

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

Héctor Flores Hernández¹

Juan Flores Gracia¹

Sostenes Edmundo Varela Fuentes²

Amado Pérez Rodríguez³

Ausencio Azuara Domínguez¹

Abraham Monteon-Ojeda^{3§}

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

§Autor para correspondencia: hfhmex@hotmail.com.

Resumen

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

Palabras clave: análisis genético, hongos, pudrición

Recibido: febrero de 2021

Aceptado: abril de 2021

Introducción

El hongo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. es clasificado dentro de los Ascomycetos, en el orden Botryosphaerales y familia Botryosphaeriaceae (Schoch *et al.*, 2006; Slippers *et al.*, 2013). Es un hongo saprófito, endófito y se considera patógeno latente. No obstante, es patógeno cuando el hospedero está estresado (Rubini *et al.*, 2005; Mohali *et al.*, 2005).

El hongo provoca la muerte regresiva de las ramas, lesiones en los tallos, genera goma y pudriciones de frutos en post cosecha (Sánchez *et al.*, 1989; Herrera *et al.*, 1993). En campo, en el cultivo de naranja valencia y pomelos ruby red, los daños por *L. theobromae* consisten en: defoliación y presencia de goma en las ramas secundarias, necrosis del floema y xilema.

Por otro lado, también, ocasiona daños al cultivo de mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore y Stearn], uva (*Vitis vinifera* L.), aguacate (*Persea americana* Mill), kumquat [*Fortunella margarita* (Lour.) Swingle] y mango (*Mangifera indica* Lin.) (Úrbez y Gubler, 2011). En estos árboles, *L. theobromae* puede presentarse solo o en interacción con *Colletotrichum* sp., *Fomitiporia maxonii* y *Fusarium* sp. Dicha interacción provoca clorosis, necrosis, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momificaciones, agallas, costras y marchitez (Kimati *et al.*, 1995).

También, se ha demostrado la interacción de *L. theobromae* con *Fomitiporia maxonii* Murrill; *Alternaria citri* Ellis y Pierce; *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc; *Fusarium solanii* (Mart.), Appel y Wollen, *Fusarium* sp, *Dothiorella* sp, *Phytophthora* (Oomicetes), *Cephaleuros virescens*, Kunze) y *C. Liberibacter asiaticus* (Cabrera *et al.*, 2012, Cabrera *et al.*, 2017). Por lo anterior, en el presente trabajo se determinó la presencia de *L. theobromae* en árboles de cítricos con deterioro y muerte descendente en la zona centro de Tamaulipas, México en 2017 y 2018.

Materiales y métodos

Área de estudio

El trabajo de investigación fue desarrollado en el 2017 y 2018 en 19 huertos comerciales de cítricos localizados en el municipio de Güémez, Llera de canales, Padilla y Victoria Tamaulipas, México (Cuadro 1).

Cuadro 1. Localización de los sitios donde se realizó el estudio.

Localización		Coordenadas	
Localidad	Huerta	Latitud	Longitud
Güémez	Las Lomas	23.920595	-99.050012
Güémez	Los Cascabeles	23.91841	-99.153615
Güémez	Macabeos III	23.923206	-99.041665
Güémez	Providencia	23.927547	-99.078619
Güémez	Tres Sabinos	23.896745	-99.051205
Llera	Las Angélicas	23.249581	-98.839627

Localización		Coordenadas	
Localidad	Huerta	Latitud	Longitud
Llera	La Cecilia	23.22573	-98.82675
Padilla	San Juan	24.0474	-99.03125
Padilla	El Tejón	24.043433	-98.891232
Padilla	Macarena	24.1013	-99.0193
Padilla	Caluche	24.101393	-99.018491
Victoria	San Francisco	23.928958	-99.232792
Victoria	Real del 14	23.759185	-99.0723
Victoria	El Huichol	23.877121	-99.238929
Victoria	San José	23.903197	-99.163759
Victoria	El 12	23.827501	-99.0822
Victoria	Casa Graciela	23.896745	-99.051205
Victoria	El Encino	23.78424	-99.063962
Victoria	El Anheló	23.773975	-99.07412

Recolección del material vegetal

El material vegetal fue colectado en 27 árboles de limón italiano (*Citrus limon* Burm), 10 de naranja valencia (*Citrus sinensis* L. Osbeck), 1 de toronja doble rojo (*Citrus paradisi* Macfad) y 1 de mandarina (*Citrus reticulata* Blanco). Los árboles presentaban los siguientes síntomas: pudrición del leño, ramas secas, frutos podridos con micelio negro, pudrición y canchales en la corteza de la rama, ramas secas con gomas y hojas con micelio blanco y negro. En cada estructura (leño, rama, fruto y hoja), se recolectaron 200 g de material. Las muestras fueron vertidas en bolsas de polietileno etiquetadas y transportadas al laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del posgrado en biología del Instituto Tecnológico de Victoria, Tamaulipas.

