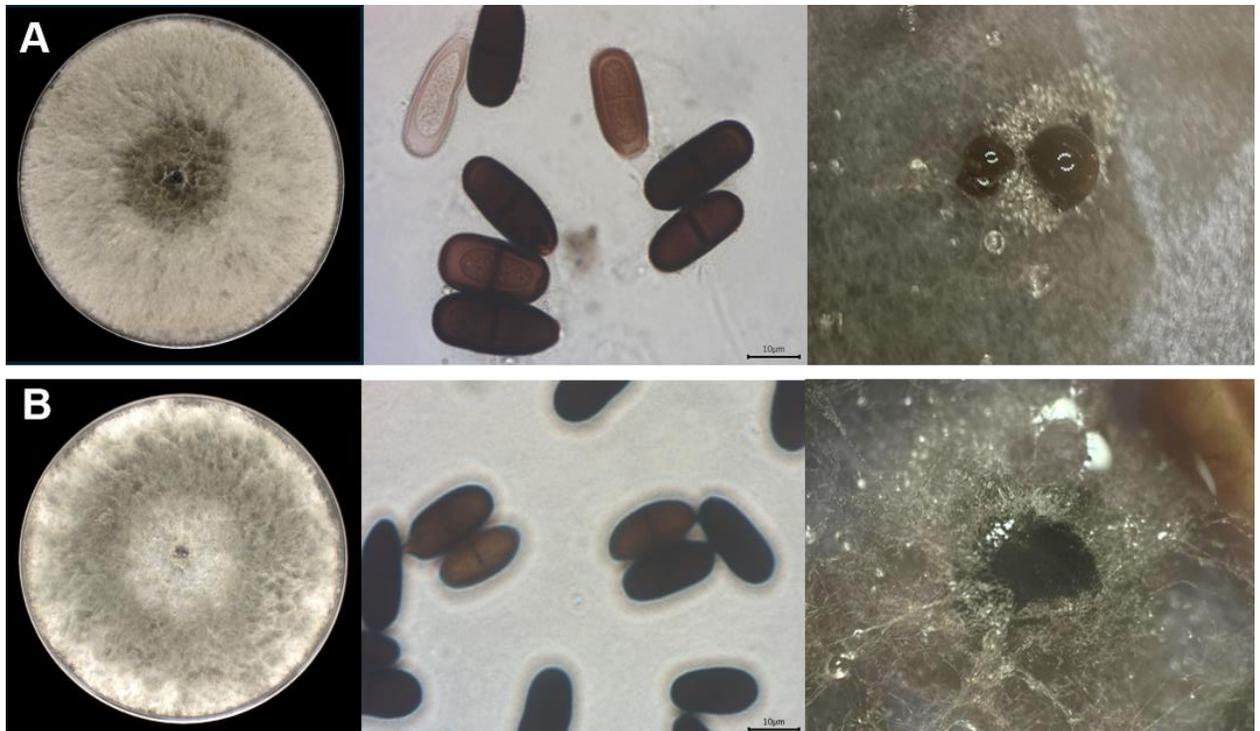


Figura 12. Crecimiento en PDA a los 7 días, esporas y picnidios de cepas de *Lasiodiplodia*. **A.** *L. iraniensis* SCT43-1. **B.** *L. subglobosa* SCT07-1.

A partir de las dimensiones de las conidiosporas de los hongos seleccionados de *Lasiodiplodia* (Tabla 7), no se observaron diferencias entre las cepas de *L. iraniensis*, mientras que entre las de *L. subglobosa*, sí variaron en el tamaño de conidio.

De acuerdo con la caracterización molecular de las especies identificadas y sus morfologías, se seleccionaron las cepas de *L. iraniensis* SCT07-2, SCT35-1, SCT41-2 y SCT43-1 y *L. subglobosa* SCT07-1, SCT26-3, SCT27-2 y SCT41-1 para su caracterización y estudio de patogenicidad (Figura 11).

Tabla 7. Dimensiones de las conidiosporas de cepas seleccionadas de *Lasiodiplodia* spp. aisladas de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora.

Especie	Cepa	Origen	Tamaño de conidio (μm)	Promedio ± Desviación estándar (μm)
<i>L. iraniensis</i>	SCT35-1	H32	25.6 - 18.4 (22.6) x 14.3 - 11.6 (12.5)	22.4 ± 1.7 x 12.8 ± 0.8
	SCT41-2	H38	27.5 - 22.4 (23.1) x 15.3 - 11.0 (13.6)	24.6 ± 1.6 x 13.4 ± 1.0
	SCT43-1	H39	27.1 - 10.8 (25.3) x 12.3 - 8.8 (10.8)	24.6 ± 1.7 x 10.7 ± 1.0
<i>L. subglobosa</i>	SCT07-1	H7	22.8 - 18 (20.2) x 10.1 - 8.1 (9.3)	20.7 ± 1.5 x 9.4 ± 0.6
	SCT41-1	H38	28.3 - 22.1 (23.9) x 15.5 - 12.9 (13.6)	23.9 ± 1.5 x 13.7 ± 0.6

*Talla mayor – talla menor (moda) x ancho mayor – ancho menor (moda) de 20 conidios seleccionados.

3.3.1.4 *Phaeobotryon*

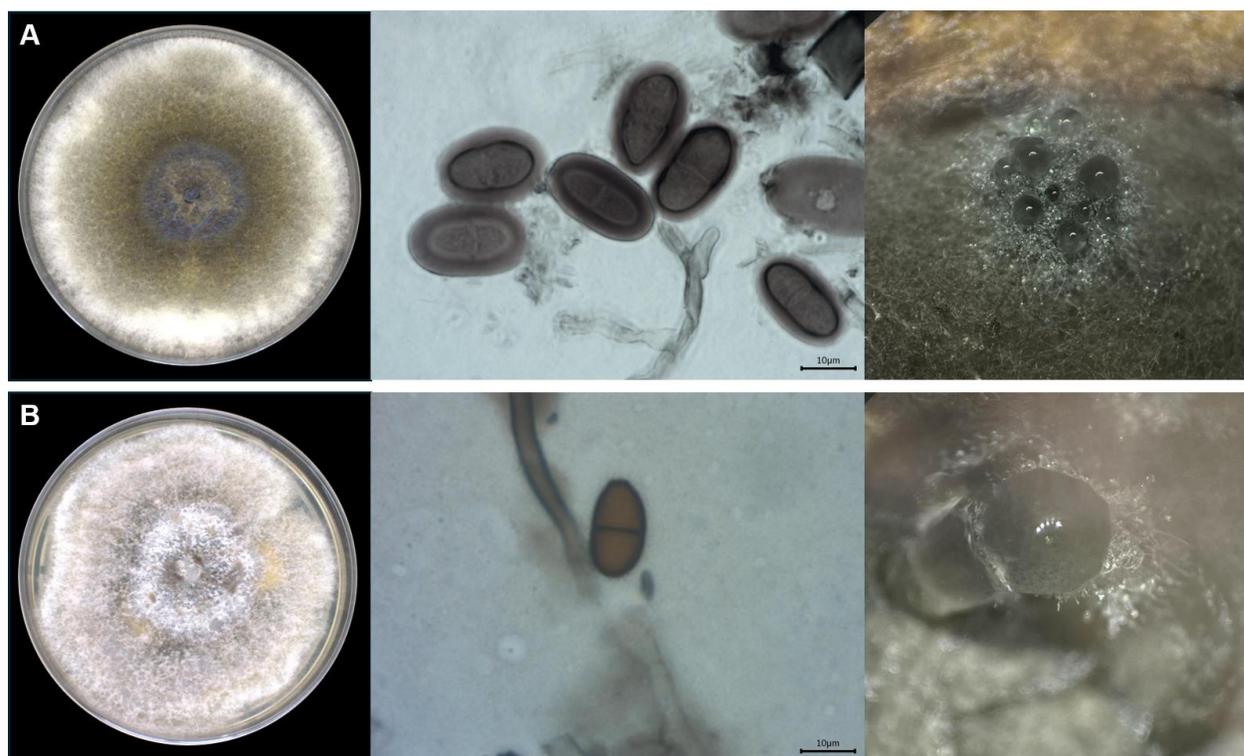


Figura 13. Crecimiento en PDA a los 7 días, esporas (escala: 10 μm) y picnidios de cepas de *Phaeobotryon*. **A.** *Phaeobotryon* sp. SCT04-2. **B.** *Phaeobotryon* sp. SCT34-1.

Se obtuvieron 4 cepas del género *Phaeobotryon* de cuatro huertas de naranja. Los hongos caracterizados tuvieron un micelio aéreo y color blanco, que va tomando un color gris claro a café verdoso para el día siete (Figura 13). No se observaron diferencias en el tamaño de las esporas (Tabla 8).

Tabla 8. Dimensiones de las conidiosporas de cepas seleccionadas de *Phaeobotryon* spp. aisladas de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora.

Especie	Cepa	Origen	Tamaño de conidio (μm)	Promedio \pm Desviación estándar (μm)
<i>Phaeobotryon</i> sp.	SCT04-2	H4	25.9 - 17.9 (21.1) x 15.0 - 8.2 (10.2)	21.8 \pm 2.2 x 12.8 \pm 1.4
<i>Phaeobotryon</i> sp.	SCT34-1	H31	22.8 - 18.4 (19.3) x 10.2 - 8.1 (14.0)	20.1 \pm 1.7 x 9.5 \pm 0.7

*Talla mayor – talla menor (moda) x ancho mayor – ancho menor (moda) de 20 conidios seleccionados.

Como el resto de la familia Botryosphaeriaceae, sus esporas maduras tienen forma de elipsoide, son septadas y pigmentadas. La cepa *Phaeobotryon* sp. SCT04-2 se caracterizó por tener un micelio grisáceo que tomó una coloración café verdoso con el tiempo, mientras que la cepa SCT04-2 tuvo un micelio de color gris claro, oscureciéndose una vez que completó su crecimiento en la placa.

3.3.1.5 *Pseudofusicoccum*

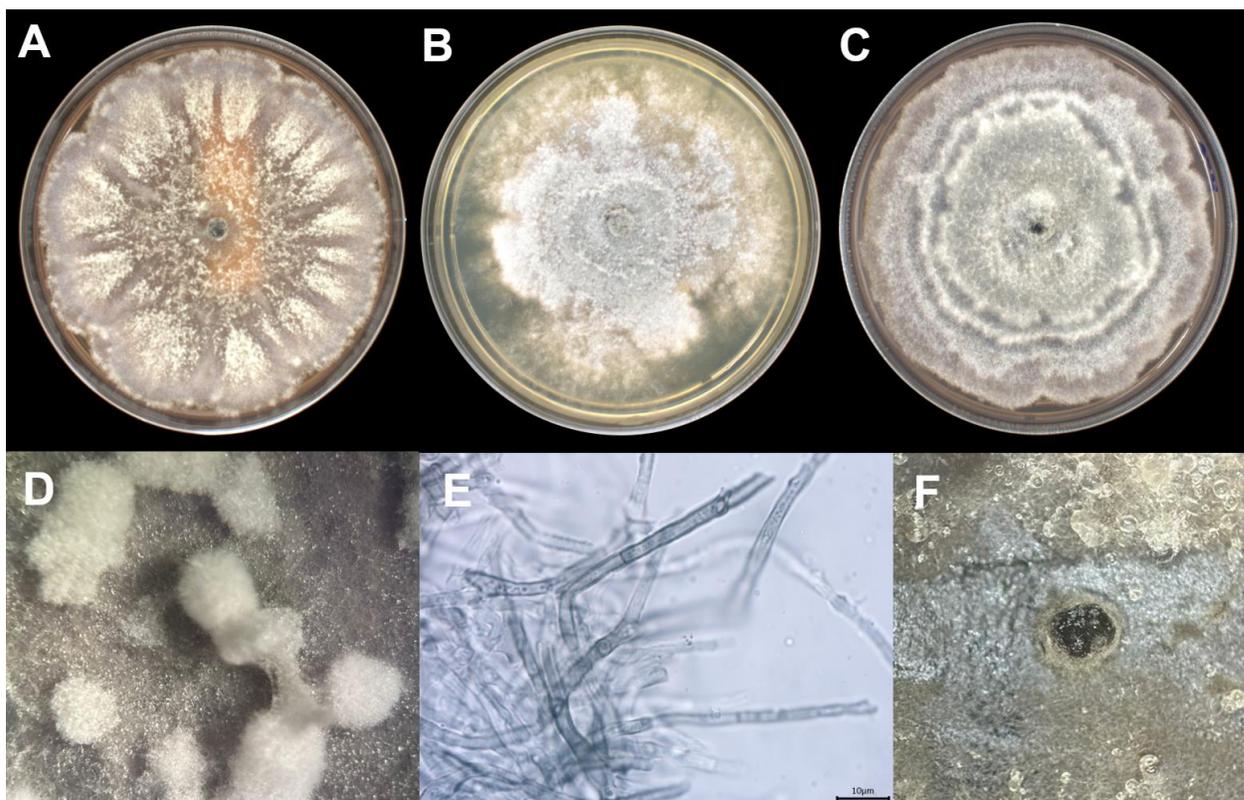


Figura 14. Género de *Pseudofusicoccum*. **A, D, F.** *P. stromaticum* SCT18-2: crecimiento en medio PDA a los 7 días, micelio en placa, microscopía de hifas septadas y picnidio. **B, C, E.** *P. stromaticum* SCT18-6: crecimiento en PDA y MEA a los 7 días y micelio en placa.

Del género de *Pseudofusicoccum* se obtuvieron 2 aislados de ramas de árboles de naranja de la huerta H16, de los cuales se identificó a la especie *P. stromaticum*. La cepa de *P. stromaticum* SCT18-2 tuvo un margen colonial ondulado en ambos medios, con una coloración morada durante los primeros 7 días, oscureciéndose con el tiempo (Figura 14). En contraste, la cepa *P. stromaticum* SCT18-6 tuvo un margen colonial irregular en el medio de PDA, mientras que en el de MEA fue ondulado y formando anillos, con una coloración gris claro.

Esta especie tuvo un micelio de aspecto algodonoso, acumulándose en ciertas áreas de la placa. En el microscopio, se observó que el micelio tenía septos y era de color gris claro. De estas cepas, no se lograron obtener esporas para las microscopías.

3.3.1.6 *Oblongocollomyces*

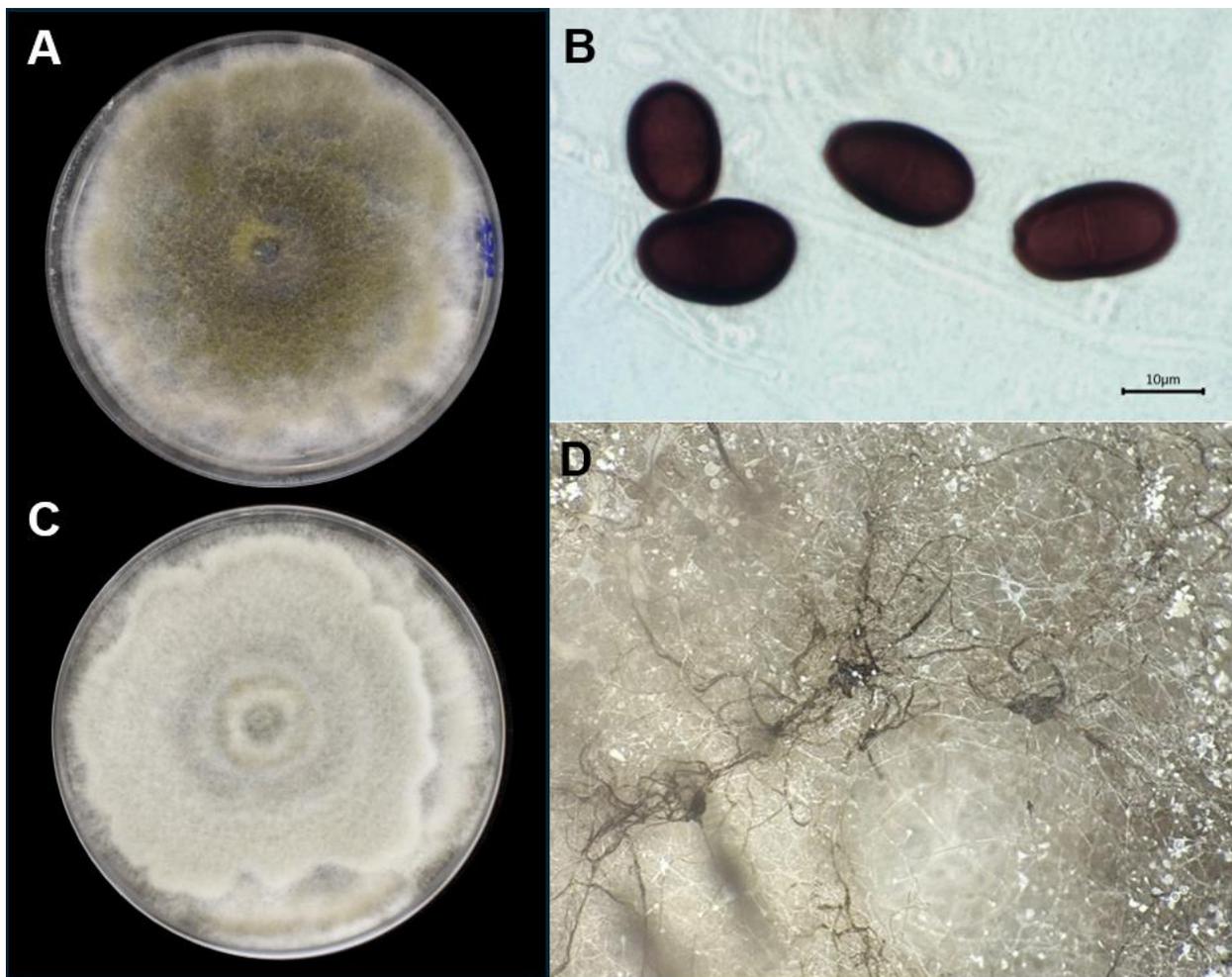


Figura 15. *Oblongocollomyces* sp. SCT31-1. **A, C:** Crecimiento en MEA (arriba) y PDA (abajo) a los 7 días. **B:** Esporas maduras (melanzadas y septadas) e hifas. **D:** Micelio y picnidio en formación.

Se obtuvieron dos aislados de *Oblongocollomyces* sp. (SCT30-2 y SCT31-1) de ramas de cultivos de naranja. La cepa SCT31-1 completó su crecimiento en la placa en los medios de MEA y PDA a los siete días. Su micelio es aéreo y con una coloración que cambiaba de blanca a café verdoso con el tiempo; en el medio de PDA el micelio se mantuvo claro por más tiempo (Figura 15). Sus esporas melanizadas tienen forma elipsoidal y tienen un septo, con una dimensión promedio de 20.9 x 12 µm (Tabla 9).

Tabla 9. Dimensiones de las conidiosporas de la cepa de *Oblongocollomyces* sp. aislada de las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora.

Especie	Cepa	Origen	Tamaño de conidio (µm)	Promedio ± Desviación estándar (µm)
<i>Oblongocollomyces</i> sp.	SCT31-1	H28	25.1 - 16.4 (21.3) x 14.7 - 10.8 (11.4)	20.9 ± 2.4 x 12.0 ± 0.9

*Talla mayor – talla menor (moda) x ancho mayor – ancho menor (moda) de 20 conidios seleccionados.

