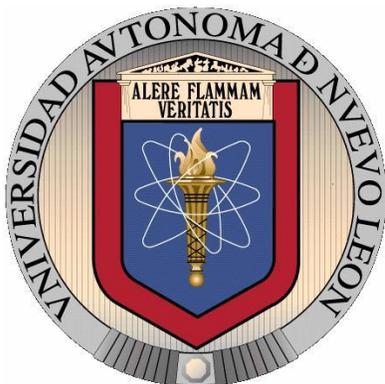


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**HONGOS ASOCIADOS CON LA MUERTE REGRESIVA DE LOS CÍTRICOS EN EL  
NORESTE DE MÉXICO Y ANTAGONISMO CON MICROORGANISMOS NATIVOS**

**POR**

**LAURA GLENYS POLANCO FLORIÁN**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS AGRICOLAS**

**GRAL. ESCOBEDO, N.L. FEBRERO 2019**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**HONGOS ASOCIADOS CON LA MUERTE REGRESIVA DE LOS CÍTRICOS EN EL  
NORESTE DE MÉXICO Y ANTAGONISMO CON MICROORGANISMOS NATIVOS**

**POR**

**LAURA GLENYS POLANCO FLORIÁN**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TITULO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**GRAL. ESCOBEDO, N.L. FEBRERO 2019**

**HONGOS ASOCIADOS CON LA MUERTE REGRESIVA DE LOS CÍTRICOS EN  
EL NORESTE DE MÉXICO Y ANTAGONISMO CON MICROORGANISMOS  
NATIVOS**

POR

LAURA GLENYS POLANCO FLORIÁN

*Como requisito parcial para obtener el grado de*  
**DOCTORA EN CIENCIAS AGRICOLAS**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez**  
Director de Tesis



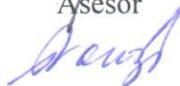
---

**Dra. Orquídea Pérez González**  
Co-directora de Tesis



---

**Dr. Emilio Olivares Sáenz**  
Asesor



---

**Dr. Ramiro González Garza**  
Asesor Externo

---

**Dr. Juan Antonio Vidales Contreras**  
Subdirector de Posgrado e Investigación

## *Dedicatoria*

A mi esposo Fernando y a mis hijos Tyler y Ainoha  
por su incondicional apoyo durante esta etapa de mi vida

## *Agradecimientos*

A Dios, creador y sustentador de todas las cosas, porque me permitió terminar el Doctorado.

Mi más sincero agradecimiento a mi asesor el Dr. Omar Guadalupe Alvarado Gómez, por su gran dedicación, respeto y paciencia, hacia mí persona, y hacia el proyecto. Por ser tan profesional y a la vez un buen amigo cuando se le necesitaba. Por no dejarme sola y ayudarme siempre que se lo solicitaba.

También agradezco a la Dra. Orquídea Pérez González por su gran entusiasmo, disponibilidad y por todo el tiempo dedicado a esta tesis.

Agradezco la cooperación de los Doctores Emilio Olivares Sáenz y Ramiro González Garza por su gran aporte para enriquecer esta investigación.

Quiero agradecer a la Universidad Autónoma de Nuevo León, así como a la Facultad de Agronomía, a sus autoridades y al personal administrativo por todos los bienes proporcionados, así como el apoyo para la realización de esta investigación. A la Lic. Blanca Contreras Cantú por su amabilidad y atentos servicios.

Asimismo, quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado.

Me gustaría agradecer al Instituto Dominicano de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IDIAF) por creer en mí y darme la oportunidad de avanzar un peldaño más en mi preparación profesional.

Al Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF) y al Consejo Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (CONIAF) por su apoyo económico para la terminación de mis estudios.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	vii
ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN GENERAL.....	xi
ABSTRACT.....	xii
<b>CAPÍTULO 1.</b>	
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. IMPORTANCIA DE LA CITRICULTURA EN MÉXICO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS.....</b>	<b>1</b>
<b>1.3.HONGOS FITOPATÓGENOS Y SU IDENTIFICACIÓN.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3.1. La familia Botryosphaeriaceae.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.2. Identificación de hongos por técnicas moleculares.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. CONTROL DE ENFERMEDADES EN PLANTAS.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1. Control químico.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.2. Control biológico.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.2.1. Mecanismos de biocontrol.....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.2.2. Los actinomicetos como antagonistas.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5. PATOGENICIDAD.....</b>	<b>12</b>
<b>1.6. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6.1. Hipótesis general.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6.2. Objetivo general.....</b>	<b>13</b>
<b>1.6.3. Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 2. HONGOS ASOCIADOS CON LA MUERTE REGRESIVA DE LOS CÍTRICOS EN NUEVO LEÓN Y TAMAULIPAS, MÉXICO.....</b>	<b>19</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>19</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>20</b>
<b>2.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>20</b>
<b>2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.1. Muestreo de plantas y aislamiento de hongos.....</b>	<b>22</b>