Aislamiento e identificación taxonómica de los hongos fitopatógenos

Se cortaron cinco secciones de tejido de 0.5 cm de cada muestra. Estas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio a 1% por 3 min, lavadas con agua destilada estéril, secadas y sembradas por separado en papa-dextrosa-agar (Cabrera *et al.*, 2012). Los cultivos fueron incubados a 25 °C con luz blanca por 3 días. De los aislamientos obtenidos, se realizaron cultivos monospóricos en agua agar (18 g agar disueltos en un litro de agua destilada). Después, los hongos fueron identificados a nivel de género y especie con base en los caracteres taxonómicos publicados por Punithalingam, (1976); Burgess *et al.* (2006); Barnett y Hunter (2006).

Extracción de ADN y desarrollo de PCR de *L. theobromae*.

El ADN se extrajo con la técnica de Ahrens y Seemüller (1992). En el ADN extraído, se amplificó la región genómica ITS (ITS1, 5.8 S y ITS2) y el gen del factor de elongación alfa (EF-1 α). La región ITS1 fue amplificada con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5') y la ITS2 con los iniciadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (3'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-5') (White

et al., 1990). Mientras que, el EF-1 α fue amplificado con los iniciadores EF1F (5'-TGTTGCTGTTAAGGATTTGAAGCG-3') y EF1R (3'-AACAGTTTGACGCATGTCCCT AAC-5') (Rehner y Buckley, 2005).

La mezcla de PCR para amplificar ambas regiones consistió en: agua ultrapura (13.22 μ l), solución amortiguadora TBE 1X (2.5 μ l), MgCl a 2.5 mM (2.08 μ l), dNTPs a 0.2 mM (2 μ l), iniciadores a 20 μ mol (2 μ l de cada uno), DNA polimerasa (Biogenica[®]) a 1U (0.2 μ l) y 1 ml de ADN (80 ng).

Los parámetros para PCR fueron: 94 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 5 min, 60 °C por 1 min, 72 °C por 15 min y un ciclo final de 72 °C por 5 min. Las regiones amplificadas fueron purificadas con un kit comercial (Promega) y los fragmentos obtenidos fueron enviados a secuenciar a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Análisis genético

Las secuencias obtenidas de la región ITS y del EF-1 α fueron editadas a fin de construir los consensos, alineadas, con el algoritmo Clustal W incluido en el software BioEdit v7.0.9 y comparadas con las secuencias depositadas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las matrices generadas fueron utilizadas para realizar el análisis filogenético con el método del 'vecino más cercano' basado en el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987). Seleccionando las secuencias con mayor similitud e igualdad en el tamaño del fragmento a fin de calcular la distancia evolutiva (Tajima y Nei, 1984) en el software MEGA7 (Kumar *et al.*, 2016).

Resultados

Se determinó la presencia del hongo en los sitios prospectados caracterizando los daños y síntomas en los árboles (Figura 1). Se aislaron 33 cepas de hongos en las 19 huertas comerciales (Cuadro 2). De las cuales, 20 cepas fueron recolectadas en el limón italiano, 11 en naranja valencia, 1 en mandarina y 1 en el cultivo de toronja. En los árboles, 13 cepas fueron recolectadas en el tronco, 13 en las ramas, 3 en frutos, 3 en la raíz y uno en las hojas.



Figura 1. Síntomas de daños en cítricos: gomosis en ramas (a), daño en corteza y leño (b) y (c); pudrición en fruto con crecimiento de micelio (d).

Cuadro 2. Registro de síntomas en los árboles de cítricos muestreados en la zona citrícola de Tamaulipas, México.