3.3.2 Familia Glomerellaceae

3.3.2.1 *Colletotrichum*

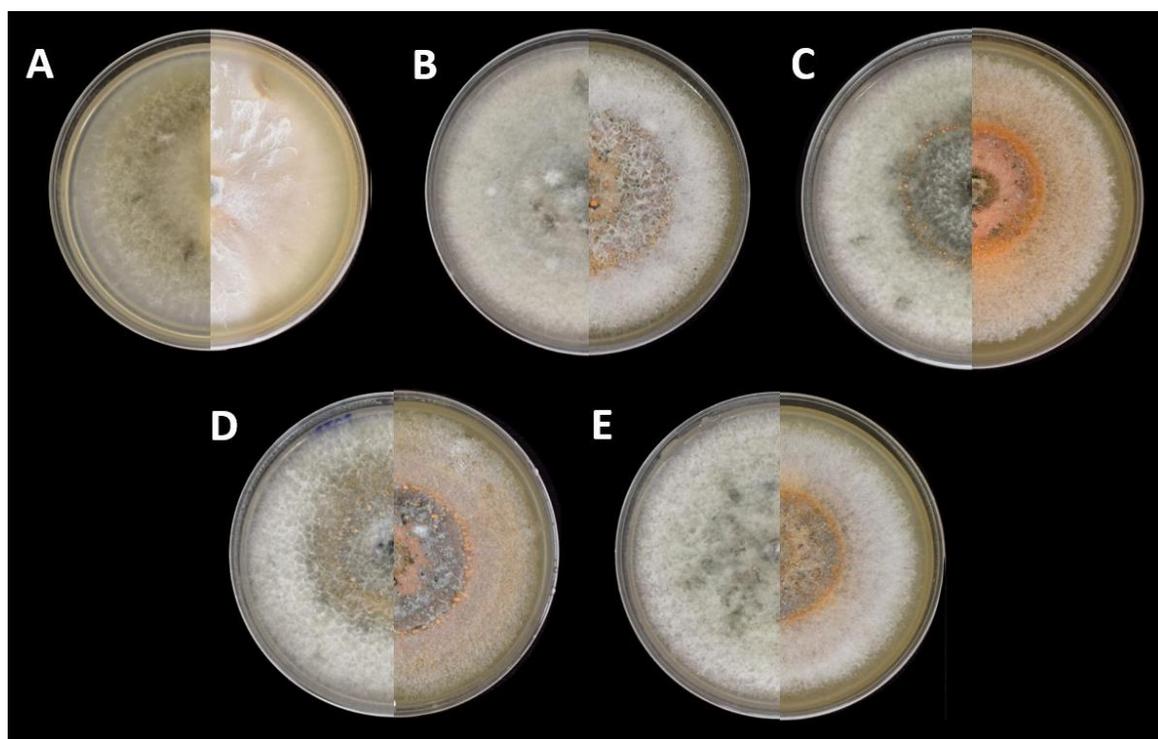


Figura 16. Cepas de *Colletotrichum* seleccionadas y crecidas por 10 días en medios de MEA (izquierda) y PDA (derecha). **A.** *Colletotrichum* sp. SCT08-1. **B.** *C. gloeosporioides* SCT11-2. **C.** *C. gloeosporioides* SCT22-2. **D.** *C. gloeosporioides* SCT48-1. **E.** *C. gloeosporioides* SCT56-2.

Colletotrichum fue el segundo género con mayor número de aislamientos. Se identificaron 22 cepas de la especie *C. gloeosporioides*, de 17 huertas (Tabla 10), lo que representa un 17.1% de incidencia. Las ramas de las que se aislaron estos hongos fueron de árboles de naranja, mandarina y toronja, con síntomas de gomosis y canchros. Para la caracterización morfológica se seleccionaron las cepas SCT08-1, SCT11-2, SCT22-2, SCT48-1 y SCT56-2 (Figura 16).

Tabla 10. Listado de incidencia de *Colletotrichum* en las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora.

Huerta	Hospedante	Cepa	Especie
1 H4	Naranja	SCT04-3	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>
2 H6	Naranja	SCT06-1	<i>C. gloeosporioides</i>
		SCT06-2	<i>C. gloeosporioides</i>
3 H8	Toronja	SCT08-1	<i>Colletotrichum</i> sp.
4 H10	Naranja	SCT11-2	<i>C. gloeosporioides</i>
		SCT11-3	<i>C. gloeosporioides</i>
5 H11	Mandarina	SCT50-2	<i>C. gloeosporioides</i>
6 H12	Naranja	SCT14-2	<i>C. gloeosporioides</i>
7 H13	Naranja	SCT15-2	<i>C. gloeosporioides</i>
8 H14	Naranja	SCT16-1	<i>C. gloeosporioides</i>
		SCT16-2	<i>C. gloeosporioides</i>
9 H16	Naranja Mandarina	SCT18-7	<i>C. gloeosporioides</i>
10 H20	Naranja	SCT22-2	<i>C. gloeosporioides</i>
11 H21	Naranja	SCT23-1	<i>C. gloeosporioides</i>
		SCT23-3	<i>C. gloeosporioides</i>
12 H24	Naranja	SCT27-1	<i>C. gloeosporioides</i>
13 H25	Naranja	SCT28-3	<i>C. gloeosporioides</i>
14 H26	Naranja	SCT29-2	<i>C. gloeosporioides</i>
15 H37	Naranja	SCT46-4	<i>C. gloeosporioides</i>
16 H40	Naranja	SCT44-2	<i>C. gloeosporioides</i>
17 H42	Naranja	SCT48-1	<i>C. gloeosporioides</i>
		SCT48-2	<i>C. gloeosporioides</i>

La especie *C. gloeosporioides* se distingue por presentar masas anaranjadas que contienen sus esporas, y un micelio blanco y plano (Figura 17). En algunas cepas, el micelio tuvo al principio una coloración naranja clara, hasta mantener un color gris claro para el día siete. Además, la formación de sus acérvulos se presentó aproximadamente a los 15 días, estos son de color negro y se encontraron formándose sobre el micelio. Sus esporas son cilíndricas, aseptadas, hialinas y tienen promedio de 15 μm de longitud.

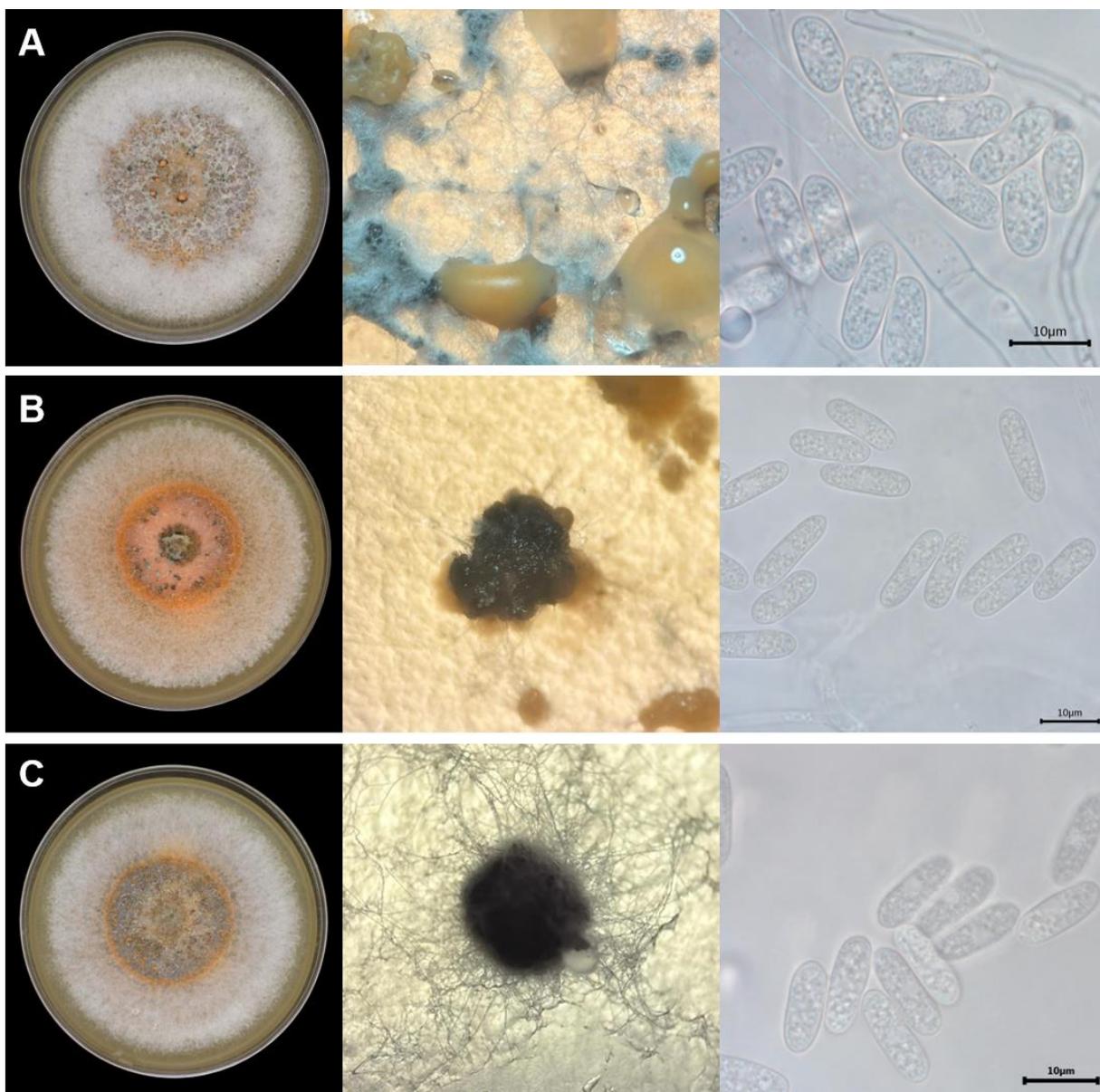


Figura 17. Crecimiento de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* en medio PDA a los 10 días, masas naranjas de esporas y acérvulos visto en estereoscopio, y esporas. **A.** *C. gloeosporioides* SCT11-2. **B.** *C. gloeosporioides* SCT22-2. **C.** *C. gloeosporioides* SCT56-2.

3.3.3 Familia Nectriaceae

3.3.3.1 *Fusarium*

El género de *Fusarium* tuvo una incidencia del 19.04%, se aisló de 8 huertas de ramas con síntomas de gomosis y canchros de cultivos de naranja y mandarina, y se distingue por haber sido el género con la mayor diversidad de especies (Tabla 11). Las especies identificadas en este estudio fueron *F. acuminatum*, *F. citri*,

F. incarnatum, *F. nanum*, *F. nucidum*, *F. perambucanum* y *F. proliferatum*. Las cepas seleccionadas para su caracterización debido a su mayor presencia en las huertas son *F. citri* (SCT07-3), *F. incarnatum* (SCT15-1), *F. nanum* (SCT05-2), *F. nucidum* (SCT51-5) y *F. perambucanum* (SCT58-2), como se observa en la Figura 17.

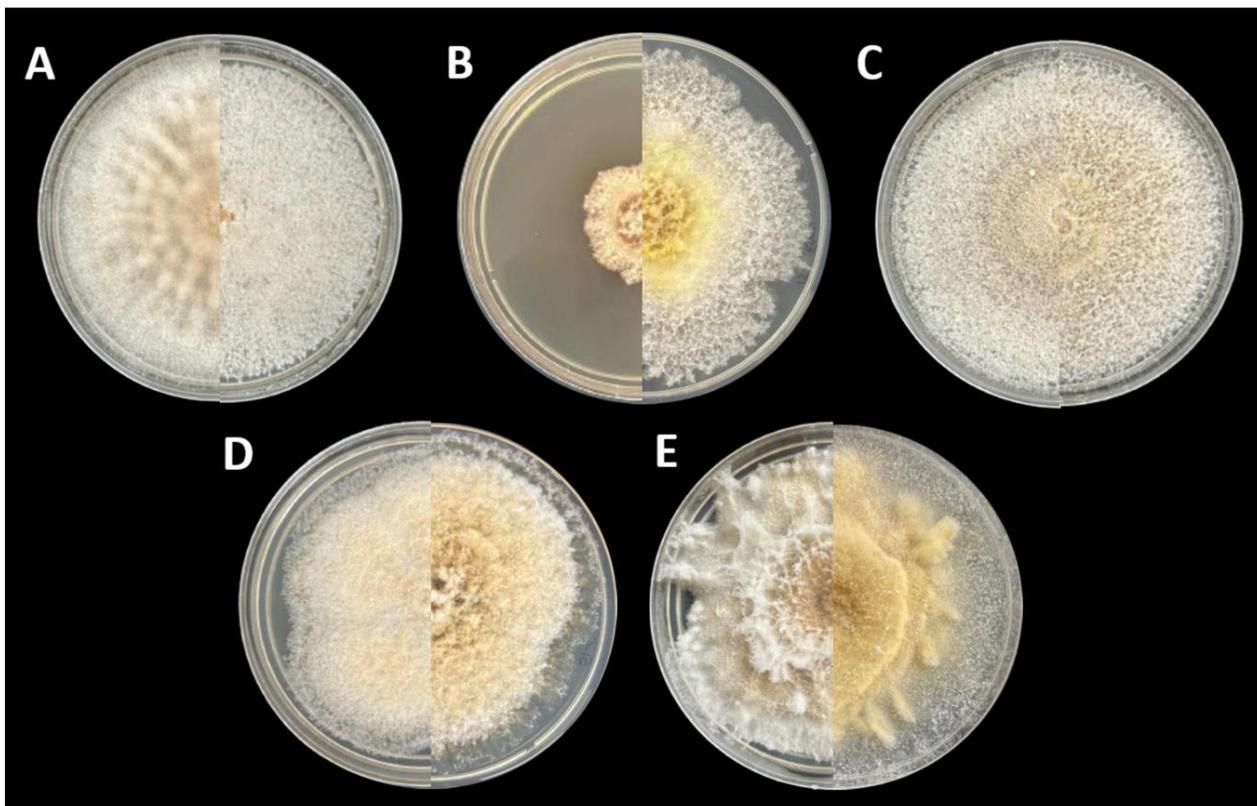


Figura 18. Cepas de *Fusarium* seleccionadas y crecidas por 15 días en medios de MEA (izquierda) y PDA (derecha). **A.** *F. citri* SCT07-3. **B.** *F. incarnatum* SCT15-1. **C.** *F. nanum* SCT05-2. **D.** *F. nucidum* SCT51-5. **E.** *F. perambucanum* SCT58-2.

A partir de las microscopías, se observó que las esporas de este género son hialinas, fusiformes y multiseptadas, de igual manera, las hifas son hialinas y con septos (Figura 19). Debido a la diversidad de especies de *Fusarium*, las características morfológicas macroscópicas eran particulares para cada cepa. El crecimiento del micelio fue plano e irregular, con colores que iban del blanco, hasta el amarillo mostaza y café claro.

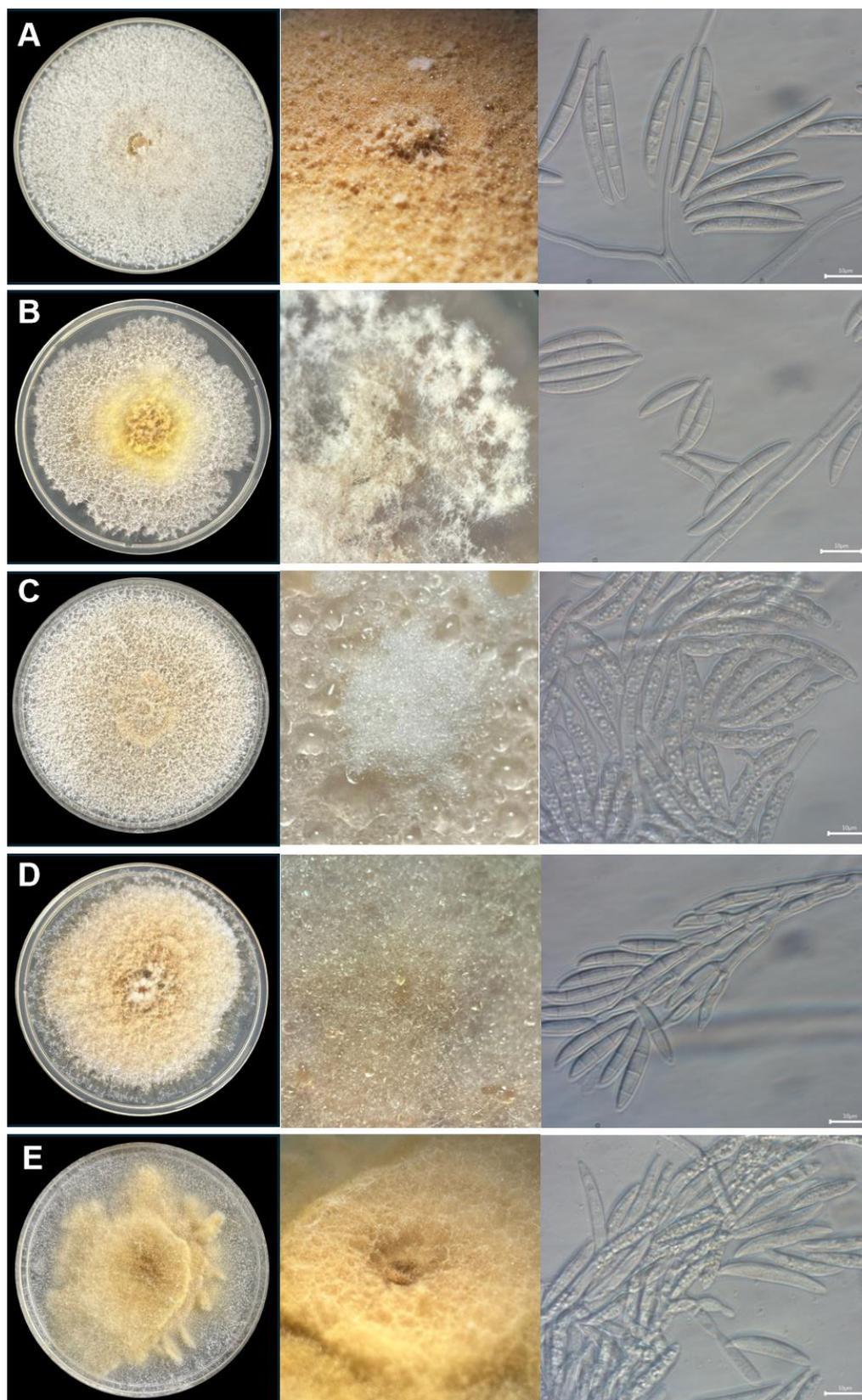


Figura 19. Crecimiento en PDA, micelio y macroconidios de cepas del género *Fusarium*. **A:** *F. citri* SCT07-3. **B:** *F. incarnatum* SCT11-2. **C:** *F. nanum* SCT05-2. **D:** *F. nucidum* SCT51-5. **E:** *F. pernambucanum* SCT58-2.

Tabla 11. Listado de incidencia de *Fusarium* en las huertas de cítricos de Hermosillo, Sonora.