2.2.2. Identificación morfológica y molecular de hongos.....	23
2.2.3. Evaluación de la patogenicidad de los hongos aislados .....	24
2.2.4. Análisis estadístico.....	25
2.3. RESULTADOS .....	26
2.3.1. Aislamiento, purificación e identificación de hongos .....	26
2.3.2. Prueba de patogenicidad.....	27
2.4. DISCUSIÓN .....	29
2.5. CONCLUSIONES .....	31
2.6. APÉNDICE I.....	31
2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
<b>CAPITULO 3. CONTROL DE <i>Lasiodiplodia theobromae</i> y <i>Fomitopsis meliae</i></b>	
<b>CAUSANTES DE LA MUERTE REGRESIVA DE LOS CÍTRICOS .....</b>	<b>40</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>40</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>41</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
3.2.1. Cepas fúngicas fitopatógenas .....	44
3.2.2. Aislamiento de microorganismos del suelo .....	44
3.2.3. Caracterización morfológica y genética de bacterias y actinomicetos .....	45
3.2.4. Caracterización morfológica y genética de los hongos con actividad antagónica .....	46
3.2.5. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> .....	46
3.2.6. Inhibición de la germinación de conidios y micelio.....	48
3.2.7. Sensibilidad a fungicidas .....	50
3.2.8. Análisis estadístico.....	51
<b>3.3. RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
3.3.1. Caracterización morfológica y genética de los actinomicetos y bacterias bacilares.....	52
3.3.2. Caracterización morfológica y genética de los hongos con actividad antifúngica.....	54
3.3.3. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> .....	55
3.3.4. Inhibición de la germinación de conidios.....	56
3.3.5. Control químico.....	57

<b>3.4. DISCUSIÓN</b> .....	<b>58</b>
<b>3.5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>61</b>
<b>3.6. APÉNDICE II</b> .....	<b>61</b>
<b>3.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación de la prueba de patogenicidad de los hongos aislados.....	25
Cuadro 2. Análisis de varianza de la longitud de las lesiones en tallos en los tratamientos de inoculación con hongos en plantas de naranjo dulce ( <i>C. sinensis</i> ).....	27
Cuadro 3. Comparación de medias de la longitud de las lesiones en tallos en los tratamientos de inoculación con hongos en plantas de naranjo dulce ( <i>C. sinensis</i> ).....	28
Cuadro 4. Relación de lugares de muestreo y tipos de vegetación predominante.....	44
Cuadro 5. Fungicidas probados in vitro contra <i>L. theobromae</i> y <i>F. meliae</i> .....	50
Cuadro 6. Microorganismos aislados de suelo en diferentes zonas del estado de Nuevo León que mostraron actividad antagónica.....	52
Cuadro 7 Inhibición del crecimiento micelial (mm) de <i>L. theobromae</i> y <i>F. meliae</i> in vitro expuestos a tres fungicidas.....	58
Figura 1. Prueba de patogenicidad de hongos causantes de muerte regresiva en naranjo dulce ( <i>C. sinensis</i> L.). A. Inoculación con discos de micelio, B. Síntomas de muerte regresiva, C. Haces vasculares del tallo.....	28
Figura 2. Electroferograma de ADN de un aislamiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> del estado de Nuevo León con el primer ITS-4 .....	31
Figura 3. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> del estado de Nuevo León con el primer ITS-4.....	32
Figura 4. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> de un aislamiento del estado de Nuevo León con secuencias del GenBank.....	32
Figura 5. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> de un aislamiento de Nuevo León con la secuencia de la accesión MK166047.1 del GenBank ...	33