Municipio	Huerta	Variedad	Estructura	Síntomas	
Güémez	Las Lomas	Limón I	Rama	Pudrición y ramas secas	
			Rama	Pudrición y ramas secas	
	Tronco		Pudrición del leño y xilema		
	Los Cascabeles	Naranja V	Tronco	Pudrición de corteza y leño	
			Rama	Conidios inmaduros	
			Fruto	Frutos podridos	
		Limón I	Rama	Micelio negro en el xilema	
			Raíz	Raíz seca y podrida	
	Macabeos III		Rama	Pudrición en la rama	
			Raíz	Corteza y xilema dañados	
	Providencia		Tronco	Pudrición en leño	
	Tres Sabinos		Rama	Rama seca	
Llera	Las Angélicas	Naranja V	Tronco	Pudrición del xilema en ramas	
	La Cecilia	Limón I	Rama	Pudrición del xilema y ramas	
Padilla	San Juan	Mandarina	Tronco	Leño seco con afectaciones	
		Naranja V	Tronco	Pudrición del leño	
		Limón I	Rama	ramas secas con goma	
			Rama	Ramas secas con gomas	
		El Tejón	Toronja	Tronco	Daños en la xilema
	Macarena	Naranja V	Tronco	Pudrición y necrosis del leño	
			Fruto	Frutos podridos	
		Caluche		Tronco	Pudrición del xilema y corteza
	Victoria	San Francisco	Naranja	Rama	Ramas secas con goma
				Fruto	Fruto podrido
Real del 14		Limón I		Raíz	Raíces secas
			Tronco	Daños en el leño y xilema	
El Huichol			Tronco	Daños en el xilema y corteza	
			Tronco	Daños en el xilema y leño	
		San José	Naranja V	Rama	Ramas secas
		El 12		Rama	Ramas secas
	Casa Graciela		Rama	Rama seca	
	El Encino	Limón I	Tronco	Xilema dañado	
	El Anheló		Hojas	Hojas con micelio blanco	

Del total de las cepas recolectadas, 26 pertenecieron al género *Lasiodiplodia* sp., 3 de *Botryosphaeria* sp., 1 de *Colletotrichum* sp., 1 de *Cyphellophora* sp., 1 de *Fusarium* sp. y 1 de *Nigrospora* sp.

De las cepas del género *Lasiodiplodia* sp., 17 cepas fueron aisladas del cultivo de limón italiano, 7 en naranja valencia, 1 en mandarina y 1 en toronja. En las estructuras de los árboles, 13 cepas fueron recolectadas en el tronco, 10 en las ramas y 3 en los frutos. Mientras que, las tres cepas del género *Botryosphaeria* sp. fueron recolectadas en las ramas del cultivo de naranja valencia. En contraste, la cepa *Colletotrichum* sp., *Cyphellophora* sp. y *Fusarium* sp., fue recolectada de la raíz de los árboles de limón italiano y la cepa del género *Nigrospora* sp., fue recolectada en la hoja de esta misma especie de cítrico (Cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de los hongos aislados en las estructuras muestreadas del árbol.

Municipio	Huerta	Variedad	Estructura	Hongo
Güémez	Las Lomas	Limón italiano	Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
	Los Cascabeles	Naranja valencia	Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Rama	<i>Botryosphaeria</i> sp.
	Macabeos III	Limón italiano	Fruto	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Raíz	<i>Colletotrichum</i> sp.
			Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Raíz	<i>Cyphellophora</i> sp.
Providencia	Naranja valencia	Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	
		Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	
Llera	Las Angélicas	Naranja valencia	Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
	La Cecilia	Limón italiano	Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
Padilla	San Juan	Mandarina	Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
		Naranja valencia	Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
		Limón italiano	Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
	El Tejón	Toronja	Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
Victoria	Macarena	Naranja valencia	Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
		Limón italiano	Fruto	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
	Caluche	Naranja valencia	Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
Real del 14	Limón italiano	Fruto	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	
		Raíz	<i>Fusarium</i> sp.	
		Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	
El Huichol	Naranja valencia	Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	
		Fruto	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	

Municipio	Huerta	Variedad	Estructura	Hongo
			Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
			Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
	San José	Naranja valencia	Rama	<i>Botryosphaeria</i> sp.
	El 12		Rama	<i>Botryosphaeria</i> sp.
	Casa Graciela		Rama	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
	El Encino	Limón italiano	Tronco	<i>Lasiodiplodia</i> sp.
	El Anheló		Hojas	<i>Nigrospora</i> sp.