Huerta		Hospedante	Cepa	Especie de <i>Fusarium</i>
1	H2	Naranja	SCT02-3	<i>Fusarium incarnatum</i>
2	H5	Naranja	SCT05-2	<i>F. nanum</i>
3	H7	Naranja	SCT07-3	<i>F. citri</i>
4	H9	Naranja	SCT10-2	<i>F. perambucanum</i>
5	H13	Naranja	SCT15-1	<i>F. incarnatum</i>
6	H16	Naranja Mandarina	SCT18-1	<i>F. nanum</i>
			SCT51-1	<i>Fusarium</i> sp.
			SCT51-3	<i>F. incarnatum</i>
			SCT51-5	<i>F. nucidum</i>
7	H30	Naranja	SCT33-3	<i>F. acuminatum</i>
8	H32	Naranja	SCT58-1	<i>F. incarnatum</i>
			SCT58-2	<i>F. perambucanum</i>
			SCT58-3	<i>F. proliferatum</i>

3.3.4 Familia Diatrypaceae

3.3.4.1 *Diatrype*

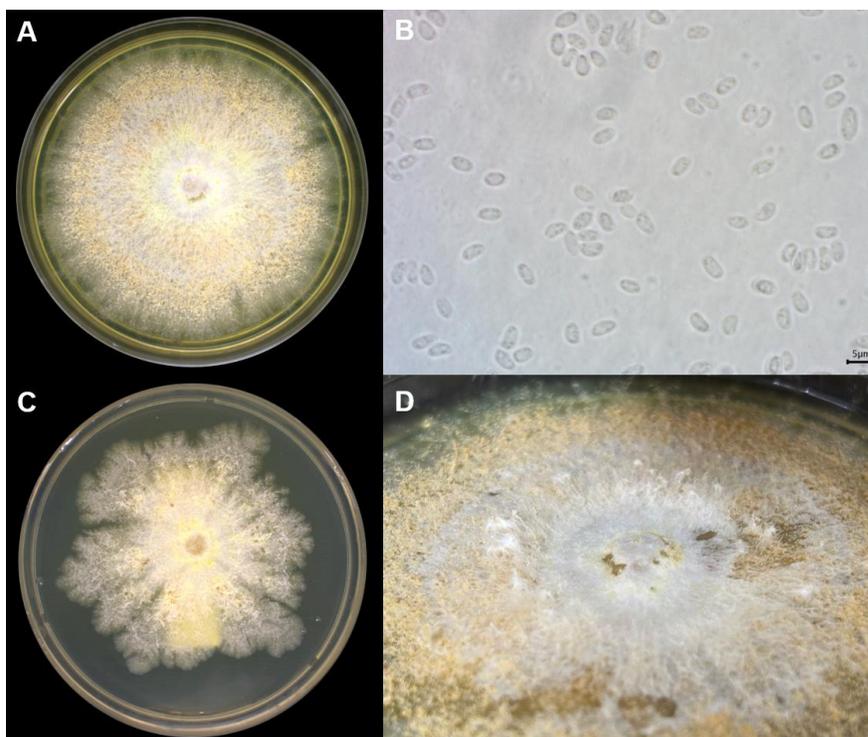


Figura 20. SCT 29-5 *Diatrype* sp. **A:** Crecimiento en PDA a los 15 días. **B:** Ascosporas. **C:** Crecimiento en MEA a los 17 días. **D:** Micelio plano con crecimiento irregular, color amarillo.

Este género se distinguió por tener un micelio plano con margen filamentososo en ambos medios de cultivo, que inicialmente era blanco y cambió a color amarillo con el tiempo. Completó su crecimiento en la placa con medio de PDA a los 17 días, mientras que en el de MEA en el mismo tiempo, creció menos (Figura 20). Sus esporas son hialinas, con forma cilíndrica y tienen una longitud promedio de 4 μm .

3.3.4.2 *Eutypella*

Del género de *Eutypella* se obtuvieron ocho aislados, identificados en siete huertas de las 42 muestreadas con una incidencia del 16.67% (Tabla 12). Estos se aislaron de ramas de árboles de naranja y de mandarina con síntomas de gomosis, cancro y con lesiones necróticas.

Las cepas seleccionadas de *Eutypella microtheca* y *Eutypella* sp. tuvieron un micelio plano, con un margen filamentososo y color blanco. Después de dos semanas de incubar la cepa *E. microtheca* SCT01-1 con acículas de pino, comenzó a formar picnidios sobre el micelio que creció alrededor de la madera. De estos se obtuvieron los conidios, los cuales tenían forma de media luna y eran hialinos (Figura 21).

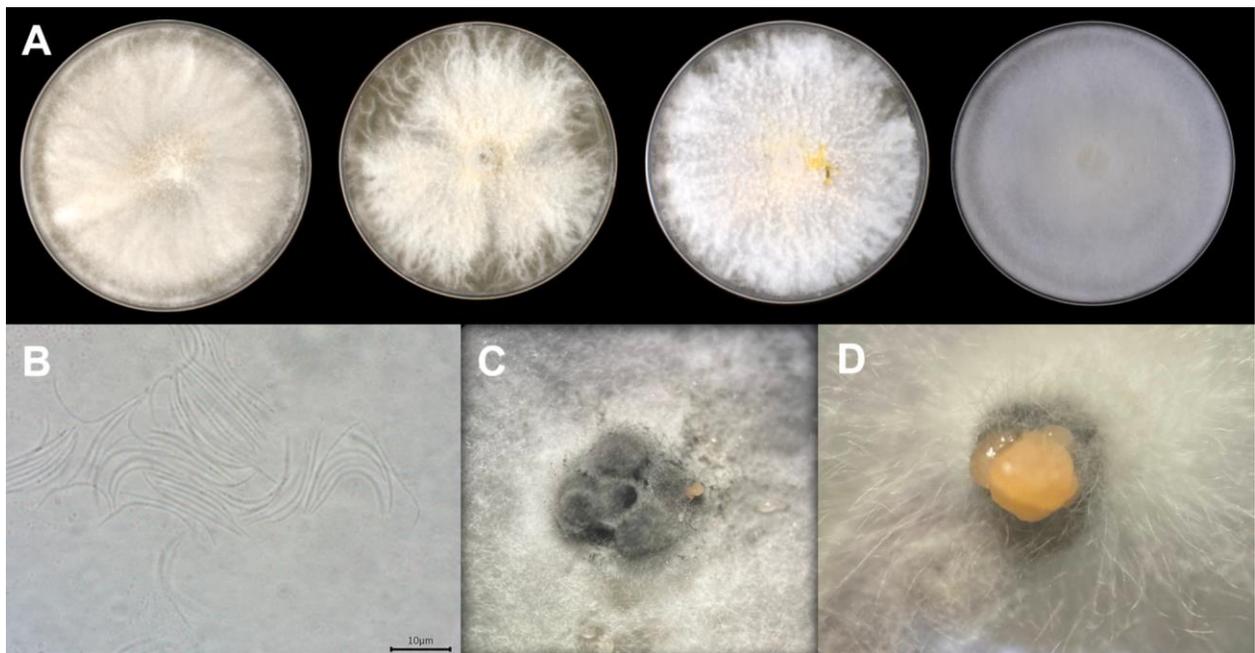


Figura 21. *Eutypella microtheca* SCT 01-1. **A:** Crecimiento en PDA a los 10 días de las cepas SCT01-1 de *E. microtheca* y *Eutypella* sp. SCT06-3, SCT13-1, y SCT30-7 (izquierda a derecha). **B:** Conidia. **C:** Picnidio. **D:** Crecimiento de micelio en acículas de pino.

Tabla 12. Listado de incidencia de *Eutypella* en las huertas.

Huerta		Hospedante	Cepa	Especie de <i>Eutypella</i>
1	H1	Naranja	SCT01-1	<i>Eutypella microtheca</i>
2	H5	Naranja	SCT05-1	<i>Eutypella</i> sp.
3	H6	Naranja	SCT06-3	<i>Eutypella</i> sp.
4	H9	Naranja	SCT10-3	<i>Eutypella</i> sp.
5	H11	Mandarina	SCT13-1	<i>Eutypella</i> sp.
6	H15	Naranja	SCT17-2	<i>Eutypella</i> sp.
7	H27	Naranja	SCT30-5	<i>Eutypella</i> sp.
			SCT30-7	<i>E. microtheca</i>

3.3.5 Familia Apiosporaceae

3.3.5.1 *Nigrospora*

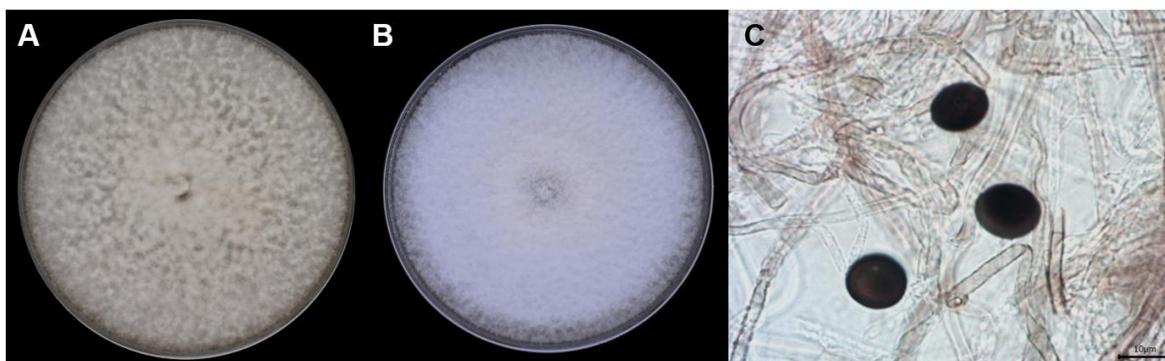


Figura 22. *Nigrospora sphaerica* SCT45-3. **A.** Crecimiento en medio MEA a los 7 días. **B.** Crecimiento en medio PDA a los 7 días. **C.** Esporas.

Nigrospora se caracterizó por tener un micelio plano, de apariencia polvosa y de color claro en ambos medios (Figura 22), tomando un café claro con el paso de los días. Las hifas no tenían septos y eran hialinas, mientras que sus esporas se observaron aseptadas, con formas semiesféricas, pigmentadas, y con una longitud promedio de aproximadamente 12 µm de largo.

3.3.6 Familia Chaetomiaceae

3.3.6.1 *Chaetomium*

Se obtuvo un solo aislado del hongo de *Chaetomium megalocarpum*, de una rama de naranjo de la huerta

H23. Este género tuvo un crecimiento lento en PDA y MEA, llenando la placa en casi 20 días. Se distinguió por tener un micelio blanco, plano y con margen lobulado, con una esporulación a los siete días aproximadamente al mantener las placas a 28 °C.

Las esporas tenían una coloración verde claro en los primeros días, tomando un color más oscuro con el paso del tiempo (Figura 23). Al observarlas en el microscopio con una magnificación de 100X, se pudo apreciar que tienen un aspecto globoso y que son pigmentadas.

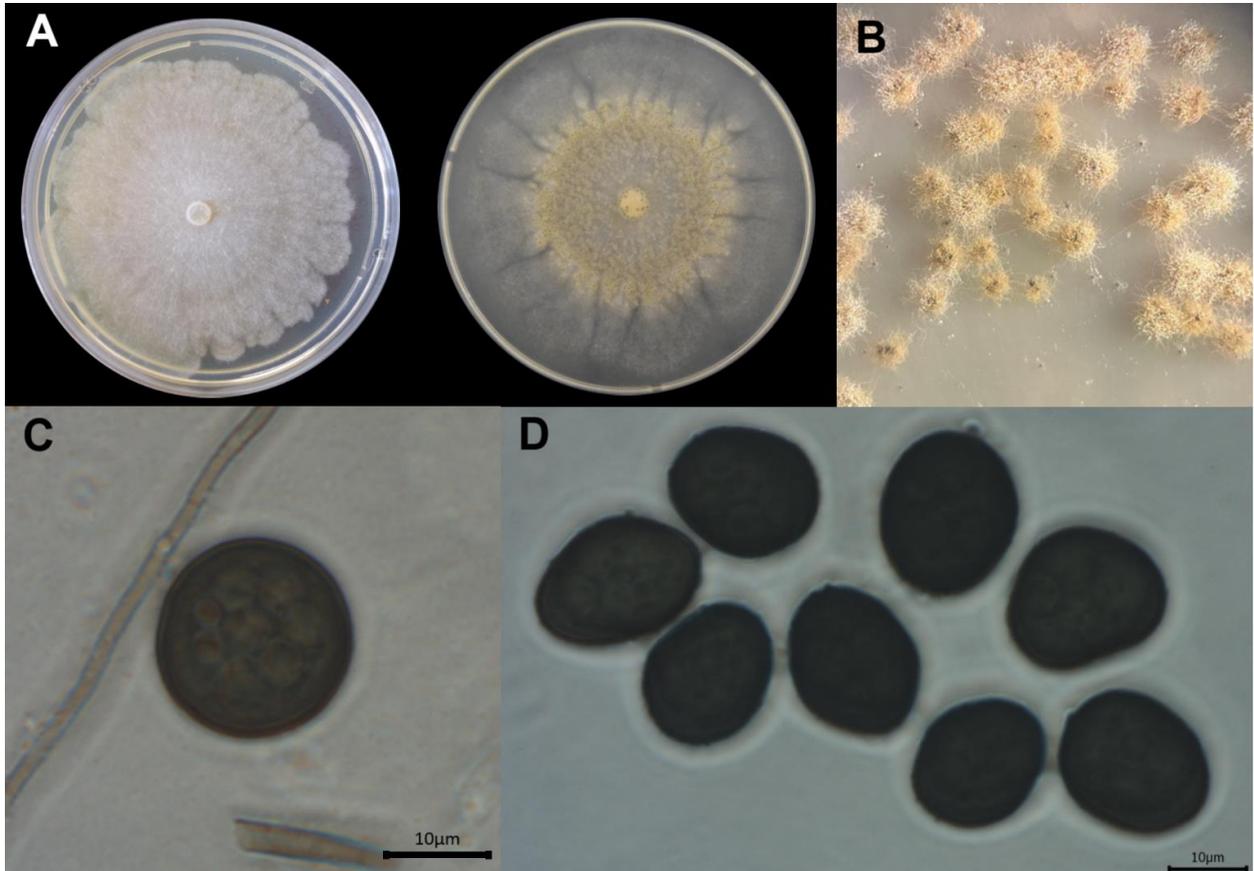


Figura 23. *Chaetomium megalocarpum* SCT26-1. **A.** Crecimiento en MEA y PDA a los 17 días. **B.** Micelio y esporulación. **C, D.** Conidiosporas.

3.3.7 Ensayos de temperatura de la familia Botryosphaeriaceae

Los ensayos de temperatura se realizaron con las cepas seleccionadas de la familia Botryosphaeriaceae, debido a su mayor abundancia en comparación en los huertos. El tiempo de incubación para las cepas de *Lasiodiplodia* fue entre 3 y 5 días, porque este género tiene un crecimiento rápido.

De acuerdo con los resultados (Tabla 13), se encontró que la temperatura óptima para estos hongos se

encuentra entre los 25 °C y 30 °C. Con una tasa promedio de hasta 21.75 mm/día a 25 °C para la especie de *L. iraniensis* y una de hasta 27.20 mm/día a 28 °C para *L. subglobosa*.

La mayoría excepto la cepa SCT43-1 *L. iraniensis* SCT43-1, tuvieron un crecimiento mínimo a los 40 °C. Al retirarlas de las incubadoras, se mantuvieron a temperatura ambiente para observar si lograban recuperar su crecimiento. Con este cambio de temperatura, la mayoría de las cepas, excepto la cepa *L. iraniensis* SCT43-1, recuperaron su crecimiento hasta llenar la caja.

Tabla 13. Tasas de crecimiento (mm/día) a diferentes temperaturas de cepas del género *Lasiodiplodia* ($p < 0.05$).

Cepas	25 °C ^a	28 °C ^a	30 °C ^{ab}	35 °C ^b	37 °C ^c	40 °C ^c
<i>L. iraniensis</i>	21.75	17.8	15.83	8.83	0.69	0.39
SCT07-2	19.3 ± 0.65	17.55 ± 0.38	13.33 ± 0.28	8 ± 0.66	0.71 ± 0.3	0.5
SCT35-1	25.66 ± 0.28	26 ± 1	23.83 ± 0.28	13.08 ± 0.72	0.75 ± 0.25	0.41 ± 0.38
SCT41-2	27.16 ± 0.57	26.83 ± 0.57	25.66 ± 1.89	14.25 ± 0.43	1.33 ± 0.8	0.66 ± 0.14
SCT43-1	14.83 ± 0.57	12.3 ± 1.01	3.41 ± 2.52	0.25	NC	NC
<i>L. subglobosa</i>	25.68	27.20	25.12	15.84	2.29	0.245
SCT07-1	23.76 ± 5.62	25.5 ± 0.86	24.83 ± 3.75	18.2 ± 0.17	1.75 ± 0.43	4.5 ± 1.25
SCT26-3	28.83 ± 0.76	26.16 ± 1.6	25 ± 0.86	15.41 ± 0.14	2.41 ± 1.37	3.41 ± 0.38
SCT27-2	29.1 ± 1.6	29.16 ± 1.15	26.16 ± 0.28	15 ± 0.25	4 ± 0.66	1.41 ± 0.57
SCT41-1	21.06 ± 0.4	28 ± 0.86	24.5 ± 1.32	14.75 ± 0.66	0.1 ± 0.25	0.05 ± 0.25

El resto de los géneros de la familia Botryosphaeriaceae, tuvieron un crecimiento óptimo entre los 25 °C y 28 °C, pero la mayoría no creció a las temperaturas más altas de 35 °C a 40 °C y tampoco lograron recuperar su crecimiento al regresarlas a temperatura ambiente (Tabla 14). El hongo *Oblongocollomyces* creció hasta 37 °C, pero no recuperó el crecimiento en la temperatura más alta.

Las cepas de *Pseudofusicoccum* tuvieron la tasa de crecimiento más alta a los 30 °C, y fueron las únicas en crecer y recuperar su crecimiento a los 40 °C, lo que lo convierte en uno de los géneros con mayor tolerancia a las altas temperaturas junto a *Lasiodiplodia* spp.

Tabla 14. Tasas de crecimiento (mm/día) a diferentes temperaturas de cepas pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae ($p < 0.05$).

Cepas	25 °C ^{ab}	28 °C ^a	30 °C ^b	35 °C ^c	37 °C ^c	40 °C ^c
<i>Barriopsis</i>	8.24	8.40	6.12	0.16	-	-
SCT45-2	7.33 ± 1.25	7.58 ± 1.52	7.66 ± 2.02	0.08 ±	NC	NC
SCT55-2	9.16 ± 1.01	8.5 ± 1.32	4.58 ± 0.94	0.25	NC	NC
<i>Dothiorella</i>	15.45	15.25	6.28	0.16	-	-
SCT21-1	15.75 ± 0.75	15.33 ± 0.62	5.66 ± 0.62	0.25	NC	NC
SCT23-2	14.91 ± 0.14	13.08 ± 0.52	4.83 ± 0.28	0.08 ± 0.14	NC	NC
SCT32-1	15.91 ± 0.28	15.83 ± 0.72	8.16 ± 0.28	0.08 ± 0.14	NC	NC
SCT40-2	15.25 ± 0.43	16.76 ± 0.50	6.5 ± 0.35	0.25	NC	NC
<i>Phaeobotryon</i>	15.12	14.16	7.87	1.08	0.37	-
SCT04-2	15.08 ± 0.62	14.33 ± 1.18	10.58 ± 0.14	1.91 ± 0.28	0.75	NC
SCT34-1	15.16 ± 0.14	14	5.16 ± 0.14	0.25	NC	NC
<i>Pseudofusicoccum</i>	8.70	9.29	11.83	8.99	3.83	0.12
SCT18-2	9.83 ± 0.38	9.75 ± 2.38	12.83 ± 0.80	9.08 ± 0.76	3.08 ± 0.38	0.08 ± 0.14
SCT18-6	7.58 ± 2.15	8.83 ± 2.12	10.83 ± 2.75	8.91 ± 0.76	4.58 ± 0.87	0.16 ± 0.14
<i>Oblongocollomyces</i>	9.50	9.41	9.25	0.33	0.5	-

NC: no crecimiento.

3.4 Virulencia de hongos de la Familia Botryosphaeriaceae

En la Tabla 15, se enlistan las 19 cepas seleccionadas que se inocularon en plantas de naranja de dos años en el invernadero para realizar los ensayos de patogenicidad. Por cada cepa, se realizaron 10 réplicas en ramas para estimar la virulencia de estos hongos. Las ramas se evaluaron en cuanto presentaron síntomas y se midió la longitud de la lesión ocasionada por los hongos. A solo cinco días de haber hecho las inoculaciones, todas las ramas infectadas con las cepas de *Lasiodiplodia* spp. presentaron síntoma de gomosis, así como la presencia de picnidios, un claro signo de la presencia del hongo. Con el transcurso de los días, las exudaciones de goma fueron aumentando, y para el día 15, se observó tizón en las ramas

(Figura 24). Debido a la severidad de los síntomas, se procedió a evaluar estas plantas (Figura 25). Para ello, se cortaron las ramas alrededor de 10 cm hacia arriba y hacia abajo de donde se observaba la lesión externa para procesarlas en el laboratorio. Adicionalmente, se cortaron las hojas y se tomaron fotografías de los signos (presencia de picnidios), las lesiones externas e internas y los síntomas observados.