Figura 6. Electroferograma de ADN de un aislamiento de <i>Fomitopsis meliae</i> del estado de Tamaulipas con el primer ITS-1fu.....	33
Figura 7. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de <i>Fomitopsis meliae</i> del estado de Tamaulipas con el primer ITS-1fu.....	34
Figura 8. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Fomitopsis meliae</i> de un aislamiento del estado de Tamaulipas con secuencias del GenBank.....	34
Figura 9. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Fomitopsis meliae</i> de un aislamiento del estado de Tamaulipas con la secuencia de la accesión HQ24822.1 del GenBank .....	35
Figura 10. Electroferograma de ADN de un aislamiento de <i>Eutypella citricola</i> del estado de Tamaulipas con el primer ITS-1fu.....	35
Figura 11. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de <i>Eutypella citricola</i> del estado de Tamaulipas con el primer ITS-1fu.....	36
Figura 12. Similitud de la secuencia de ADN de un aislamiento de <i>Eutypella citricola</i> del estado de Tamaulipas con secuencias del GenBank.....	36
Figura 13. Similitud de la secuencia de ADN de un aislamiento de <i>Eutypella citricola</i> de Tamaulipas con la secuencia de la accesión MG456731.1 del GenBank .....	37
Figura 14. Bacterias aisladas del suelo. A) Cepa A23 mostrando halo de inhibición. B) Cepa A18.....	53
Figura 15. Hongos con actividad antifúngica. A) Colonias de la cepa M1-101 en PDA. B) Bacilos Gram positivos observados al microscopio. C) Cepa M5-102 en PDA. D) Conidióforos y cabeza aspergilar de <i>Aspergillus</i> sp. E) Cepa M104 en DPA. F) Conidióforos, fiálide y conidias de <i>P. citrinum</i> .....	54
Figura 16. Células conidiógenas producidas por <i>L. theobromae</i> . B. Clamidosporas. C. Clamidosporas de <i>F. meliae</i> .....	57
Figura 17. Electroferograma de ADN de un aislamiento de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> del estado de Nuevo León con el primer 8F.....	61
Figura 18. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> del estado de Nuevo León con el primer 8F.....	62

Figura 19. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> de un aislamiento del estado de Nuevo León con secuencias del GenBank.....	62
Figura 20. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Achromobacter xylosoxidans</i> de un aislamiento de Nuevo León con la secuencia de la accesión MK346041.1 del GenBank ...	63
Figura 21. Electroferograma de ADN de un aislamiento de <i>Delftia sp.</i> del estado de Nuevo León con el primer 8F.....	63
Figura 22. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de <i>Delftia sp.</i> del estado de Nuevo León con el primer 8F.....	64
Figura 23. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Delftia sp.</i> de un aislamiento del estado de Nuevo León con secuencias del GenBank.....	64
Figura 24. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Delftia sp.</i> de un aislamiento del estado de Nuevo León con la secuencia de la accesión MF111515.1 del GenBank .....	65
Figura 25. Electroferograma de ADN de un aislamiento de <i>Penicillium citrinum</i> del estado de Nuevo León con el primer ITS-1fu.....	65.
Figura 26. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de <i>Penicillium citrinum</i> del estado de Nuevo León con el primer ITS-1fu.....	66
Figura 27. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Penicillium citrinum</i> de un aislamiento del estado de Nuevo León con secuencias del GenBank.....	66
Figura 28. Similitud de la secuencia de ADN de <i>Penicillium citrinum</i> de un aislamiento de Nuevo León con la secuencia de la accesión MH990629.1 del GenBank .....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
APDLM	Agar papa dextrosa adicionado con extracto de levadura y extracto de malta
ARN	Ácido ribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCV	Citrus Variegated Chlorosis
CEVd	Citrus Exocortis Viroid
CTV	Citrus Tristeza Virus
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfatados
FE	Factor de elongación
HLB	Huanglongbing
HSVd	Hop Stunt Viroid
ITS	Espaciadores Internos Transcritos
Mili-Q	Agua grado biología molecular
msnm	Metros sobre el nivel del mar
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
PDA	Papa dextrosa agar
rpm	Revoluciones por minuto

## RESUMEN GENERAL

El cultivo de cítricos es afectado por varios hongos fitopatógenos, los cuales pueden causar diversas enfermedades y reducir su producción. El hongo *Lasiodiplodia* spp. causa muerte regresiva y necrosis en cítricos y en una amplia gama de cultivos en diversos países, incluyendo México. Los agentes microbianos antagónicos pueden controlar el desarrollo y la propagación de los patógenos mediante diversos mecanismos. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar mediante técnicas tradicionales y moleculares los hongos presentes en árboles de cítricos causando necrosis y muerte regresiva en huertas de Nuevo León y Tamaulipas; así como también aislar y evaluar el antagonismo de microorganismos nativos del suelo contra los hongos fitopatógenos causantes de dicha enfermedad.