Por otro lado, en el caso de las cepas del género *Lasiodiplodia* sp., las colonias en medio de cultivo a los 10 días desarrollaron un micelio algodonoso color blanco y abundante, posteriormente a los 16 días cambió a un tono gris oscuro (Figura 2) a partir de ahí, estas presentaron paráfisis hialinas, picnidios ostiolados solos o agregados en el tejido estromático, conidios inmaduros hialinos, elipsoides, granulados y de base truncada. Asimismo, conidios maduros de color café oscuro, elipsoides, con estrías longitudinales y base truncada (Figura 3).

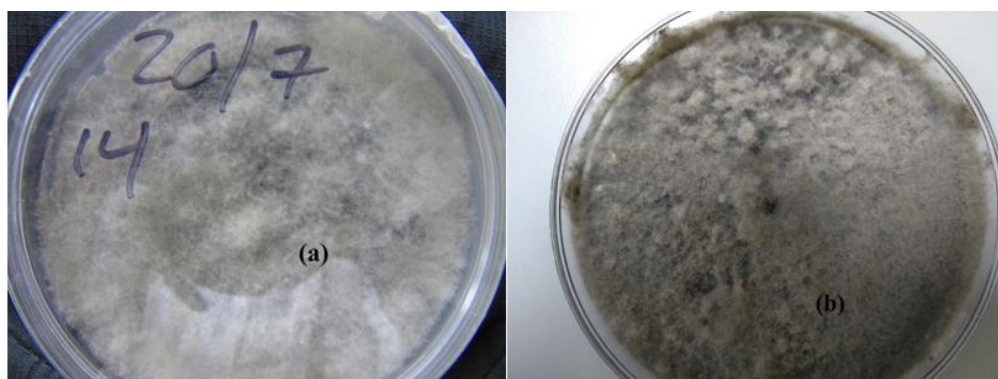


Figura 2. Micelio de *Lasiodiplodia* sp. (a), a los 10 días el color del micelio es blanco y cubre toda la caja, a los 16 días se tornó a un color gris con centro negro (b).

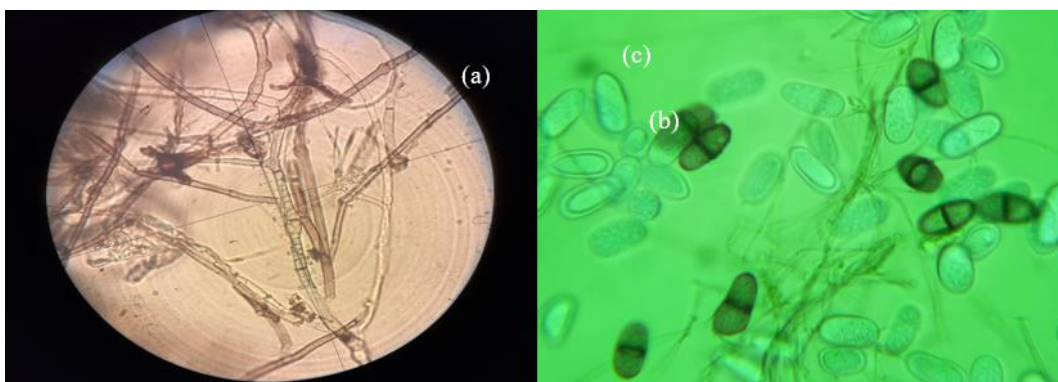


Figura 3. Micelio (a), conidios maduros (b) y jóvenes (c) de *Lasiodiplodia* sp.

Caracterización genética de las cepas aisladas de *L. theobromae*

De las cepas aisladas, se obtuvieron 17 secuencias consenso de 542 pares de bases de la región ITS1/5.8S rDNA/ITS2 y 17 secuencias de 314 pares de bases del factor de elongación EF-1 α . Las diecisiete secuencias de la región ITS1/5.8S rDNA/ITS2 mostraron homología de 100% con la especie *L. theobromae* (HM466958). Estas secuencias no mostraron diferencias genéticas entre sí. Por lo anterior, fueron agrupadas en una sola secuencia consenso. Después, esta secuencia fue registrada en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica con el acceso MK886711.

Por otro lado, las 17 secuencias del factor de elongación EF-1 α no mostraron diferencias genéticas entre sí. Debido a esto, fueron agrupadas en una sola secuencia de consenso. Después, estas fueron comparadas con secuencias de *L. theobromae* descargadas del NCBI. La secuencia mostró homología de 100% con la especie *L. theobromae*. Finalmente, la secuencia analizada fue depositada en el NCBI con el número de acceso MK531139.