Tabla 15. Listado de las cepas de la familia Botryosphaeriaceae inoculadas en plantas de naranja para evaluar su patogenicidad.

Espece	Cepa
<i>Barriopsis iraniana</i>	SCT55-2
	SCT45-2
<i>Dothiorella mangifericola</i>	SCT32-1
	SCT21-1
	SCT40-2
<i>D. citricola</i>	SCT23-2
<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT07-2
	SCT35-1
	SCT41-2
	SCT43-1
<i>L. subglobosa</i>	SCT07-1
	SCT26-3
	SCT27-2
	SCT41-1
<i>Phaeobotryon</i> sp.	SCT04-2
	SCT34-1
<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	SCT18-2
	SCT18-6
<i>Oblongocollomyces</i> sp.	SCT31-1

Para evaluar las lesiones, se retiró el Parafilm y se midió la longitud de las lesiones tanto de la parte externa como de la interna. En la parte externa, se observaron picnidios en la mayoría de las ramas y exudaciones de goma (Figura 26), y en la parte interna síntomas de necrosis en el tejido. De acuerdo con el análisis estadístico, hubo diferencias significativas entre los tratamientos. La cepa *L. iraniensis* SCT07-2 fue la más virulenta con lesiones externas de hasta 152 mm de longitud e internas de más de 175 mm (Figura 27); las cepas de la especie *L. iraniensis* y la cepa de *L. subglobosa* SCT26-3 le siguieron en agresividad, alcanzando lesiones internas de hasta 85 mm de longitud. Sin embargo, el resto de las cepas de *L. subglobosa* no mostraron tener diferencias significativas con respecto al control. A partir de estos resultados, se seleccionaron las cepas SCT07-2 y SCT43-1 de *L. iraniensis* y las SCT07-1 y SCT26-3 de *L. subglobosa* para

los ensayos de control biológico *in vitro*.



Figura 24. Síntomas observados en las plantas inoculadas con las cepas del género *Lasiodiplodia*. **A, C.** Gomosis provocada por *L. iraniensis* SCT 07-2 y *L. subglobosa* SCT26-3 respectivamente. **B, D.** Tizón en las ramas ocasionado por *L. iraniensis* SCT 07-2 y *L. subglobosa* SCT26-3.

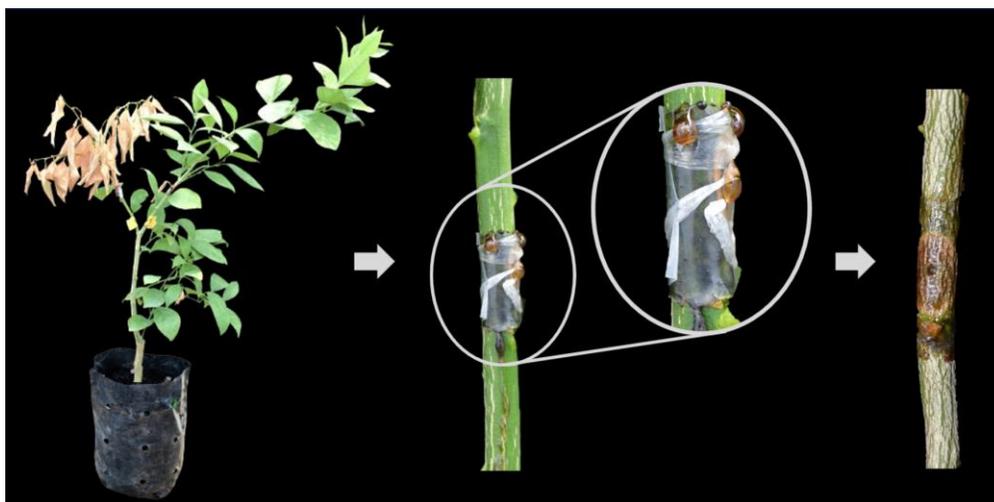


Figura 25. Proceso para la evaluación de las ramas inoculadas con las cepas de *Lasiodiplodia* spp.

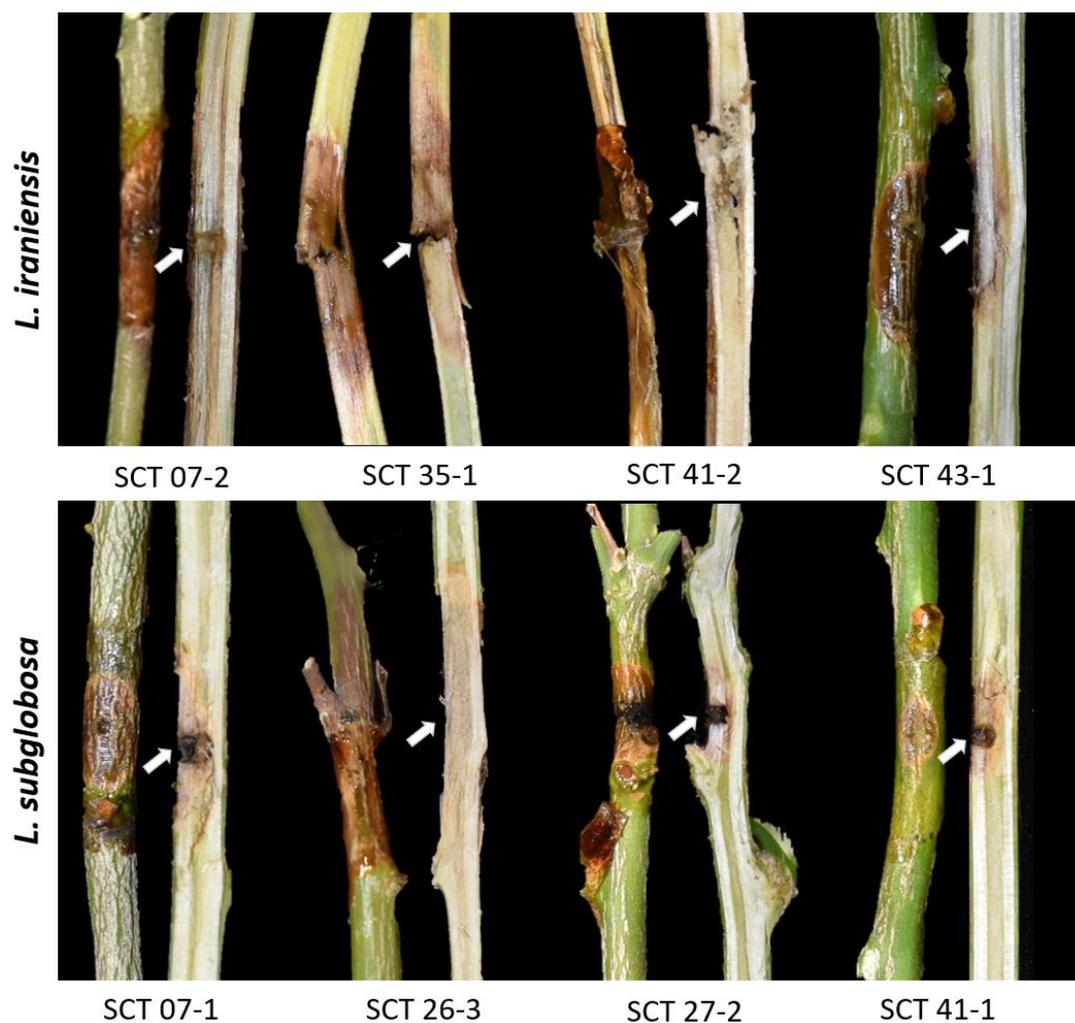


Figura 26. Lesión externa (rama izquierda) e interna (rama derecha) de las ramas inoculadas con las cepas de *Lasiodiplodia iraniensis* y de *L. subglobosa*. Las flechas blancas señalan el área donde se hizo la herida para la inoculación.

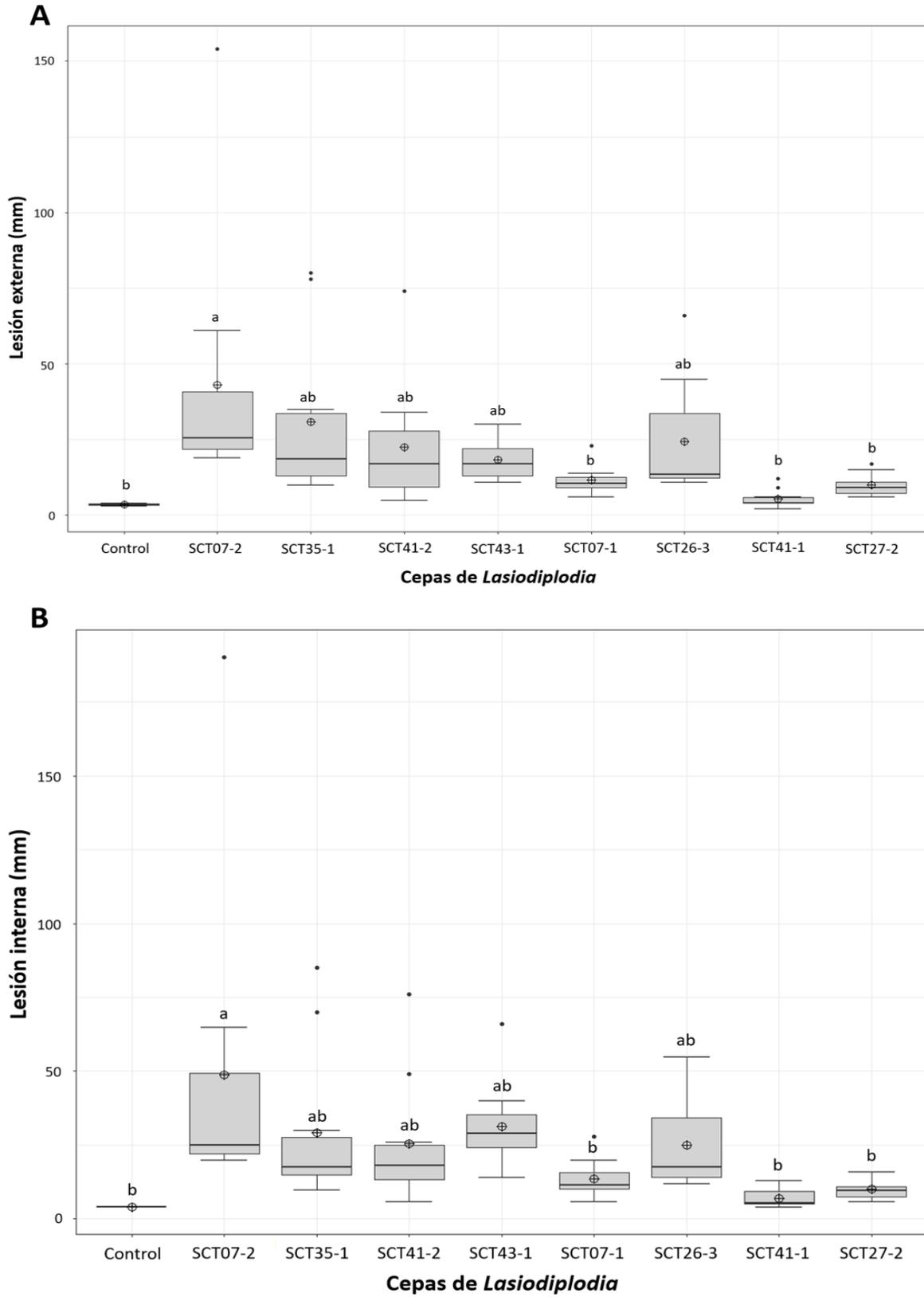


Figura 27. Diagrama de cajas del tamaño de lesión en las ramas inoculadas con cepas seleccionadas de *Lasiodiplodia*. *Lasiodiplodia iraniensis* SCT07-2, SCT35-1, SCT41-2 y SCT43-1 ($p < 0.05$). *Lasiodiplodia subglobosa* SCT07-1, SCT26-3, SCT41-1 y SCT27-2. **A.** Lesión externa de las ramas. **B.** Lesión interna de las ramas.

3.5 Control de hongos de *Lasiodiplodia*

3.5.1 Control *in vitro*

3.5.1.1 Productos comerciales

A partir de los ensayos con medio envenenado de los productos comerciales, se observó que el producto químico con los ingredientes activos de Cyprodinil y fludioxonil, inhibieron al 100% el crecimiento de las cepas de *Lasiodiplodia* seleccionadas (Tabla 16). De igual manera, el resto de los productos químicos, fueron capaces de inhibir a las cepas patógenas. Aunque el producto que contenía Hymexazol no inhibió el crecimiento radial, se observó una reducción significativa del crecimiento aéreo de las cepas (Figura 28). El producto orgánico más eficaz fue el que tiene como ingrediente activo el aceite de tomillo, al inhibir a las cuatro cepas evaluadas en un 100%. Seguido de los productos con extracto con gobernadora, con extracto de pino y ácido cítrico, y el de *Bacillus amyloliquefaciens*, que fueron igualmente capaces de inhibir el crecimiento de los hongos.

Tabla 16. Listado de los productos comerciales evaluados para los ensayos de control de las cepas de *Lasiodiplodia* seleccionadas.

Ingrediente activo	Porcentaje de inhibición (%)			
	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>		<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	
	SCT07-2	SCT43-1	SCT07-1	SCT26-3
Cyprodinil y fludioxonil	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Carbendazim	96.44 ± 0.1 ^a	99.11 ± 0.05 ^a	100 ^a	96.88 ± 0.23 ^a
Benzimidazol	94.22 ± 0.4 ^a	99.11 ± 0.05 ^a	100 ^a	90.22 ± 1.02 ^a
Piraclostrobin	83.56 ± 0.51 ^a	97.77 ± 0.2 ^a	96.88 ± 0.15 ^a	88.44 ± 0.92 ^a
Boscalid y piraclostrobin	86.22 ± 0.05 ^a	84 ± 0.26 ^a	97.33 ^a	84.88 ± 0.55 ^a
Hymexazol	5.78 ± 0.35 ^b	26.66 ± 0.36 ^b	48.88 ± 3.07 ^b	0.88 ± 0.11 ^b
Aceite de tomillo	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a
Extracto de gobernadora, extracto de pino y ácido cítrico	100 ^a	96.44 ± 0.37 ^a	100 ^a	91.55 ± 0.20 ^a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	92 ± 0.1 ^a	89.77 ± 0.11 ^a	98.22 ± 0.05 ^a	94.66 ± 0.26 ^a

Al compararse todos los productos, solo se observaron diferencias significativas con el Hymexazol, el cual no inhibió el crecimiento radial de los aislados de *Lasiodiplodia*, pues el hongo completó su crecimiento en la placa a los dos días de haber concluido el ensayo, a pesar de observar una reducción significativa del crecimiento aéreo.

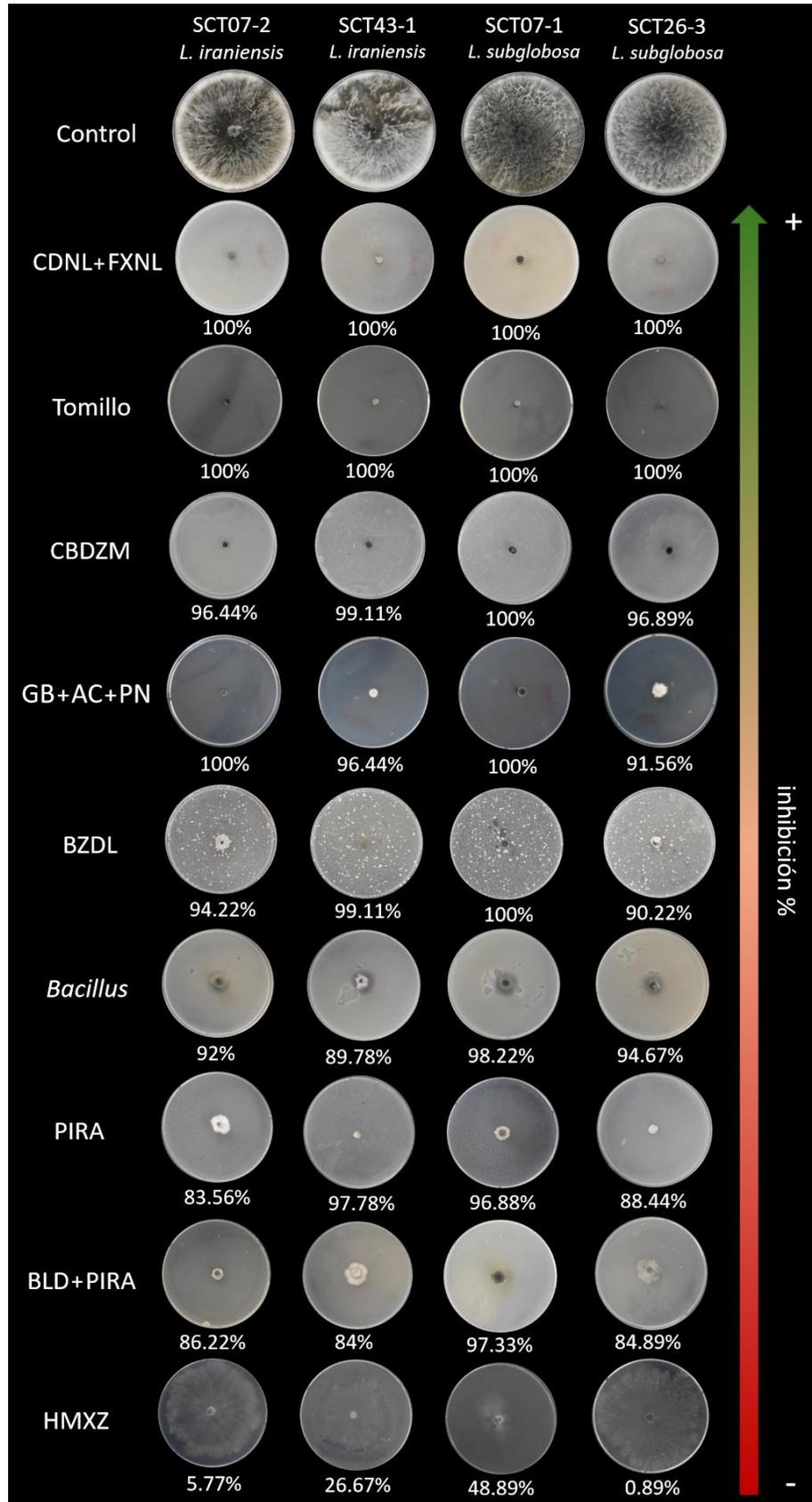


Figura 28. Ensayos en medio envenenado con productos comerciales orgánicos y químicos, ordenados de menor a mayor inhibición. Cepas patógenas evaluadas: *Lasiodiplodia iraniensis* SCT07-2, *L. iraniensis* SCT43-1, *L. subglobosa* SCT07-1 y *L. subglobosa* SCT26-3.

Cabe mencionar, que no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con respecto a la inhibición de las cepas. Es decir, que la mayoría de los productos fueron capaces de inhibir el crecimiento de las cepas más virulentas de cada especie de *L. iraniensis* y *L. subglobosa* seleccionadas.

3.5.1.2 Agentes de control biológico (BCA)

Los ensayos *in vitro* se evaluaron a los cuatro días de haber colocado los discos de los antagonistas en confrontación con el patógeno (Tabla 17).

Tabla 17. Evaluación del porcentaje de inhibición de los agentes de control biológico en los ensayos *in vitro* con la cepa *L. iraniensis* SCT07-2.

	Cepa	Especie	% inhibición
Trichoderma	M2-A	<i>Trichoderma</i> sp.	23.60 ^{f,g}
	M3 Ph	<i>T. harzianum</i>	28.97 ^{c,d,e,f}
	Tricho-sin	<i>T. harzianum</i>	34.4 ^{b,c,d,e}
	T-ORO	<i>T. asperellum</i>	28.80 ^f
	EF09BCMX	<i>T. asperellum</i>	26.98 ^{f,g}
	EF11BCMX	<i>T. asperellum</i>	29.51 ^{c,d,e,f}
	Tat	<i>T. atroviride</i>	28.36 ^{d,e,f}
	Tasp	<i>T. asperellum</i>	30.5 ^{b,c,d,e,f}
	T06BCMX	<i>T. harzianum</i>	26.9 ^{e,f}
	T09BCMX	<i>T. asperellum</i>	29.5 ^{c,d,e,f}
	T11BCMX	<i>T. asperellum</i>	37.5 ^{a,b}
Chaetomium	NLC62	<i>Chaetomium globosum</i>	14.2 ^h
	LCCH4-d	<i>Chaetomium</i> sp.	18.4 ^{g,h}
	SCT26-1	<i>C. megalocarpum</i>	25.0 ^{f,g}
Bacillus	BEVP01BCMX	<i>Bacillus mojavensis</i>	36.4 ^{a,b,c}
	BEVP26BCMX	<i>B. amyloliquefaciens</i>	43.8 ^a
	BEVP31BCMX	<i>B. amyloliquefaciens</i>	35.8 ^{b,c,d}

A partir del cálculo del porcentaje de inhibición y el análisis estadístico de todos los microorganismos, se encontró que la cepa BEVP26BCMX de *Bacillus amyloliquefaciens*, fue la que tuvo mayor inhibición sobre la cepa SCT07-2 de *L. iraniensis* (43.8%). Seguida de esta, están el resto de las cepas de *Bacillus*, y la cepa de *Trichoderma asperellum* T11BCMX. Adicionalmente, se hicieron análisis comparativos por separado entre los microorganismos del mismo género, lo que resultó en diferencias significativas en las diferentes especies. Entre las cepas de *Trichoderma*, las que inhibieron mejor al patógeno, fueron las ya

mencionadas, seguidas de las cepas T09BCMx, M3 Ph, EF11BCMx, Tat y T06BCMx.

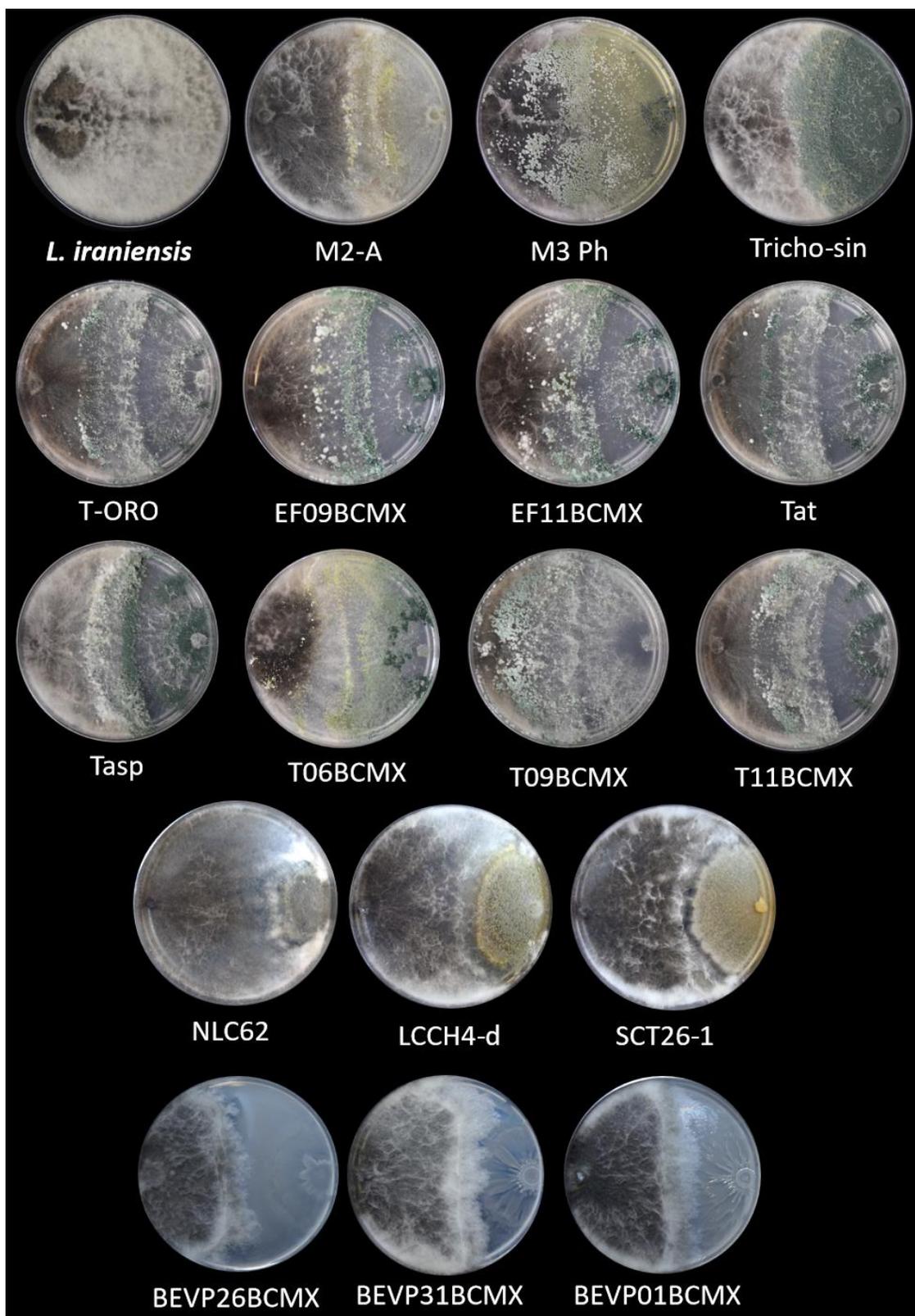


Figura 29. Ensayos de confrontación entre agentes de control biológico (lado derecho de la placa) y la cepa *Lasiodiplodia iraniensis* SCT07-2 (lado izquierdo) a los 7 días.

Debido a que las cepas de *Trichoderma* y de *Lasiodiplodia* se caracterizan por su rápido crecimiento, es importante considerar, además de la competencia por el espacio y nutrientes, el micoparasitismo del patógeno. Las cepas de *T. asperellum* T09BCMX, *T. harzianum* M3 Ph y *T. asperellum* EF11BCMX, mostraron un alto porcentaje de inhibición y un visible micoparasitismo en las placas (Figura 29), por ello, se consideraron como los mejores aislados de *Trichoderma* para inhibir el crecimiento de *L. iraniensis* SCT07-2.

Por otro lado, entre las cepas de *Chaetomium*, *C. megalocarpum* SCT26-1 mostró mejor inhibición sobre la cepa de *L. iraniensis* SCT07-2. Al séptimo día de iniciado el ensayo de confrontación, se observó un halo entre los hongos, lo que indica que el hongo *C. megalocarpum* impidió que la cepa de *Lasiodiplodia* continuara su crecimiento. Por esta razón, se determinó a esta cepa como la mejor candidata para controlar a *L. iraniensis*.

Las tres cepas de *Bacillus* spp. evaluadas se caracterizan por tener un rápido crecimiento, parecido a *L. iraniensis*, observando una competencia por espacio y nutrientes entre los microorganismos. La cepa de *B. amyloliquefaciens* BEVP26BCMX mostró diferencias significativas con respecto a las otras cepas, por ello se considera la mejor candidata de agente de biocontrol para *L. iraniensis*.

Capítulo 4. Discusión

A partir de la caracterización molecular y morfológica de los aislados obtenidos de las ramas con síntomas de cancro y gomosis de las huertas de cítricos, se encontró una gran variedad de hongos. Entre los géneros aislados, se identificaron a *Lasiodiplodia*, *Colletotrichum*, *Dothiorella*, *Fusarium*, *Eutypella*, *Phaeobotryon*, entre otros. La mayoría de estos aislados pertenecen a la familia Botryosphaeriaceae, la cual ha sido reportada como una familia de hongos de la madera compuesta por diversas especies virulentas en múltiples cultivos alrededor del mundo (Batista *et al.* 2021).

El hongo de *Colletotrichum gloeosporioides* fue la segunda especie más aislada, después de *Lasiodiplodia iraniensis*, con una incidencia del 40.47% en las huertas, y se identificó en árboles de naranja, toronja y mandarina. Esta especie se ha aislado previamente en México en cultivos de toronja, limón mexicano, limón italiano y naranja dulce (Cruz-Lagunas *et al.* 2020; Pérez *et al.* 2020; Larralde-Corona *et al.* 2021). Este género es el causante de la enfermedad comúnmente conocida como antracnosis, en la cual el hongo permanece en la planta de forma asintomática y, cuando la planta entra en condiciones de estrés, se desencadenan una serie de síntomas. La sintomatología incluye la muerte regresiva, la caída prematura de las hojas y manchas café oscuras en los frutos, lo que provoca su caída prematura (Eskalen *et al.* 2019).

Las cepas de *Colletotrichum* se aislaron de ramas con síntomas de tizón y gomosis. La gomosis no es un síntoma común causado por este patógeno, pero sí se ha observado en cultivos de naranja, limón y mandarina (Wang *et al.* 2024). La antracnosis afecta la producción de los frutos en distintos cultivos de cítricos alrededor del mundo (Guerreiro *et al.* 2011; Aiello *et al.* 2014; Ramos *et al.* 2014), por lo que es importante estudiar el papel de esta especie en los árboles de cítricos para entender su comportamiento en planta y elaborar estrategias para su control.

Del género de *Fusarium* se obtuvo la mayor variedad de especies, *F. acuminatum*, *F. citri*, *F. incarnatum*, *F. nanum*, *F. nucidum*, *F. pernambucanum* y *F. proliferatum*. En su mayoría, las especies de *Fusarium* se encuentran en el suelo como saprófitos y patógenos, infectando las partes aéreas y subterráneas de las plantas, ya sea como patógeno principal o como secundario (Summerell *et al.* 2003). El hongo de *Fusarium* se ha asociado anteriormente con enfermedades de pudrición de raíz, marchitez vascular, pudrición del tallo y pudrición del fruto, a las cuales muchos cultivos frutales son susceptibles (Zakaria, 2023). En cítricos, las especies *F. sarcocroum*, *F. citricola*, *F. salinense*, *F. oxysporum*, *F. equiseti*, *F. brachygibbosum* y *F. solani*, han sido reportadas como causantes de la pudrición seca de la raíz, pudrición de fruto y canchales de

la madera (Sandoval-Denis *et al.* 2017; Ezrari *et al.* 2021; Moosa *et al.* 2021; Moosa *et al.* 2023). Hay muy pocos reportes del aislamiento de estos hongos de ramas o tallo de las plantas (Espargham *et al.* 2020), por lo que es importante investigar la presencia y el papel de estos hongos en la madera de árboles de cítricos.

Las especies de *Lasiodiplodia iraniensis* y *L. subglobosa* fueron las más abundantes en este estudio con una incidencia del 76.19% en las huertas. En un trabajo reciente del 2024, Piattino *et al.* aislaron hongos de *L. iraniensis* y *Diaporthe* spp. de ramas sintomáticas de huertas de naranjos (*C. sinensis*) en el estado de Florida, Estados Unidos. Inocularon dos aislados de *Lasiodiplodia* en plantas de naranja Valencia para evaluar su virulencia. A los siete días de iniciado el ensayo, se observaron síntomas de gomosis y necrosis alrededor de donde colocaron los discos de micelio, y para los 14 días, marchitamiento de la mayoría de las ramas inoculadas. Uno de los aislados produjo un 73% de decaimiento de las plantas, mientras que el otro 67%. A diferencia de su trabajo, nuestras cepas ocasionaron síntomas de gomosis dos días antes y todas las plantas evaluadas sufrieron síntomas de marchitamiento.

Las especies de *Lasiodiplodia* identificadas en este trabajo, ya han sido reportadas en cultivos de cítricos causando la misma sintomatología en México. En el trabajo de Bautista-Cruz *et al.* (2019) se aislaron *L. iraniensis* y *L. subglobosa* de árboles de limón persa (*Citrus latifolia*) en huertas de Puebla y Veracruz, con síntomas de cancro, gomosis y muerte regresiva. Al inocular estos aislados en ramas de plantas de limón persa, observaron que las ramas presentaron gomosis y necrosis a los 30 días, con lesiones internas promedio de 19 mm. Las cepas obtenidas en huertos de Sonora fueron más virulentas, ocasionando los mismos síntomas a los 15 días y lesiones promedio de 33 mm con *L. iraniensis* y de 14 mm con *L. subglobosa*.

Recientemente, Santillán-Mendoza *et al.* (2024) aislaron a *L. iraniensis*, entre otras especies de *Lasiodiplodia*, de la madera de árboles de limón persa con síntomas de muerte regresiva, canchros y gomosis en el estado de Tabasco. Cuando inocularon discos de micelio de sus aislados en ramas de limón, la cepa de *L. iraniensis*, fue la más virulenta entre las especies evaluadas, con una lesión interna promedio de aproximadamente 32 mm a los 30 días. Esta longitud de la lesión es semejante a la obtenida en este trabajo, pero el tiempo en que tardaron nuestras cepas en causar este tamaño de lesión fue menor. La severidad en la madera de naranja puede deberse a una mayor susceptibilidad de los cultivos de naranja que los de limón. También es probable que las cepas de *Lasiodiplodia* aisladas en Sonora sean más virulentas que las obtenidas en Tabasco y Veracruz. Para conocer las causas de la diferencia en

susceptibilidad, se deben hacer ensayos de patogenicidad usando otras especies de cítricos o comparar las cepas obtenidas de diferentes estados de México.

Por otro lado, debido a que los árboles de cítricos establecidos en Hermosillo provienen de viveros de Veracruz y los hongos de la madera pueden pasar desapercibidos como endófitos en las plantas (Salvatore *et al.* 2020), se puede hipotetizar que *L. iraniensis* y *L. subglobosa* fueron introducidos a Sonora del estado de Veracruz. Con el tiempo, las diferencias en las condiciones climáticas (estrés hídrico y por calor), pudieron haber afectado a las plantas, ocasionando que los hongos provocaran la sintomatología cuando estas se encontraban más vulnerables. Además, alrededor de las huertas de cítricos en la costa de Hermosillo se encuentran campos de cultivos de vid, por lo que también pudiera ser que los hongos hayan pasado de estos cultivos a los de cítricos, sin embargo, hasta ahora no se han encontrado cepas de *L. iraniensis* y *L. subglobosa* afectando vid en Sonora (Rangel-Montoya *et al.*, 2021).

Se observaron diferencias en el nivel de virulencia entre aislados de la misma especie. Estas diferencias entre los hongos pueden deberse a factores ambientales y/o variaciones en los genomas. En un trabajo realizado por Gunamalai *et al.* (2023), evaluaron la patogenicidad de cepas de *L. theobromae* en ramas y frutos en aguacate y mango. Secuenciaron el genoma de la cepa más virulenta y la menos virulenta para comparar los genes ortólogos que compartían o diferían. Con un análisis de polimorfismo de nucleótidos, encontraron cambios en genes involucrados con la secreción de enzimas degradadoras de la pared celular, de producción de sideróforos y de metabolitos secundarios, los cuales influyen en el mecanismo de virulencia. En parte, esto pudiera responder a la incógnita de cómo es que los diferentes aislados de *L. iraniensis* y *L. subglobosa* tienen diferentes niveles de virulencia.

La virulencia de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae se ha asociado con el estado de estrés abiótico del hospedante. Entre las razones por las que las plantas entran en estrés, están por las condiciones extremas de temperatura, pH, humedad, concentración de sales, entre otras (De Wet *et al.*, 2008; Gunamalai *et al.*, 2023). La temperatura juega un papel importante en la virulencia de los hongos, pues cuando la planta está bajo estrés y las condiciones climáticas son las óptimas para el hongo, la enfermedad se desarrolla en mayor grado y con más rapidez (López-Moral *et al.*, 2022).

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de temperatura en este trabajo, los aislados de *Lasiodiplodia* se encontrarían en las condiciones favorables para colonizar la madera de los árboles entre los meses de noviembre y febrero, cuando la temperatura más alta ronda entre los 24 y 30 °C en Hermosillo. Esta temporada de otoño-invierno corresponde a los tiempos en que se realizaron los

muestreos de las ramas para este estudio, cuando los síntomas en las huertas eran más severos. Asimismo, en los ensayos se observó que los hongos toleran temperaturas de hasta 40 °C, por lo que es probable que, en las épocas de calor se encuentren en forma latente en los restos de madera infectada o como endófitos en el interior de los árboles.

En los últimos años, durante los meses de junio y julio, cuando la temperatura y las precipitaciones son mayores, se ha detectado la presencia de un insecto en las ramas de los árboles conocido comúnmente como chicharra cantadora (Gamboa, 2020). Los machos salen del suelo en la temporada de verano y suben a las ramas de los árboles a realizar un canto para atraer a las hembras y reproducirse (Kim, 2020). De acuerdo con lo reportado con los productores de las huertas, estos insectos podrían estar ocasionando unas heridas de forma aserrada en las ramas cuando las hembras realizan su desove (Figura 3, D). Este tipo de heridas se observó en algunas de las muestras de ramas analizadas, podrían ser una vía de entrada para que los hongos puedan penetrar y colonizar la madera. Tomando esto en consideración, el patógeno que es capaz de tolerar las temperaturas de verano de Hermosillo, podría dispersar sus esporas por la lluvia y aprovechar la oportunidad de establecerse en la madera a través de estas heridas. Sin embargo, se requieren otros estudios para comprobar estas relaciones.

En cuanto al resto de las especies de la familia Botryosphaeriaceae, no produjeron síntomas en las plantas ni lesiones en el interior de las ramas, solo se observó la presencia de picnidios en las áreas inoculadas con las cepas de *Pseudofusicoccum* y *Dothiorella*. El género de *Dothiorella*, fue el tercer género más aislado de todos y el segundo de la familia Botryosphaeriaceae después de *Lasiodiplodia*, con una incidencia del 28.57% en las huertas y con una diversidad de dos especies. Las especies de *Dothiorella* son conocidas por ser saprófitos, patógenos y endófitos en asociación con hospedantes leñosos (Abdollahzadeh *et al.*, 2014). Este hongo ha sido reportado anteriormente en huertas de cítricos en Irán (Espargham *et al.*, 2020), Estados Unidos (Adesemoye *et al.*, 2013), Túnez (Hamrouni *et al.*, 2018), Algeria (Berraf-Tebbal *et al.*, 2020) y en otros países de Europa (Pereira *et al.*, 2021).

De acuerdo con publicaciones anteriores, al comparar distintas especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae, las especies de *Dothiorella* son patógenos entre baja y media virulencia, ocasionando síntomas de canchales, gomosis y necrosis en ramas de limón en cámaras de crecimiento, que van desde los 38.17 mm a los 40 días después de la inoculación (dpi) (Espargham *et al.*, 2020) hasta 68 mm a los 30 dpi (Adesemoye *et al.*, 2013). En resumen, la mayoría de los estudios reportan que la especie de *D. viticola* es la especie más agresiva, seguida por *D. iberica*. Las especies de *D. citricola* y *D. mangifericola* fueron las que se evaluaron en este trabajo, sin embargo, no causaron ninguna lesión ni síntomas visibles en la planta

de naranja a los tres meses de haber sido inoculadas, por lo que los hongos pudieran no estar en las condiciones adecuadas para actuar como patógeno.

Otra especie de la familia Botryosphaeriaceae es *Barriopsis iraniana*. Este género tiene un estilo de vida saprófito, por lo que pueden sobrevivir en la corteza muerta. Hasta la fecha, se tienen pocos registros del aislamiento de estos hongos de plantas leñosas, se han aislado de ramas asintomáticas de mango (Trakunyingcharoen *et al.*, 2014), de ramas muertas de teca (Doilom *et al.*, 2014) y de *Citrus* sp. de ramas con síntomas de cancro y necrosis (Abdollahzadeh *et al.*, 2009). Solo en el trabajo con mango inocularon *B. iraniana* en ramas para estimar su virulencia, y no observaron síntomas y el tamaño de lesión era muy pequeño en comparación con otros géneros, alcanzando una longitud de 30 mm a los siete días en ramas de teca. En comparación, las ramas inoculadas con cepas de *B. iraniana* aisladas en este trabajo, no desarrollaron síntomas y no presentaron lesión interna. Esto, posiblemente a que los hongos de *Barriopsis* ocupan espacio en las ramas muertas ya infectadas de las huertas de Hermosillo para sobrevivir, sin causar daño en las plantas.