La construcción del árbol filogenético permitió agrupar las 17 secuencias ITS encontradas en ocho grupos o clados de acuerdo con la homología en las secuencias (Figura 4). Mientras que en el árbol filogenético de las secuencias TEF1 alfa, se agruparon en tres clados principales (Figura 5). En ambas construcciones se muestran una estrecha relación genética entre los aislados, Aunque las muestras provenían de diferentes municipios y ejido. La historia evolutiva se infirió utilizando el método de unión de vecinos de Neighbor-Joining. El árbol está dibujado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades que las distancias evolutivas para inferir el árbol filogenético.

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

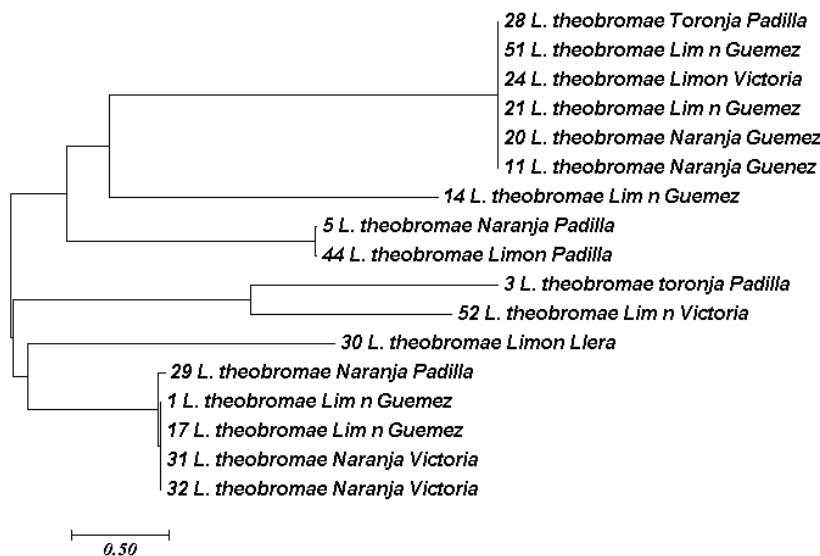


Figura 4. Análisis filogenético generado de las secuencias de la región del ITS ribosomal de las cepas aisladas de *L. theobromae*. El dendrograma se obtuvo a partir del análisis por el método del ‘vecino más cercano’ basado en el método de Neighbor-Joining utilizando el programa Mega 7.

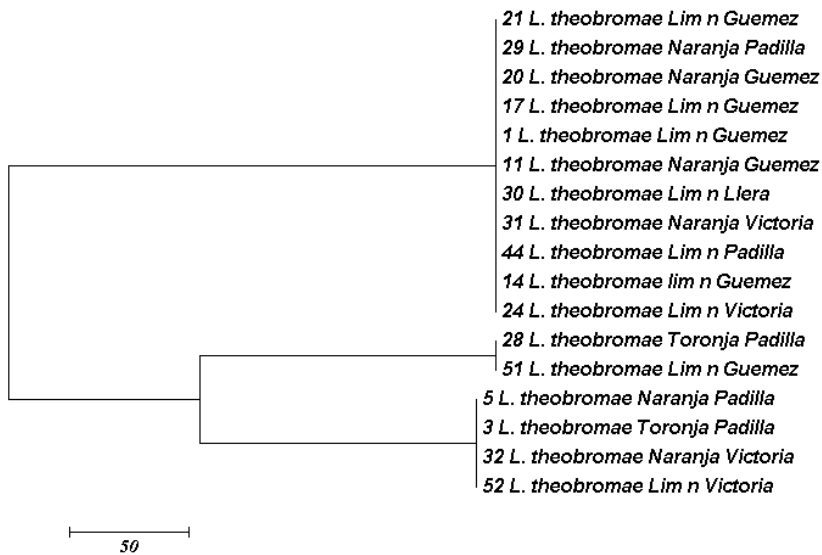


Figura 5. Análisis filogenético generado de las secuencias del factor de elongación EF-1 α del hongo *L. theobromae*. El dendograma se obtuvo a partir del análisis por el método del ‘vecino más cercano’ basado en el método de Neighbor-Joining utilizando el programa Mega 7.