Del género de *Phaeobotryon* se obtuvieron dos aislados. Especies de este hongo son conocidas por vivir en angiospermas y gimnospermas, ya sea como endófitos o como patógenos potenciales u oportunistas cuando el hospedante se encuentra bajo estrés (Slippers & Wingfield, 2007; Haiying *et al.*, 2023). Aunque se han reportado distintas especies frutales hospedantes como árboles de manzano, nogal europeo, olivo de Bohemia, albaricoque y durazno en China, con síntomas de muerte regresiva, gomosis y canchros (Haiying *et al.*, 2023; Zhou *et al.*, 2024). Las cepas aisladas en este trabajo no causaron lesiones en las ramas de naranjo, por lo que pudiera estar como endófito en las huertas. Este es el primer reporte del género de *Phaeobotryon* en cítricos en el mundo.

Otro grupo de la familia Botryosphaeriaceae encontrado, es *Pseudofusicoccum*, específicamente la especie *P. stromaticum*. *Pseudofusicoccum stromaticum* se ha aislado de árboles de mango (*Mangifera indica*) en Brasil causando síntomas de muerte regresiva y lesiones necróticas en fruto (Marques *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013), de nuez de la india (*Anacardium occidentale*) causando gomosis (Netto, 2016) y de ramas de árboles con muerte regresiva de manzana malaya (*Syzygium malaccense*) con muerte regresiva (Silveira *et al.*, 2017). De igual manera, se ha encontrado en ramas enfermas con canchros y gomosis en árboles de durazno en Uruguay (Sessa, *et al.*, 2021) y de nogal en Sonora, México (Torres, K., 2023). Las cepas evaluadas para los ensayos de patogenia en estos reportes presentaron lesiones con una virulencia baja y media, excepto en nogal en donde se observaron lesiones necróticas de 25 mm a los dos meses de inoculación. En comparación con nuestras cepas inoculadas en plantas en invernadero, las plantas sólo

presentaron picnidios y los hongos no causaron lesiones en las ramas. Esto pudiera deberse a que nuestras cepas solo estaban como endófitos o patógenos latentes en las huertas de Hermosillo, o que requieren mayor tiempo para causar lesiones. Por otro lado, es probable que el origen de esta especie en cítricos sea el nogal, por la cercanía que guardan las huertas de cítricos con las nogaleras en la costa de Hermosillo.

El último hongo integrante de esta familia Botryosphaeriaceae, es *Oblongocollomyces* sp. Inicialmente este hongo se había identificado como *Sphaeropsis variabilis*, sin embargo, este se cambió cuando Yang *et al.* (2017) lo introdujo como un género monotípico. Debido a esto, no se cuentan con muchos registros de esta especie en cultivos en el mundo, pero se ha aislado de madera asintomática de árboles marula (*Sclerocarya birrea*) en Sudáfrica (Ramabulana *et al.*, 2022). Por lo que también representa un primer reporte en cítricos.

A partir de la comparación entre los reportes de las diferentes especies de los hongos de la familia Botryosphaeriaceae en el mundo con los aislados obtenidos de las huertas de Hermosillo, se puede decir que *Lasiodiplodia* es uno de los hongos más virulentos y con la mayor incidencia en distintos cultivos en el mundo, no solo en cítricos (Contreras-Pérez *et al.*, 2019; Rangel-Montoya *et al.*, 2021). En cuanto al resto de las especies, han sido reportadas como agentes de baja y media virulencia, así como posibles endófitos al aislarse de tejido asintomático. Esta variabilidad se debe a que los hongos de la madera de la familia Botryosphaeriaceae pueden actuar como saprófitos, endófitos o patógenos (Slippers & Wingfield, 2007; Phillips *et al.*, 2013).

Las cepas de *Dothiorella*, *Barriopsis*, *Phaeobotryon*, *Pseudofusicoccum* y *Oblongocollomyces* pueden considerarse patógenos latentes en la madera de los árboles de cítricos, que podrían causar daño cuando los árboles se encuentran bajo estrés abiótico o con heridas, y/o enfermos a causa de *Lasiodiplodia*, esto considerando que en la mayoría de los reportes se aislaron a estas especies en conjunto. Por otro lado, estas especies pudieran vivir en la madera enferma como saprófitos, aprovechando las ramas muertas de los árboles enfermos.

Para confirmar si las cepas son patógenas, se podrían evaluar las plantas de naranjo en condiciones estresantes como altas temperaturas y evaluar los síntomas. Asimismo, se podrían realizar co-inoculaciones con distintas combinaciones de *Lasiodiplodia iraniensis* y *L. subglobosa* con el resto de las especies, para evaluar si estos hongos actúan ocasionando un mayor daño en conjunto.

A partir de los resultados de patogenicidad y por el análisis de reportes anteriores, se seleccionaron las dos cepas más virulentas de cada especie de *L. iraniensis* y *L. subglobosa*, estas se usaron para hacer ensayos de control *in vitro* con productos químicos y orgánicos, y la cepa más virulenta de todas, *L. iraniensis* SCT07-2 se usó para los ensayos de confrontación con los agentes de control biológico *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp. y *Bacillus* spp.

Con base en los resultados obtenidos de los ensayos con medio envenenado, se encontró que todos los productos evaluados (a excepción el de Hymexazol), tuvieron una buena actividad inhibitoria para controlar el crecimiento de los aislados de *Lasiodiplodia*. Los dos productos que tuvieron 100% de inhibición para los cuatro patógenos evaluados, fueron los de Cyprodinil con fludioxonil y el de aceite de tomillo. El primero tiene una doble función; mientras que el Cyprodinil actúa de forma sistemática, el fludioxonil es de contacto. En conjunto, inhiben la germinación de las esporas, el crecimiento del tubo germinativo, la penetración dentro de la planta y el crecimiento intracelular del micelio (Syngenta, 2017). Por otro lado, el producto a base de aceite de tomillo tiene un modo de acción por contacto, mediante la descomposición de las membranas celulares, destruyendo las hifas de los hongos y previniendo la germinación de sus esporas (Huma, 2020). Esto significa que posiblemente el producto no permite que el micelio del hongo de *Lasiodiplodia* penetre dentro de la planta, evitando la germinación de las esporas del hongo *Lasiodiplodia*.

En los últimos años, la investigación sobre el uso de organismos para el control biológico como alternativa del uso de productos comerciales ha aumentado (Stenberg *et al.*, 2021). Entre los organismos con mejor actividad antagónica se encuentran especies de *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma* y *Burkholderia*, para el control de enfermedades en plantas (Lahlali *et al.*, 2022), siendo *Trichoderma* y *Bacillus* los más utilizados. *Trichoderma* destaca por los distintos métodos de acción como antagonista, tales como: competencia por espacio y nutrientes, síntesis de metabolitos secundarios, micoparasitismo, entre otros (Tyśkiewicz *et al.*, 2022). Debido a su eficiencia para controlar el crecimiento de una gran variedad de patógenos, se realizaron los ensayos contra la cepa más virulenta de *Lasiodiplodia*.

Hubo diferencias significativas entre las distintas especies evaluadas, las cepas *T. asperellum* T11BCMX (endófito de vid) y *T. harzianum* Tricho-sin (producto comercial) fueron las que tuvieron la mayor actividad antagónica sobre *L. iraniensis* SCT07-2. Algo a considerar, es que a causa de la alta tasa de crecimiento que tiene *Trichoderma*, estos resultados pueden deberse a la competencia de espacio y nutrientes, por lo que es importante evaluar otro método acción para determinar a las mejores cepas para controlar a *Lasiodiplodia*. Tomando esto en cuenta, las cepas *T. asperellum* T09BCMX, *T. harzianum* M3 Ph y *T.*

asperellum EF11BCMX fueron seleccionadas como las más adecuadas para el control del patógeno, pues además de tener un alto porcentaje de inhibición, mostraron micoparasitismo, observado como el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* sobre el patógeno en las placas (Figura 27).

Bacillus, es uno de los géneros bacterianos más usados para el control de patógenos, ya que produce metabolitos secundarios (moléculas antimicrobianas) que resultan tóxicos para otros microorganismos (Nakatsuji & Gallo, 2012), y más importante, forma biopelículas. Una biopelícula es el conjunto de agregados de microorganismos incrustado en una matriz extracelular, esta estructura le ayuda a las bacterias a adquirir nutrientes para asegurar su sobrevivencia en las plantas (Lahlali *et al.*, 2022; Fessia *et al.*, 2022). Al analizar los resultados de los ensayos *in vitro*, no se encontraron diferencias significativas entre las bacterias de *Bacillus* spp. contra *L. iraniensis*, por lo que las tres cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento del patógeno desde un 35.8% hasta un 43.8%. El mayor porcentaje de inhibición se obtuvo con la cepa *B. amyloliquefaciens* BEVP26BCMX.

En los últimos años, especies de *Chaetomium* han sido reportadas como potenciales agentes de control biológico (Hung *et al.*, 2015). Entre sus métodos de acción, se ha encontrado que *C. globosum* produce compuestos que actúan como antibióticos para competir contra patógenos (Quyet *et al.*, 2016), así como métodos de competencia por espacio y micoparasitismo en ensayos *in vitro* (Moya *et al.*, 2016). Por ello, se usaron diferentes especies de *Chaetomium* aisladas de distintos cultivos para evaluar el potencial de este hongo para inhibir el crecimiento de *Lasiodiplodia* spp. Entre los diferentes organismos evaluados para los ensayos, *Chaetomium* fue de los grupos con menor valor de inhibición, sin embargo, la cepa *C. megalocarpum* SCT26-1 fue la que tuvo mejor inhibición entre las cepas de *Chaetomium* y la que tuvo mayor similitud con otras cepas de *Trichoderma* evaluadas. Además, en la placa se vio un espacio entre ambos hongos, lo que significa que el antagonista produce antibióticos que no permiten el crecimiento del patógeno. Dado que días después de haber concluido el ensayo, el micelio de *Lasiodiplodia* no creció sobre el de *Chaetomium*, *C. megalocarpum* tiene potencial como agente de control biológico.

Tanto los productos comerciales evaluados como los agentes de control biológico mostraron efectividad para controlar *in vitro* el crecimiento de *Lasiodiplodia*, por lo que el siguiente paso es probarlos en ensayos *in planta*. Dado que un desafío actual es el cambio climático que, entre otras cosas, vuelve a los cultivos más susceptibles a enfermedades e influye en la emergencia de nuevos patógenos y en su evolución (Nnadi & Carter, 2021; Brajesh *et al.*, 2023), el uso de agentes de control biológico será clave para el control de patógenos, especialmente de aquellos con tolerancia a altas temperaturas.

Capítulo 5. Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo permitieron identificar a hongos presentes en la madera de los árboles enfermos de las huertas de cítricos en Hermosillo. Se aislaron mayormente hongos de la familia Botryosphaeriaceae, como *Lasiodiplodia iraniensis*, *L. subglobosa* y *Dothiorella* spp., así como especies de otras familias como *Colletotrichum gloeosporioides*.

Las especies de la familia Botryosphaeriaceae tuvieron un crecimiento óptimo a temperaturas de 25 y 28 °C, las cuales coinciden con las condiciones climáticas en las temporadas de invierno en Hermosillo. Estos hongos muy probablemente encuentran las condiciones más favorables a inicios y finales del año para colonizar y establecerse en el tejido vascular de los árboles.

A partir de los ensayos de patogenicidad realizados en plantas de naranjo en invernadero, se encontró que *L. iraniensis* y *L. subglobosa* son las especies más virulentas, causando los mismos síntomas de tizón, canchros y gomosis observados en las huertas.

Los productos a base de Cyprodinil con fludioxonil y el de aceite de tomillo, así como las cepas de *Trichoderma asperellum* T09BCMX, *T. harzianum* M3 Ph, *T. asperellum* EF11BCMX, *Chaetomium megalocarpum* SCT26-1 y *Bacillus amyloliquefaciens* BEVP26BCMX demostraron ser los más eficaces para controlar a las cepas más virulentas de *Lasiodiplodia* en los ensayos *in vitro*. Es necesario probarlos *in planta* para evaluar su efectividad para controlar a estos patógenos en condiciones de invernadero y en campo.

Se recomienda a los productores de las huertas aplicar estos tratamientos antes de la temporada de invierno para prevenir la infección por estos hongos, así como antes de la temporada de lluvia de julio. De igual manera, recoger los restos de materia orgánica que caigan al suelo y los residuos de poda, para evitar que sean fuente de inóculo que sirvan para infectar árboles sanos.

Literatura citada

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Zare, R., Phillips, A. (2014) A phylogenetic study of *Dothiorella* and *Spencermartinsia* species associated with woody plants in Iran, New Zealand, Portugal and Spain. *Fungal Diversity*, 85(2). <https://doi.org/10.1007/s13225-023-00789-4>
- Abdollahzadeh, J., Mohammadi, E., Javadi, A., Shams-bakhsh, M., Zare, R., Phillips, A. (2009) *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the Botryosphaeriaceae from trees in Iran. *Persoonia*. Volume 23. doi: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20198156/>
- Adesemoye, A., Mayorquin, J., Wang, D., Twizeyimana, M., Lynch, S., Eskalen, A. (2013) Identification of Species of Botryosphaeriaceae Causing Bot Gummosis in Citrus in California. *Plant Disease*. Vol. 98, No. 1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0492-RE>
- Aiello, D., Carrieri, R., Guarnaccia, V., Vitale, A., Lahoz, E., Polizzi, G. (2014) Characterization and Pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* Causing Preharvest Disease on Citrus sinensis in Italy. *Journal of Phytopathology*. Volume 163, Issue3. <https://doi.org/10.1111/jph.12299>
- Al-Sadi, A., Al-Ghathithi, A., Al-Fahdi, N., Al-Yahyai, R. (2014) Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. *Int. J. Agric. Biol.*, 16: 371–376. https://www.researchgate.net/publication/260086049_Characterization_and_Pathogenicity_of_Fungal_Pathogens_Associated_with_Root_Diseases_of_Citrus_in_Oman
- Apablaza, H. (2022) Detección molecular de hongos de la madera en frutales. Redagícola. <https://redagricola.com/deteccion-molecular-de-hongos-de-la-madera-en-frutales/>
- Batista E, Lopes A, Alves A. (2021) What Do We Know about Botryosphaeriaceae? An Overview of a Worldwide Cured Dataset. *Forests*. 12(3). <https://doi.org/10.3390/f12030313>
- Bautista, M., Almaguer, G., Leyva, S., Colinas, M., Correia, K., Camacho, M., Robles, L., Michereff, S., Tovar, J. (2019) Phylogeny, Distribution, and Pathogenicity of *Lasiodiplodia* Species Associated With Cankers and Dieback Symptoms of Persian Lime in Mexico. *Plant Disease*. 103(6). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1036-RE>
- Base de Datos Estadísticos Corporativos de la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAOSTAT). (2019) Valor de la Producción Agrícola. Consultado el 01/08/23 en: <https://www.fao.org/faostat/es/>
- Belair, M., Restrepo-Leal, J., Praz, C., Fontaine, F., Rémond, C., Fernandez, O., Besaury, L. (2023) Botryosphaeriaceae gene machinery: Correlation between diversity and virulence. *Fungal Biology*. Volumen 127, Issue 5. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2023.03.004>
- Berraf-Tebbal, A., Eddine, A., Aigoun-Mouhous, W., Špetík, M., Čechová, J., Pokluda, R., Baránek, M., Eichmeier, A., Alves, A. (2020) *Lasiodiplodia mitidjana* sp. nov. and other Botryosphaeriaceae species causing branch canker and dieback of *Citrus sinensis* in Algeria. *Journal of Plant Pathology*, 56(3). <https://doi.org/10.1234/jpp.2024.56789>

- Biblioteca de Publicaciones Oficiales del Gobierno de la República (2022) Producción de cítricos en México. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/publicaciones/articulos/produccion-de-citricos-en-mexico>
- Contreras-Pérez, M., Santoyo-Pizano, G., Santos-Villalobos, S., Gutiérrez-García, M., Orozco-Mosqueda, M., Rocha-Granados, M. (2019) Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el estado de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1905-4>
- Cruz-Lagunas, B., Ortega-Acosta, S., Reyes-García, G., Toribio-Jiménez, J., Juárez-López, P., Guillén-Sánchez, D., Damián-Nava, A., Romero-Ramírez, Y., Palemón-Alberto, F. (2020) *Colletotrichum gloeosporioides* causes anthracnose on grapefruit (*Citrus paradisi*) in Mexico. *Australasian Plant Diseases Notes*. 15, 31. <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00401-z>
- Delgado-Ramírez, C., Sepúlveda, E., Rangel-Montoya, A., Valenzuela-Solano, C., Hernández-Martínez, R. (2023) Heritage grapevines as sources of biological control agents for *Botryosphaeria dieback* pathogens. *Phytopathologia Mediterranea* 62(2): 115-134. <https://doi.org/10.36253/phyto-14154>
- De Wet, J., Slippers, B., Preisig O., Wingfield, B., Wingfield, M. (2008) Phylogeny of the Botryosphaeriaceae reveals patterns of host association. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Volume 46, Issue 1. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.08.016>
- Dong, W., Doilom M., Hyde, KD., Phillips, A., Yan, K., To-anun, C., Xu, JC., Zhang, H., Nalumpang, S. (2020) Pathogenicity of five Botryosphaeriaceae species isolated from *Tectona grandis* (teak): the pathogenic potential of *Lasiodiplodia* species. *Asian Journal of Mycology* 3(1). <https://doi.org/10.5943/ajom/3/1/12>
- Eskalen, A., (2019) Anthracnose. Agriculture: Citrus Pest Management Guidelines. University of California. <https://ipm.ucanr.edu/agriculture/citrus/anthracnose/#gsc.tab=0>
- Espargham, N., Mohammadi, H., & Gramaje, D. (2020). A Survey of Trunk Disease Pathogens within Citrus Trees in Iran. *Plants*, 9(6), 754. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/plants9060754>
- Ezrari, S., Lahlali, R., Radouane, N., Abdessalem, T., Asfers, A., Boughalleb-M'Hamdi, N., Amiri, S., Lazraq, A. (2021) Characterization of *Fusarium* species causing dry root rot disease of citrus trees in Morocco. *Journal of Plant Diseases and Protection*. Vol. 128. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00392-0>
- Fessia, A., Barra, P., Barros, G., Nesci, A. (2022) Could *Bacillus* biofilms enhance the effectivity of biocontrol strategies in the phyllosphere?. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 133, Issue 4. <https://doi.org/10.1111/jam.15596>
- Gamboa, A. (2020) Habitan en Sonora 17 especies de chicharras, cantan para aparearse antes de lluvias... ¡Cúidalas!. Proyecto Puente. <https://proyectopuente.com.mx/2020/07/02/habitan-en-sonora-17-especies-de-chicharras-cantan-para-aparearse-antes-de-lluvias-cuidalas/>
- González, L., Tullo, C. (2019) Guía Técnica de Cultivo de Cítricos. Proyecto Paquetes Tecnológicos. ISBN 978-99967-940-3-2. https://www.jica.go.jp/Resource/paraguay/espanol/office/others/c8h0vm0000ad5gke-att/gt_03.pdf