Discusión

En diferentes partes del mundo el hongo *L. theobromae* es reportado en los árboles de cítricos (Al-Sadi *et al.*, 2014; Adesemoye *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2016). En México, *L. theobromae* ha sido reportado causando distintas enfermedades en varios cultivos principalmente frutícolas. En el presente trabajo, el hongo fue aislado del cultivo de naranja valencia, limón italiano, mandarina y toronja en el municipio de Güémez, Llera de Canales, Padilla y Victoria Tamaulipas.

En Llera de Canales, Polanco *et al.* (2019) reportó a este hongo en los árboles de naranja valencia. Mientras que, en el presente trabajo, el hongo fue reportado en el cultivo de limón italiano y naranja valencia en la huerta comercial ‘Las Angélicas’ y ‘La Cecilia’. También estos autores reportaron al hongo en el cultivo de naranja valencia en General Terán y Montemorelos, Nuevo León.

En los sitios donde se ha registrado el hongo, se ha asociado con la muerte regresiva y se ha aislado constantemente de las ramas, corteza, tejido vascular y frutos de las plantas afectadas (Mullen *et al.*, 1991; Moghal *et al.*, 1993; Mohali *et al.*, 2005). Por ejemplo, en Venezuela, *L. theobromae* se aisló de árboles cítricos con síntomas de muerte regresiva y gomosis (Ferrari *et al.*, 1996). En China, *L. theobromae* generó gomosis en plantas de *Jatropha podagrica* (Fu *et al.*, 2007).

Mientras que, en la India este hongo fue el agente causal de la podredumbre en la raíz y de la enfermedad de la podredumbre del collar en *J. curcas* (Latha *et al.*, 2009). En el presente trabajo, en los árboles de ambas especies de cítricos, el hongo fue recolectado en ramas y troncos con pudrición del xilema, en corteza y ramas secas con presencia de goma. Mientras que, Polanco *et al.* (2019) lo reportaron en los árboles con síntomas de muerte regresiva y necrosis en el tronco y ramas. Cedeño y Palacios (1992), mencionan que *L. theobromae* produce gomosis y lesiones en las plantas de cítricos, síntomas parecidos a los observados en el campo.

Del total de las cepas recolectadas, 26 pertenecieron al género *Lasiodiplodia* sp., 3 de *Botryosphaeria* sp., 1 de *Colletotrichum* sp., 1 de *Cyphellophora* sp., 1 de *Fusarium* sp. y 1 de *Nigrospora* sp. De las cepas del género *Lasiodiplodia* sp., 17 cepas fueron aisladas del cultivo de limón italiano, 7 en naranja valencia, 1 en mandarina y 1 en toronja. Cabrera *et al.* (2012) en su estudio describe que las plantaciones de cítricos en estado de estrés y deterioro son importantes fuentes de inóculos de hongos fitopatógenos. Los frutales tropicales son hospedantes de un gran número de estos agentes que causan serios daños en los diferentes órganos de estas plantas, reducen su vida productiva, rendimiento y pueden ocasionar la muerte de estas.

En el caso de la muerte descendente de ramas en cítricos, esta no es una enfermedad exclusiva de este hongo, ya que las especies de *L. theobromae* se presentan de forma conjunta con *N. mangiferum* y *N. parvum* de la familia Botryosphaeriaceae y causan desórdenes de declinación de árboles y pudriciones del pedúnculo del cultivo de mango (Sakalidis *et al.*, 2011).

Además de la interacción con otros hongos fitopatógenos, *L. theobromae* interacciona con el HLB, Cabrera *et al.* (2017) sugiere que *C. liberibacter* puede afectar de alguna manera los mecanismos de resistencia o inmunidad de la planta a determinados patógenos como hongos y algas entre otros, y de ahí, desencadenarse la enfermedad como tal. En tal sentido, los resultados infieren que la bacteria pudiera provocar una inmunodeficiencia en las plantas de cítricos. El grado de incidencia de ramas secas parece estar en función del avance de la enfermedad y el grado de debilitamiento de la planta, principalmente en aquellas que manifiestan los síntomas de HLB.

Se ha demostrado la interacción positiva y el deterioro acelerado hasta su muerte, que sufren los árboles de cítricos cuando son afectadas a la vez por HLB y *L. theobromae*. Se comprobó, mediante ensayos de inoculación de estos hongos en plantas sanas y enfermas con HLB, que las plantas con el hongo y el HLB fueron las más afectadas y exhibían una muerte regresiva más severa (Cabrera *et al.*, 2012). En el presente estudio, *L. theobromae* fue recolectado en árboles con presencia de la bacteria *C. liberibacter asiaticus* en psílicos; esto acelera el deterioro final del árbol enfermo.

Nariani y Singh (1971), atribuyeron a los hongos *C. gloeosporioides*; *L. theobromae* y *Fusarium* sp. el deterioro acelerado y muerte regresiva de las plantas tras la defoliación causada por HLB. En tal sentido se pudiera considerar que estos patógenos, la mayoría presentes en los cítricos, también ejercen un rol importante en la defoliación inicial. Si se toma en consideración que las plantas afectadas por HLB muestran una abscisión de frutos considerable, con una caída prematura de 60% al 70%. Esto permitiría inferir que otros hongos, como los señalados y no solamente la bacteria *C. liberibacter asiaticus*, pudieran ser los máximos responsables de la caída de frutas y de síntomas en plantas con un complejo cuadro patogénico (Gottwald *et al.*, 2012; Cabrera *et al.*, 2017).

Conclusiones

Los resultados de caracterización sintomatológica, morfológica, análisis de secuencias ITS y factor de elongación 1 α , determinaron que *L. theobromae* está presente y se asocia a los síntomas de momificación y pudrición de frutos, gomosis, pudrición y muerte descendente en ramas y árboles de diferentes variedades de cítricos, además se detectó a *C. gloeosporoides*, *C. eucalipti* y *F. keratoplasticum* en raíces podridas de árboles con presencia de *L. theobromae* donde se evidencia una posible asociación con el deterioro de los árboles. Este documento es el primer reporte sobre *L. theobromae* en la región centro de producción cítrica en Tamaulipas.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONACYT por el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo de investigación.

Literatura citada

- Adesemoye, A. O.; Mayorquin, J. S.; Wang, D. H.; Twizeyima, M.; Lynch, S. C. and Eskalen, A. 2014. Identification of species of Botryosphaeriaceae causing bot gummosis in citrus in California. *Plant Dis.* 98(1):55-61.
- Ahrens, U. and Seemüller, E. 1992. Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasmalike organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology.* 82(8):828-832.
- Al-Sadi, A. M.; Al-Ghaithi, A. G.; Al-Fahdi, N. and Al-Yahyai, R. 2014. Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. *Inter. J. Agric. Bioly.* 16(2):371-376.
- Barnett, L. H. and Hunter, B. B. 2006. *Illustrated genera of imperfect fungi.* fourth (Ed). Am. Phytopathol. Soc. St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.
- Burgess, T. I.; Barber, P. A.; Mohali, S.; Pegg, G.; De Beer, W. and Wingfield, M. J. 2006. Three new *Lasiodiplodia* spp. from the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia.* 98(3):423-435.
- Cabrera, R. I.; Betancourt, M.; Ferrer, J.; Hernández, O.; Reyes, N. A.; Piñero, J.; Pérez, V.; Llauger, R. y Herrera, S. 2017. Recuperación de una plantación de naranjo [*Citrus sinensis* (L.) Osb.] cv. 'Valencia Late' con huanglongbing y otras enfermedades. *Rev. Inter. Cítricos.* 435(1):71-81.
- Cabrera, R. I.; Ferrer, J.; Peña I. y Zamora, V. 2012. *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., sintomatología, afectaciones e impacto en la citricultura cubana actual. *Rev. Levante Agríc.* 51(412):254-261.
- Cedeño, L. y Palacios, P. E. 1992. Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causante de lesiones y gomosis en cítricos. *Fitopatol. Venezolana.* 5(1):10-13.
- Ferrari, F. D.; Ochoa, C. F. M. and Subero, M. L. J. 1996. Dieback and gummosis induced by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. on three citrus tree species. *Anales de Botan. Agrícola.* 3(1):46-49.
- Fu, G.; Huang, J. G.; Wei, G. Q.; Yuan, J. G.; Ren, W. H. and Cen, Z. L. 2007. First record of *Jatropha podagrica* gummosis caused by *Botryodiplodia theobromae* in China. *Aust. Plant Dis.* 2(1):75-76.
- Gottwald, T. R.; Graham, J. H.; Irey, M. S.; McCollum, T. G. and Wood, B. W. 2012. Inconsequential effect of nutritional treatment on huanglongbing control, fruit quality, bacterial titer and disease progress. *Cron Protection.* 36(6):73-82.
- Herrera, L.; Grillo, H.; Pulgarón, A.; Ruiz, B. y Santos, G. 1993. La poda de saneamiento en cítricos. *Centro Agrícola.* 20(1):33-44.
- Kimat, H.; Bergamin F. A. y Amorim, L. 1995. *Manual de fitopatología: princípios e conceitos.* Controle químico Editora Agronômica Ceres Ltda. 3^{ra}. Ed. Vol. 1. São Paulo, SP, Brazil. 761-784 p.
- Kumar, S.; Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870-1874.