- Guerreiro, W., Spósito, B., Amorim, L., Packer, F., Melo de Filho, P. (2011) *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *Eur J Plant Pathology* 131. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9795-1>
- Gunamalai, L., Duanis-Assaf, D., Sharir, T., Maurer, D., Feygenberg, O., Sela, N., & Alkan, N. (2023). Comparative Characterization of Virulent and Less-Virulent *Lasiodiplodia theobromae* Isolates. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 36(8), 502–515. <https://doi.org/10.1094/mpmi-11-22-0234-r>
- Haiying, J., Mengyao, L., Wang, C., Rong, M. (2023) Species Diversity of *Phaeobotryon* Associated with Tree Canker and Dieback Diseases in Xinjiang, China. *Forests* 14(5). <https://doi.org/10.3390/f14050864>
- Hamrouni, N., Nouri, M., Trouillas, F., Said A., Sadfi-Zouaoui, N., Hajlaoui, M. (2018) *Dothiorella gummosis* caused by *Dothiorella viticola*, first record from citrus in Tunisia. *New Disease Reports* 38(10). <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2018.038.010>
- Herbario Virtual Fitopatología (2023) Tristeza de los Cítricos (Citrus tristeza virus, CTV). Catedra de Fitopatología (FAUBA). https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar/?page_id=4063
- Huma Gro (2020) Proud. Boletín Técnico del Producto. <https://www.bioexport.com.gt/img/kcfinder/files/PROUD3-GT-Tech.pdf>
- Hung, P. M., Wattanachai, P., Kasem, S., & Poeaim, S. (2015). Efficacy of *Chaetomium* Species as Biological Control Agents against *Phytophthora nicotianae* Root Rot in Citrus. *Mycobiology*, 43(3). <https://doi.org/10.5941/MYCO.2015.43.3.288>
- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). (2023) Citrus tristeza virus en la Península de Yucatán. Portal del Gobierno de México. <https://www.gob.mx/inifap/articulos/citrus-tristeza-virus-en-la-peninsula-de-yucatan>
- Kim, A. (2020) Millones de cigarras saldrán después de 17 años bajo tierra porque, claro, es 2020. CNN. <https://cnnespanol.cnn.com/2020/05/25/millones-de-cigarras-saldran-despues-de-17-anos-bajo-tierra-porque-claro-es-2020/>
- Klein, J. (2014) Citron Cultivation, Production and Uses in the Mediterranean Region. *Medicinal and Aromatic Plants of the Middle-East. Vol 2*. https://doi.org/10.1007/978-94-017-9276-9_10
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., Barka, E. (2022) Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*. 10(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Larralde-Corona, Ramírez-González, M., Rosas-Hernández, I., De la Cruz-Arguijo, E., De Santiago, C., Keiko, S., Narváez-Zapata, J. (2021) Occurrence and infective potential of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates associated to *Citrus limon* var Eureka. *Biotechnol Rep (Amst)*. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00651>
- López-Moral, A., Lovera, M., Antón-Domínguez, B., Gámiz, A., Michailides, T., Arquero, O., Trapero, A., Agustí-Brisach, C. (2022) Effects of Cultivar Susceptibility, Branch Age, and Temperature on Infection by Botryosphaeriaceae and *Diaporthe* Fungi on English Walnut (*Juglans regia*). *Plant Disease*. Vol. 106, No. 11. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-2042-RE>

- Marques, W., Lima, N., de Morais, M., Michereff, S., Phillips, A., Camara, M. (2013) *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neoscytalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity*. Volume 61. <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0258-1>
- Marques, W., Lima, N., Michereff, S., Camara, M., Souza, C. (2012) First report of mango dieback caused by *Pseudofusicoccum stromaticum* in Brazil. *Plant Disease*. Volume 96. Issue 1. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0425>
- Mayorquin, J., Wang, D., Twizeyimana, M., Eskalen, A. (2016) Identification, Distribution, and Pathogenicity of Diatrypaceae and Botryosphaeriaceae Associated with Citrus Branch Canker in the Southern California Desert. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0362-RE>
- Medrano, A., Ortuño, N. (2007) Control del Damping off mediante la aplicación de bioinsumos en almácigos de cebolla en el Valle Alto de Cochabamba – Bolivia. *ACTA NOVA: Vol. 3, No. 4*. <http://www.scielo.org.bo/pdf/ran/v3n4/v3n4a03.pdf>
- Méndez-Bravo A, Cortazar-Murillo EM, Guevara-Avenidaño E, Ceballos-Luna O, Rodríguez-Haas B, Kiel-Martínez AL. (2018) Plant growth-promoting rhizobacteria associated with avocado display antagonistic activity against *Phytophthora cinnamomi* through volatile emissions. *PLoS ONE* 13(3): e0194665. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194665>
- Mercure, P. (2019) Ahogamiento o “Damping-off” en Plántulas Ornamentales y Vegetales. Programa de Manejo Integrado de Plagas. <https://ipm.cahn.uconn.edu/wp-content/uploads/sites/3216/2022/08/Ahogamiento-o-Damping-off-en-Plantulas-Ornamentales-y-Vegetales..pdf>
- Mondragón, A., Rodríguez, G., Gómez, N., Guerra, J. (2021) Botryosphaeriaceae: una familia de hongos, compleja, diversa y cosmopolita. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 12(4), 643-654. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2620>
- Moosa, A., Zulfiqar, F., Naveed, M. (2023) First record of *Fusarium solani* causing post-harvest Fusarium rot of *Citrus reticulata* Blanco cv. ‘Kinnow’ in Pakistan. *Journal of Plant Pathology*. Volume 105. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01386-1>
- Moosa, A., Farzand, A., Aleem, S., Ahmad, T., Usman, H., Saeed, S., Shafique, M., Masroor, A., Akhtar, S. (2021) First Report of Postharvest Fusarium Rot of Mandarin (*Citrus reticulata* ‘Kinnow’) Caused by *Fusarium equiseti* in Pakistan. *Plant Disease*. Vol. 105, No. 12. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0513-PDN>
- Moya, P., Pedemonte, D., Amengual, S., Franco, M., Sisterna, M. (2016) Antagonism and modes of action of *Chaetomium globosum* species group, potential biocontrol agent of barley foliar diseases. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722016000400001&lng=es&nrm=iso
- Nakatsuji, T. & Gallo, R. (2012) Antimicrobial Peptides: Old Molecules with New Ideas. *Journal of Investigative Dermatology*. 132(3). <https://doi.org/10.1038/jid.2011.387>
- Nnadi NE & Carter DA (2021) Climate change and the emergence of fungal pathogens. *PLOS Pathogens* 17(4). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009503>

- Netto, M., Lima, W., Correia, A., Da Silva, K., Thon, M., Martins, R., Miller, R., Michereff, S., Camara, M. (2016) Analysis of phylogeny, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae species associated with gummosis of *Anacardium* in Brazil, with a new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Biology*. Volume 121, Issue 4. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.006>
- Pereira, J., Wilhelm, P., Aiello, D., Lodovica, M., Polizzi, G., Guarnaccia, V. (2021) Genetic Diversity and Pathogenicity of Botryosphaeriaceae Species Associated with Symptomatic Citrus Plants in Europe. *Plants* 10 (3). <https://doi.org/10.3390/plants10030492>
- Pérez-Mora, J., Mora-Romero, J., Beltrán-Peña, H., García-León, E., Lima, N., Camacho-Tapia, M., Tovar-Pedraza, J. (2020) First Report of *Colletotrichum siamense* and *C. gloeosporioides* Causing Anthracnose of *Citrus* spp. in Mexico. *Plant Disease*. Vol. 105, No. 2. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1743-PDN>
- Piattino V, Aiello D, Dardani G, Martino I, Flores M, Aćimović SG, Spadaro D, Polizzi G, Guarnaccia V. (2024) *Lasiodiplodia iraniensis* and *Diaporthe* spp. Are Associated with Twig Dieback and Fruit Stem-End Rot of Sweet Orange, *Citrus sinensis*, in Florida. *Horticulturae*. 10(4): 406. <https://doi.org/10.3390/horticulturae10040406>
- Piskur, B., Pavlic, D., Slippers, B., Ogris, N., Maresi, G., Wingfield, M., Jurc, D. (2011) Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae on declining *Ostrya carpinifolia* in Slovenia and Italy following extreme weather conditions. *European Journal of Forest Research*. Vol. 130. <https://doi.org/10.1007/s10342-010-0424-x>
- Polanco, L., Alvarado, O., González, O., Garza, R., Sáenz, E. (2020) Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol. 10. No.4. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>
- Quy, N., Cuong, H., Hong, L., Soyong, K. (2016) Control Mechanism of *Chaetomium* spp. and Its Biological Control of Citrus Root Rot in Pot and Field Experiments in Vietnam. *International Journal of Agricultural Technology*. Volume 12(3). ISSN: 2630-0192
- Ramabulana, E., Kunjeku, E., Slippers, B., Coetzee, M. (2002) Diversity of Endophytes in the Botryosphaeriaceae Differs on Anacardiaceae in Disturbed and Undisturbed Ecosystems in South Africa. *Forests*. 13(2). <https://doi.org/10.3390/f13020341>
- Ramos, A.P., Talhinas, P., Sreenivasaprasad, S., Oliveira, H. (2016) Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C. karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. *Phytoparasitica* 44. <https://doi.org/10.1007/s12600-016-0537-y>
- Rangel-Montoya, E.A., Paolinelli, M., Rolshausen, P.E., Valenzuela-Solano, C., Hernandez-Martinez, R. (2021) Characterization of *Lasiodiplodia* species associated with grapevines in Mexico. *Phytopathologia Mediterranea*. 60(2). <https://doi.org/10.36253/phyto-12576>
- Robles, M., Velázquez, J., Manzanilla, M., Orozco, M., Medina, V., López, J., Flores, R. (2013). Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Chapingo. Serie horticultura*, 19(1), 15-31. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>

- Rivas, P., Loeza, E., Domínguez, S., Lomas, C. (2017). Infección crónica del virus de la tristeza de los cítricos en árboles de *Citrus sinensis* / *C. aurantium* en un régimen térmico restrictivo en Yucatán. *Chapingo. Serie horticultura*. 23(3), 188-202. <https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.028>
- Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER). (2012) México, quinto productor mundial de cítricos. Gobierno de México. <https://www.gob.mx/agricultura%7Cyucatan/articulos/mexico-quinto-productor-mundial-de-citricos>
- Sáenz Pérez, Criseida Alhelí, Hernández, Eduardo Osorio, Estrada Drouaillet, Benigno, Poot Poot, Wilberth Alfredo, Delgado Martínez, Rafael, & Herrera, Raúl Rodríguez. (2019). Principales enfermedades en cítricos. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10 (7), 1653-1665. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1827>
- Salvatore, M., Andolfi, A., Nicoletti, R. (2020) The Thin Line between Pathogenicity and Endophytism: The Case of *Lasiodiplodia theobromae*. *Agriculture*. Volume 10. No. 10. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100488>
- Santillán-Mendoza, R., Estrella-Maldonado, H., Marín-Oluate, L., Matilde-Hernández, C., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, SP., Flores-de la Rosa, FR. (2024) Phylogenetic and Pathogenic Evidence Reveals Novel Host-Pathogen Interactions between Species of *Lasiodiplodia* and *Citrus latifolia* Dieback Disease in Southern Mexico. *J Fungi Basel Vol.* 14. 10(7) <https://doi.org/10.3390/jof10070484>
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). (2022) Análisis de impacto económico ante un posible establecimiento y dispersión del cancro de los cítricos en México en áreas comerciales. Gobierno de México. https://dj.senasica.gob.mx/Contenido/files/2022/agosto/An%C3%A1lisisdeimpactoecon%C3%B3micoanteunposibleestablecimientoydispersi%C3%B3ndelCancrodelosc%C3%ADtricosenM%C3%A9xicoen%C3%A1reascomerciales_107e4f44-49be-4b9a-8058-df20da906b1a.pdf
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) (s.f.) Huanglongbing de los cítricos (HLB). Antecedentes de Plagas cuarentenarias ausentes. <https://www.sag.gob.cl/ambitos-de-accion/huanglongbing-de-los-citricos-hlb>
- Sessa, L., Abreo, E., Lupo, S. (2021) Pseudofusicoccum sp. causing shoot canker in peach in Uruguay. *Australian Plant Disease Notes*. Volume 16. No. 5. <https://doi.org/10.1007/s13314-021-00416-0>
- Shirai, K., Narváez-Zapata, J. (2021) Occurrence and infective potential of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates associated to *Citrus limon* var Eureka. *Biotechnology Reports*. Volume 31. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00651>
- Silveira, G., Melo, M., Teixeira, J., Viana, D., Silva, D., Beserra, E. (2017) First report of *Lasiodiplodia theobromae* and *Pseudofusicoccum stromaticum* causing dieback in *Syzygium malaccense* tree in Brazil. *Forest Pathology*. Volume 48. Issue 2. <https://doi.org/10.1111/efp.12408>
- Singh, B.K., Delgado-Baquerizo, M., Egidi, E., Guirado, E., Leach, J., Hongwei, L., Trivedi, P. (2023) Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nature Reviews Microbiology*. Volume 21. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00900-7>

- Slippers, B., Crous, P., Jami, F., Groenewald, J., Wingfield, M. (2017) Diversity in the botryosphaeriales: lookingback, looking forward. *Fungal Biol.* 121(4):307-321. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.02.002>
- Slippers, N., Wingfield, M. (2007) Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews. Volume 21.* <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Stampella, P., Delucchi, G., Keller, H., Hurrell, J. (2014) Etnobotánica de *Citrus reticulata* (Rutaceae, Aurantioideae) naturalizada en la Argentina. *Bonplandia* 23(2). pp. 151-162. ISSN: 0524-0476.
- Stenberg, J., Sundh, I., Becher, P., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P., Friberg, H., Gil, J., Jensen, D., Jonsson, M., Karlsson, M., Khalil, S., Ninkovic, V., Rehmann, G., Vetukuri, R., Viketoft, M. (2021) When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science. Volume 94.* <https://doi.org/10.1007/s10340-021-01354-7>
- Syngenta, (2017) Switch 62.5 WG. Ficha Técnica. <https://www.syngenta.com.mx/product/crop-protection/fungicida/switchr-625-wg>
- Torres, K. (2023) Hongos asociados a enfermedades de la madera en nogal (*Carya illinoensis*) en el noroeste de México. [Tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada]. Repositorio Institucional de CICESE.
- Trakunyingcharoen, T., Cheewangkoon, R., To-anun, Crous, P., Van Niekerk, J., Lombard, L. (2014) Botryosphaeriaceae associated with diseases of mango (*Mangifera indica*). *Australasian Plant Pathology. Volume 43.* <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0284-9>
- Tyśkiewicz, R.; Nowak, A.; Ozimek, E.; Jaroszuk-Ścisiel, J. (2022) *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences.* 23(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042329>
- Valle, M., Guillén, D., Gijón, R., Alía, I., López, V., Juárez, P., Martínez, V., Juárez, P., Martínez, E., Hernández, M., Ariza, R. (2019) Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México. *Revista biociencias. Volumen 6.* <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e595>
- Vincent, J.M. (1947) Distortion of Fungal Hyphae in the Presence of Certain Inhibitors. *Nature*, 159(850). <https://doi.org/10.1038/159850b0>
- Wagner, D. B., Furniert, G. R., Saghai-marroof, M. A., Williams, S. M., Dancik, B. P., & Allard, R. W., (1987) Chloroplast DNA polymorphisms in lodgepole and jack pines and their hybrids (organelle DNA/paternal inheritance/introgression). *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(7). doi: <https://doi.org/10.1073/pnas.84.7.2097>
- Wang, W., Taylor, A., Tongson, E., Edwards, J., Vaghefi, N., Ades, P., Crous, P., Taylor, P. (2024) Identification and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with twig dieback of citrus in Western Australia. *Plant Pathology. Volume 73, Issue 5.* <https://doi.org/10.1111/ppa.13888>
- White, TJ, Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic: San Diego. pp. 315–322.

- WHO Collaborating Centre for Drug Statistics (WHOC). (2023) Citric acid. ATC/DDD Index 2023. Instituto Noruego de Salud Pública. https://www.whocc.no/atc_ddd_index/
- Yang, T., Groenewald, J., Cheewangkoon, R., Jami, F., Abdollahzadeh, J., Lombard, L., Crous, P. (2017) Families, genera, and species of Botryosphaerales. *Fungal Biology*. Volume 121, Issue 4. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.11.001>
- Yokomi, R., Lastra, R., Stoetzel, M., Damsteegt, V., Lee, R., Garnsey, S., Gottwald, T., Rocha, M., Niblett, C. (1994) Establishment of the brown citrus aphid (Homoptera: Aphididae) in Central America and the Caribbean basin and transmission of Citrus tristeza virus. *Journal of Economic Entomology*, 87(4), 1078-1085. <https://doi.org/10.1093/jee/87.4.1078>
- Zakaria, L. (2023) *Fusarium* Species Associated with Diseases of Major Tropical Fruit Crops. *Horticulturae* 9, no. 3: 322. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030322>
- Zhou, Y., Manawasinghe, I. He, Z., Zhang, W., Liu, M., Song, J., Li, S., Fan, Z., Yan, Z. (2024) Microfungi Associated with Peach Branch Diseases in China. *Journal of Fungi*. Volume 10, No. 3. <https://doi.org/10.3390/jof10030217>

Anexos

Anexo A: Preparación de medio Papa Dextrosa Agar (PDA) casero

Para preparar 1 L:

200 g. de papa (sin cáscara)

20 g. de dextrosa

15 g. de agar

Para preparar el medio Papa Dextrosa Agar casero, se pesaron 200 g. de papa y se colocaron en una olla con agua hirviendo para obtener el caldo de papa. Se filtró el caldo con una tela para evitar trozos restantes de la papa y se reservó en un recipiente. En un frasco de vidrio de 1 L, se colocaron 10 g de dextrosa, 7.5 g de agar y se le añadieron 500 ml del caldo de papa. Los frascos con el medio se pusieron a esterilizar durante 15 minutos y se dejaron enfriar hasta que estuvieran listos para su uso.

Anexo B: Extracción de ADN, método CTAB

De acuerdo con el método de CTAB, primero se adicionaron 400 μ l de Buffer CTAB al 3% (1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl) en un microtubo de 1.5 ml, se adicionaron 0.3 g de micelio previamente macerado con un pistilo de polipropileno estéril y perlas vidrio, y se le agregaron 400 μ l más de Buffer. Se incubaron los tubos a 60 °C por 30 minutos, agitando los tubos por inversión cada 5 minutos.

Después, se agregaron 600 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo, se agitaron vigorosamente y se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 minutos. Se rotularon por muestra, un tubo estéril de 1.5 ml, tomando el sobrenadante y 1 μ l de RNasa a 10 μ g/ μ l, se homogenizaron por inversión 5 veces y se incubaron de 20 minutos a 37 °C. A los tubos se les adicionaron 600 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugaron nuevamente a 13,000 rpm por 10 minutos.

Luego, se obtuvieron los sobrenadantes para colocarlos en tubos de microcentrífuga con columnas limpios y estériles. A estos se les agregó isopropanol (mismo volumen de la fase recuperada) y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 8 minutos y se decantó el isopropanol. Se adicionó 1 ml de etanol al 70% y se centrifugaron los tubos a la misma frecuencia por 1 minuto. Se decantó el etanol y se dejaron secar las pastillas a temperatura ambiente por 5 minutos. Finalmente, la pastilla de cada tubo se disolvió con 30 μ l de agua estéril libre de nucleasas y se procedió a la verificación de la calidad y cantidad del ADN.

Anexo C: Purificación de productos obtenidos de PCR

Se obtuvieron 100 μ l de una mezcla de Buffer PB (47.765 g de clorhidrato de guanidina y 30 ml de isopropanol para 100 ml de Buffer) y del producto obtenido de la PCR de cada muestra (5:1). Se colocaron en microtubos de 2 ml con columna y se centrifugaron a 13,000 rpm por 1 minuto, de estos se descartó el sobrenadante y se les colocaron las columnas QIAquick del kit de regreso.

Para los lavados, se agregaron 650 μ l de Buffer PE (121 ml de Tris-HCl y 80 ml de etanol para 100 ml) a las columnas y se centrifugaron por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y se volvieron a colocar las columnas. Nuevamente se centrifugaron en microtubos de 2 ml por 1 minuto y se les retiró el buffer residual. Se colocaron los productos de las columnas en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml limpios para luego agregarles Buffer EB (10mM Tris-HCl, pH 8.5) en el centro de la membrana y centrifugarlos por 1 minutos. Al final, para aumentar la concentración de ADN, se añadieron 30 μ l del Buffer en el centro de la membrana, se dejaron las columnas por 1 minuto y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 3 minutos.

Anexo D:

Tabla 18. Lista de GenBank y números de acceso de cultivos de Botryosphaeriaceae spp. utilizado en este estudio para el análisis filogenético.

Especies	Aislamiento	Hospedante	Origen	No. de acceso de GenBank	
				ITS	tef-1 α
<i>Barriopsis iraniana</i>	IRAN1448C	<i>Mangifera indica</i>	Irán	FJ919663	FJ919652
<i>B. iraniana</i>	IRAN1449C	<i>Olea</i> sp.	Irán	FJ919665	FJ919654
<i>B. iraniana</i>	MXSCT55-2	<i>Citrus sinensis</i>	México	PQ424006	PQ423127
<i>B. iraniana</i>	MXSCT45-2	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424007	PQ423128
<i>B. tectonae</i>	MFLUCC 12-0381	<i>Tectona grandis</i>	Tailandia	KJ556515	KJ556516
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	CMW8000	<i>Prunus</i> sp.	Suiza	AY236949	AY236898
<i>B. dothidea</i>	CBS110302	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal	AY259092	AY573218
<i>Diplodia mutila</i>	CBS 112553	<i>V. vinifera</i>	Portugal	AY259093	AY573219
<i>D. mutila</i>	CBS230.30	<i>P. dactylifera</i>	EUA	DQ458886	DQ458869
<i>D. seriata</i>	CBS 112555	<i>V. vinifera</i>	Portugal	AY259094	AY573220
<i>D. seriata</i>	CBS119049	<i>Vitis</i> sp.	Italia	DQ458889	DQ458874
<i>Dothiorella acericola</i>	HNXX032	<i>Ziziphus jujuba</i>	China	KY385661	KY393212
<i>Do. acericola</i>	KUMCC 18-0137	<i>Acer</i> sp.	China	MK359449	MK361182
<i>Do. citricola</i>	CBS:130415	<i>Vachellia karroo</i>	Sudáfrica	MT587397	MT592109
<i>Do. citricola</i>	ICMP16828	<i>Citrus sinensis</i>	Nueva Zelanda	EU673323	EU673290
<i>Do. citricola</i>	MXSCT23-2	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424011	PQ423132
<i>Do. magnoliae</i>	CFCC 51563	<i>Magnolia grandiflora</i>	China	KY111247	KY213686
<i>Do. magnoliae</i>	CFCC 51564	<i>Magnolia grandiflora</i>	China	KY111248	KY213687
<i>Do. mangifericola</i>	CBS:124726	<i>Mangifera indica</i>	Irán	MT587407	MT592119
<i>Do. mangifericola</i>	MXSCT21-1	<i>Citrus sinensis</i>	México	PQ424008	PQ423129
<i>Do. mangifericola</i>	MXSCT32-1	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424009	PQ423130
<i>Do. mangifericola</i>	MXSCT40-2	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424010	PQ423131
<i>Do. plurivora</i>	IRAN1557C	<i>Citrus</i> sp.	Irán	KC898225	KC898208
<i>Do. rosulata</i>	CBS 121760	<i>Acacia karroo</i>	Namibia	KF766227	EU101335
<i>Do. viticola</i>	CBS 117009	<i>V. vinifera</i>	España	AY905554	AY905559

<i>Do. viticola</i>	CBS 117008	<i>V. vinifera</i>	España	AY905557	AY905560
<i>Lasiodiplodia brasiliensis</i>	CMM2184	<i>Carica papaya</i>	Brasil	KC484801	KC481531
<i>L. brasiliensis</i>	CMM2185	<i>C. papaya</i>	Brasil	KC484800	KC481530
<i>L. citricola</i>	IRAN1522C	<i>Citrus</i> sp.	Irán	GU945354	GU945340
<i>L. citricola</i>	IRAN1521C	<i>Citrus</i> sp.	Irán	GU945353	GU945339
<i>L. crassispora</i>	WAC12533	<i>Santalum album</i>	Australia	DQ103550	DQ103557
<i>L. crassispora</i>	CBS110492	Unknown	Unknown	EF622086	EF622066
<i>L. exigua</i>	BL104	<i>Retama raetam</i>	Tunisia	KJ638317	KJ638336
<i>L. exigua</i>	BL184	<i>R. raetam</i>	Tunisia	KJ638318	KJ638337
<i>L. gilanensis</i>	IRAN1501C	Unkown	Irán	GU945352	GU945341
<i>L. gilanensis</i>	IRAN1523C	Unkown	Irán	GU945351	GU945342
<i>L. gonubiensis</i>	CMW 14077	<i>Syzygium cordatum</i>	Sudáfrica	AY639595	DQ103566
<i>L. gonubiensis</i>	CMW 14078	<i>Syzygium cordatum</i>	Sudáfrica	AY639594	DQ103565
<i>L. iraniensis</i>	IRAN1502C	<i>Juglans</i> sp.	Irán	GU945347	GU945335
<i>L. iraniensis</i>	IRAN921C	<i>Mangifera indica</i>	Irán	GU945346	GU945334
<i>L. iraniensis</i>	MXSCT07-2	<i>Citrus sinensis</i>	México	PQ423994	PQ423115
<i>L. iraniensis</i>	MXSCT35-1	<i>C. sinensis</i>	México	PQ423995	PQ423116
<i>L. iraniensis</i>	MXSCT41-2	<i>C. sinensis</i>	México	PQ423996	PQ423117
<i>L. iraniensis</i>	MXSCT43-1	<i>C. sinensis</i>	México	PQ423997	PQ423118
<i>L. margaritacea</i>	CBS122519	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	EU144050	EU144065
<i>L. margaritacea</i>	CBS122065	<i>A. gibbosa</i>	Australia	EU144051	EU144066
<i>L. mediterranea</i>	BL101	<i>Vitis vinifera</i>	Italia	KJ638311	KJ638330
<i>L. mediterranea</i>	BL1	<i>Quercus ilex</i>	Italia	KJ638312	KJ638331
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica	EF622077	EF622057
<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS447.62	<i>Citrus aurantium</i>	Surinam	EF622081	EF622060
<i>L. subglobosa</i>	CMM4046	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234560	KF226723
<i>L. subglobosa</i>	CMM3872	<i>Jatropha curcas</i>	Brasil	KF234558	KF226721
<i>L. subglobosa</i>	MXSCT07-1	<i>Citrus sinensis</i>	México	PQ423998	PQ423119
<i>L. subglobosa</i>	MXSCT26-3	<i>C. sinensis</i>	México	PQ423999	PQ423120
<i>L. subglobosa</i>	MXSCT27-2	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424000	PQ423121
<i>L. subglobosa</i>	MXSCT41-1	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424001	PQ423122

<i>L. theobromae</i>	CBS 164.96	<i>Fruit along coral reef</i>	Papúa New Guinea	AY640255	AY640258
<i>L. theobromae</i>	CBS111530	Desconocido	Desconocido	EF622074	EF622054
<i>N. parvum</i>	CMW9081	<i>P. nigra</i>	Nueva Zelanda	AY236943	AY236888
<i>N. parvum</i>	CBS 110301	<i>V. vinifera</i>	Portugal	AY259098	AY573221
<i>Oblongocollomyces variabilis</i>	CBS 121774	<i>Acacia karroo</i>	Namibia	EU101312	EU101357
<i>O. variabilis</i>	CBS 121775	<i>A. karroo</i>	Namibia	EU101314	EU101359
Oblongocollomyces sp.	MXSCT31-1	<i>Citrus sinensis</i>	México	PQ424004	PQ423125
Oblongocollomyces sp.	MXSCT30-3	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424005	PQ423126
<i>Phaeobotryon negundinis</i>	CAA797	<i>Acer negundo</i>	Rusia	KX061513	KX061507
<i>Ph. negundinis</i>	CAA799	<i>Acer negundo</i>	Rusia	KX061515	KX061509
<i>Ph. Rhois</i>	CFCC 89662	<i>Rhus typhina</i> L.	China	KM030584	KM030598
<i>Phaeobotryon</i> sp.	MXSCT04-2	<i>Citrus sinensis</i>	México	PQ424012	PQ423133
<i>Phaeobotryon</i> sp.	MXSCT34-1	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424013	PQ423134
<i>Pseudofusicoccum adansoniae</i>	CBS 122053	<i>Acacia synchronica</i>	Australia	EF585525	EF585569
<i>P. adansoniae</i>	CBS 122055	<i>A. synchronica</i>	Australia	EF585525	EF585569
<i>P. africanum</i>	CMW48035	<i>Mimusops cifra</i>	Sudáfrica	MH270506	MH576590
<i>P. africanum</i>	CMW48030	<i>M. cifra</i>	Sudáfrica	MH558618	MH576593
<i>P. kimberleyense</i>	CBS122058	<i>Adansonia gibbosa</i>	Australia	EU144058	EU144072
<i>P. kimberleyense</i>	CBS122059	<i>Ficus opposita</i>	Australia	EU144059	EU144071
<i>P. stromaticum</i>	CBS138362	<i>Eucalyptus urophylla</i>	América del Sur	KP872348	KP872378
<i>P. stromaticum</i>	CBS117448	<i>Eucalyptus hybrid</i>	Venezuela	AY693974	AY693975
<i>P. stromaticum</i>	CMW13435	<i>E. hybrid</i>	Venezuela	DQ436935	DQ436936
<i>P. stromaticum</i>	MXSCT18-2	<i>Citrus sinensis</i>	México	PQ424002	PQ423123
<i>P. stromaticum</i>	MXSCT18-6	<i>C. sinensis</i>	México	PQ424003	PQ423124
<i>P. violaceum</i>	CBS 115453	<i>Microcos paniculatus</i>	China	MT587548	MT592283
<i>P. violaceum</i>	CBS 115594	<i>M. paniculatus</i>	China	MT587549	MT592284
<i>Sphaeropsis visci</i>	CBS 100163	<i>Viscum album</i>	Luxemburgo	EU673324	EU673292

<i>Aplosporella hesperidica</i>	CBS:732.79	Suelo	Cuba	KX464083	KX464553
--	-------------------	--------------	-------------	-----------------	-----------------

Los aislamientos de este estudio están resaltados en negrita.

Anexo E:

Tabla 19. Cepas fúngicas identificadas por huerta, hospedante de donde se aislaron y los síntomas que se observaron.

Huerta	Hospedante	Síntomas				Especie	Cepa
		C	G	T	H		
1 AD	Naranja	X	X	X		<i>Eutypella microtheca</i>	SCT01-1
2 CC	Naranja	X	X	X		<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT02-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT02-2
						<i>Fusarium incarnatum</i>	SCT02-3
3 HM	Limón	X		X		<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT03-1
4 SH	Naranja	X	X	X	X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT04-1
						<i>Phaeobotryon</i> sp.	SCT04-2
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT04-3
						<i>Alternaria abundans</i>	SCT04-4
5 HE	Naranja	X	X	X	X	<i>Eutypella</i> sp.	SCT05-1
						<i>Fusarium nanum</i>	SCT05-2
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT05-3
						<i>Dothiorella</i> sp.	SCT05-4
6 CM	Naranja	X	X	X		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT06-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT06-2
						<i>Eutypella</i> sp.	SCT06-3
						<i>Ulocladium alternariae</i>	SCT06-4
						<i>Dothiorella</i> sp.	SCT06-5
7 LB	Naranja	X	X	X		<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT07-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT07-2
						<i>Fusarium citri</i>	SCT07-3
						<i>Dothiorella viticola</i>	SCT52-1
8 LE	Toronja	X	X	X		<i>Colletotrichum</i> sp.	SCT08-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT08-2
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT08-3
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT09-3

						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT09-4
9	CR	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT10-1
						<i>Fusarium pernambucanum</i>	SCT10-2
						<i>Eutypella</i> sp.	SCT10-3
10	LM	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT11-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT11-2
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT11-3
11	LG	Mandarina	X		X	<i>Eutypella</i> sp.	SCT13-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT50-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT50-2
12	HC	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT14-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT14-2
13	LC	Naranja	X	X	X	<i>Fusarium incarnatum</i>	SCT15-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT15-2
14	CB	Naranja	X	X	X	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT16-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT16-2
15	SL	Naranja	X	X	X	<i>Eutypella</i> sp.	SCT17-2
16	LP	Naranja Mandarina	X		X	<i>Fusarium nanum</i>	SCT18-1
						<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	SCT18-2
						<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT18-3
						<i>Pseudofusicoccum stromaticum</i>	SCT18-6
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT18-7
						<i>Fusarium</i> sp.	SCT51-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT51-2
						<i>Fusarium incarnatum</i>	SCT51-3
						<i>Fusarium nucidum</i>	SCT51-5
17	PR	Naranja	X		X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT19-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT19-2
18	HH	Naranja	X		X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT20-1

						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT53-2
19	PA	Naranja	X		X	<i>Dothiorella mangifericola</i>	SCT21-1
						<i>Dothiorella sp.</i>	SCT21-2
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT57-1
20	FC	Naranja	X		X	<i>Dothiorella plurivora</i>	SCT22-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT22-2
21	SJ	Naranja	X		X	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT23-1
						<i>Dothiorella citricola</i>	SCT23-2
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT23-3
22	MA	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT24-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT45-1
						<i>Barriopsis iraniana</i>	SCT45-2
						<i>Nigrospora sphaerica</i>	SCT45-3
23	SF	Naranja	X		X	<i>Chaetomium megalocarpum</i>	SCT26-1
						<i>Dothiorella mangifericola</i>	SCT26-2
						<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT26-3
						<i>Dothiorella citricola</i>	SCT26-4
24	LY	Naranja	X		X	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT27-1
						<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT27-2
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT49-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT49-2
25	LU	Naranja	X	X	X	<i>Ulocladium alternariae</i>	SCT28-1
						<i>Preussia minima</i>	SCT28-2
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT28-3
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT28-4
24	LY	Naranja	X	X	X	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT27-1
						<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT27-2
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT49-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT49-2

25	LU	Naranja	X	X	X	<i>Ulocladium alternariae</i>	SCT28-1
						<i>Preussia minima</i>	SCT28-2
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT28-3
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT28-4
26	SR	Naranja	X	X	X	<i>Nigrospora lacticolonia</i>	SCT29-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT29-2
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT29-4
						<i>Diatrype sp.</i>	SCT29-5
27	ST	Naranja	X	X	X	<i>Trichoderma pezizoides</i>	SCT30-1
						<i>Oblongocollomyces sp.</i>	SCT30-3
						<i>Eutypella sp.</i>	SCT30-5
						<i>Eutypella sp.</i>	SCT30-7
28	SM	Naranja	X			<i>Oblongocollomyces sp.</i>	SCT31-1
						<i>Lasiodiplodia sp.</i>	SCT31-2
29	SS	Naranja Toronja	X		X	<i>Dothiorella mangifericola</i>	SCT32-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT32-2
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT42-2
30	ET	Naranja	X		X	<i>Dothiorella sp.</i>	SCT33-1
						<i>Phaeobotryon negundinis</i>	SCT33-2
						<i>Fusarium acuminatum</i>	SCT33-3
31	JO	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT25-1
						<i>Phaeobotryon rhois</i>	SCT34-1
						<i>Spencermartinsia sp.</i>	SCT34-2
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT54-1
32	PA	Naranja	X		X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT35-1
						<i>Fusarium incarnatum</i>	SCT58-1
						<i>Fusarium pernambucanum</i>	SCT58-2
						<i>Fusarium proliferatum</i>	SCT58-3

						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT58-4
33	CO	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT36-2
34	PE	Naranja	X		X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT55-1
						<i>Barriopsis iraniana</i>	SCT55-2
						<i>Dothiorella sp.</i>	SCT55-3
35	CU	Limón	X		X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT38-1
36	CN	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT39-1
						<i>Dothiorella sp.</i>	SCT39-2
37	CG	Naranja	X		X	<i>Phaeobotryon negundinis</i>	SCT40-1
						<i>Dothiorella mangifericola</i>	SCT40-2
						<i>Lasiodiplodia sp.</i>	SCT46-2
						<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	SCT46-3
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT46-4
38	TE	Naranja	X		X	<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT41-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT41-2
39	JL	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT43-1
						<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT43-3
40	LF	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia iraniensis</i>	SCT44-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT44-2
41	LV	Naranja	X	X	X	<i>Lasiodiplodia subglobosa</i>	SCT47-1
						<i>Lasiodiplodia sp.</i>	SCT47-2
						<i>Lasiodiplodia sp.</i>	SCT47-3
42	RO	Naranja	X		X	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT48-1
						<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	SCT48-2

C: cancro, G: gomosis, T: tizón, H: herida.

Anexo F: Distribución por familias de los aislados

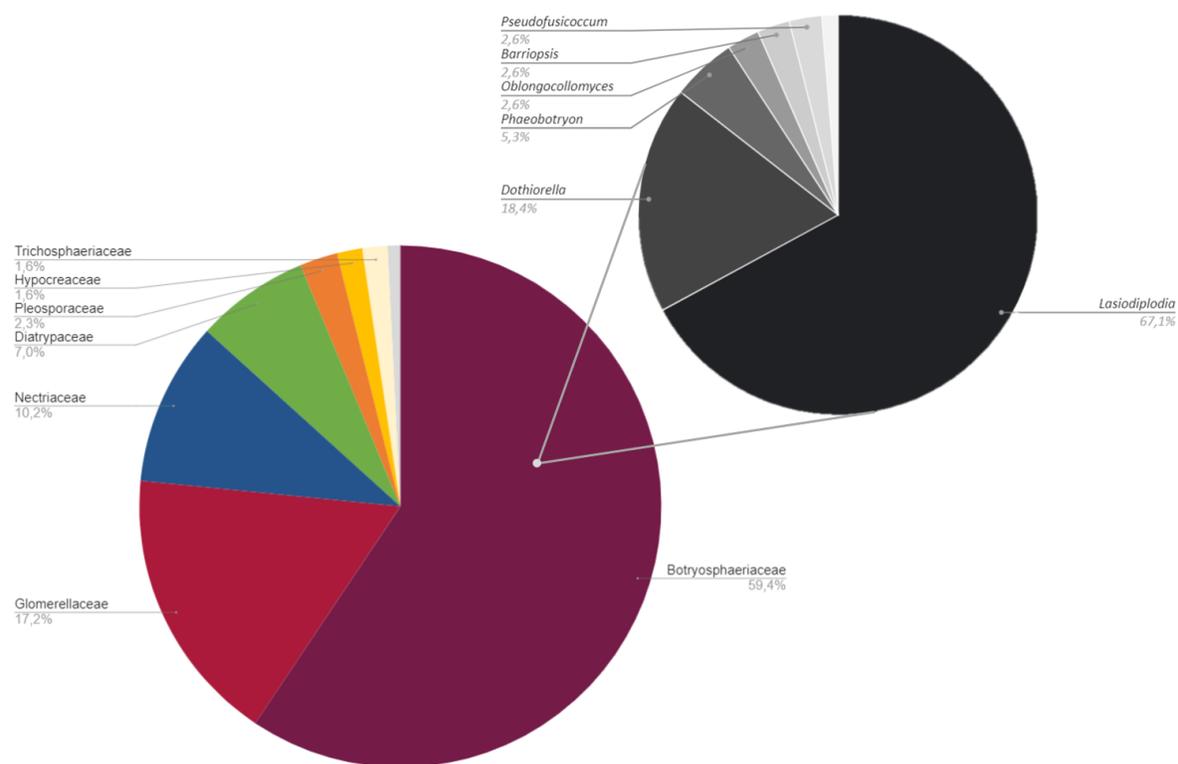


Figura 30. Gráfico circular de la distribución por familia de los aislados y los géneros más prevalentes de la familia Botryosphaeriaceae.