- Latha, P. V.; Prakasam, A.; Kamalakanna, C.; Gopalakrishnan, T.; Raguchander, M.; Paramathma, and Samiyappan, R. 2009. First report of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. causing root and collar rot disease of physic nut (*Jatropha curcas* L.) in India. *Aust. Plant Dis.* 4 (2):19-21.
- Moghal, S. M.; Shivanathan, P.; Mani, A.; Al-Zidjali, A. D.; Al-Zidjali T. S. and Al-Raeesy, Y. M. 1993. Status of pests and diseases in Oman. Series 1: plant diseases in the Batinah. Muscat: Ministry of agriculture and fisheries. Agricultural Research Center, Rumais First Edition. DGAR, ARC No. 6.
- Mohali, S.; Burgess, T. I. and Wingfield, M. J. 2005. Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathol.* 35(6):385-396.
- Mullen, J. M.; Gilliam, C. H.; Hagan A. K. and Morgan, J. G. 1991. Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. *Plant Dis.* 75(9):886-889.
- Nariani, T. K. and Singh, G. R. 1971. Epidemiological studies on the citrus die- back complex in India. *Proc. Indian Natl. Sci. Acad. Ser.* 37(5):365-371.
- Polanco, L. G.; Alvarado, O. G.; Pérez, O.; González, R. y Olivares, E. 2019. Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 10(4):757-764.
- Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. [Description of pathogenic fungi and bacteria]. Commonwealth Mycological Institute. CAB International CABI Bioscience. No. 52. Bakeham Lane, Egham, Surrey, England. 519 p.
- Rehner, S. A. and Buckley, E. 2005. A *Beauveria* phylogeny inferred from nuclear ITS and EF1- α sequences: evidence for cryptic diversification and links to *Cordyceps* teleomorphs. *Mycologia.* 97(1):84-89.
- Rodríguez, G. E.; Guerrero, P.; Barradas, C.; Crous, P. W. and Alves, A. 2016. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology.* 121(4):1-14.
- Rubini, M. R.; Silva-Ribeiro, R. T.; Pomella, A. W.; Maki, C. S.; Araujo, W. L.; dos Santos, D. R. and Azevedo, J. L. 2005. Diversity of endophytic fungal community of cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosus*, causal agent of Witches' broom disease. *Inter. J. Biol. Sci.* 1(1):24-33.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406-425.
- Sakalidis, M. L.; Ray, J. D.; Lanoiselet, V.; Hardy, G. E. StJ. and Burgess, T. I. 2011. Pathogenic Botryosphaeriaceae associated with *Mangifera indica* in the Kimberley region of western Australia. *Eur. J. Plant Pathol.* 130(7):379-391.
- Sánchez, N.; Zamora, V.; Castellanos, A. y Casín, J. C. 1989. Estudio de hongos encontrados en ramas dañadas por *Elaphidion cayamae* (Coleoptera: Cerambycidae). Aislamiento y comportamiento en cinco medios de cultivo. *Ciencia y Técnica en la Agricultura, Cítricos y otros Frutales.* 12(1):131-139.
- Schoch, C. L.; Shoemaker, R. A.; Seifert, K. A. Hambleton, S.; Spatafora, J. W. and Crous, P. W. 2006. A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia.* 98(6):1041-1052.
- Slippers, B.; Boissin, E.; Phillips, A. J. L.; Groenewald, J. Z.; Lombard, L.; Wingfield, M. J.; Postma, A.; Burgess, T. and Crous, P. W. 2013. Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology.* 76(1):31-49.

- Tajima, F. and Nei, M. 1984. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Biol. Evol.* 1(1):269-285.
- Úrbez, J. R. and Gubler, W. D. 2011. Susceptibility of grapevine pruning wounds to infection by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neofusicoccum parvum*. *Plant Pathol.* 60(2):261-270.