Los hongos aislados fueron identificados con base en sus características morfológicas como *Lasiodiplodia theobromae*, *Fomitopsis meliae* y *Eutypella citricola*, los cuales fueron confirmados mediante la secuenciación del ADN de la región ITS y su comparación con secuencias en el GenBank. En el bioensayo de invernadero se comprobó que *L. theobromae* y *F. meliae* causaron marchitez, muerte descendente y lesiones necróticas en las áreas inoculadas a partir del cuarto día posterior a la inoculación. *E. citricola* sólo produjo necrosis alrededor del área inoculada. *F. meliae* + *L. theobromae* causaron daños más severos, provocando lesiones necróticas de 22 a 27 cm de longitud, marchitez y muerte regresiva, y ambos fueron re-aislados a partir de las lesiones producidas. De acuerdo con los resultados obtenidos, los hongos *L. theobromae* y *F. meliae* causan muerte regresiva de los cítricos. Adicionalmente se logró el aislamiento de 15 cepas microbianas con actividad antagónica, y tres de ellas, el actinomiceto M4 R, el hongo M104 (*Penicillium citrinum*) y el actinomiceto M1-101 mostraron porcentajes de inhibición del 84, 85 y 91% respectivamente contra *L. theobromae*. En la prueba de inhibición de la germinación, se observó la producción de clamidosporas como un medio de supervivencia de los patógenos cuando están frente a algún compuesto antifúngico o microorganismo biocontrolador. Los fungicidas dicarboximida, oxiclóruo de cobre + clorhidrato de oxitetraciclina + sulfato de estreptomicina, y clorotalonil + cymoxanil a las concentraciones de 3, 0.6 y 3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente fueron incapaces de reducir el crecimiento de *L. theobromae* en las condiciones evaluadas, sin embargo, el fungicida clorotalonil + cymoxanil logró inhibir el crecimiento de *F. meliae* en un 50%.

## ABSTRACT

Citrus crops are affected by several phytopathogenic fungi, which can cause various diseases and reduce their production. The fungus *Lasiodiplodia* spp. causes dieback and necrosis in citrus and in a wide range of crops in various countries, including Mexico. Antagonistic agents could controlling the development and spread of pathogens by different mechanisms.

The aim of this work was to isolate and identify the fungal species obtained from citrus trees with symptoms of dieback from Nuevo Leon and Tamaulipas groves, and to isolate and evaluate native soil microorganisms with antagonistic capacity against pathogenic fungi causing that disease.

The isolated fungi were identified based on their morphological characteristics such as *Lasiodiplodia theobromae*, *Fomitopsis meliae* and *Eutypella citricola*, confirmed with DNA sequencing of the ITS region when was compared with sequences in GenBank. In the greenhouse bioassay, it was found that *L. theobromae* and *F. meliae* caused symptoms of wilting, descending death and necrotic lesions in the inoculated areas since the fourth day after inoculation. *E. citricola* only produced necrosis around the inoculated area. *F. meliae* + *L. theobromae* caused more severe damage, such as necrotic lesions from 8.66 to 10.63 in. in length, wilting and dieback. Both were re-isolated from the lesions produced. According to the results obtained, the fungi *L. theobromae* and *F. meliae* cause citrus dieback. Additionally, isolation of 15 strains with antagonistic activity was obtained, and among them, three (M4 R actinomycete, M104 *Penicillium citrinum* and M1-101 actinomycete) showed percentages of inhibition of 84, 85 and 91% respectively against *L. theobromae*. In the germination inhibition test, the production of chlamydo spores was observed as a means of survival of the pathogens when they are against an antifungal compound or biocontrol microorganism. The fungicides dicarboximide, cuprum oxichloride + oxitetracycline chlorhidrate + streptomycine sulphate, and cloratolonil + cymoxanil to 3, 0.6 y 3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  concentrations respectively were unable to reduce the growth of *L. theobromae*, however the fungicide chlorothalonil + cymoxanil was able to inhibit *F. meliae* growth by 50%.

## **CAPITULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1. IMPORTANCIA DE LA CITRICULTURA EN MÉXICO**

Los cítricos (*Citrus* spp.) son considerados como la fruta universal ya que están presentes en más de 100 países y son el grupo de frutas más importante económicamente, abarcando el 20% del mercado mundial. Actualmente, la mayor parte de la cosecha de cítricos proviene de 10 países que constituyen el 77% de la producción, donde China y Brasil producen el 42%, y México ocupa la cuarta posición después de los EE.UU. (Lerma *et al.*, 2015).

La citricultura es una actividad de gran importancia dentro de la fruticultura mexicana, donde la superficie supera las 572 mil hectáreas, que producen un promedio anual de 7.8 millones de toneladas de fruta, con un valor estimado de 17,467 millones de pesos, lo que sitúa a México en el cuarto lugar mundial en producción de cítricos. De la superficie establecida, 59% son de naranja, 30% de lima mexicana y lima persa, y el 11% restante son de toronjas, mandarinas, limones y tangerinas (SAGARPA, 2018). Los principales estados productores de cítricos son Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Nuevo León y Michoacán (Varela, 2018).

#### **1.2. ENFERMEDADES DE LOS CÍTRICOS**

Las enfermedades constituyen un factor limitante en la producción de los cítricos en las zonas productoras de México, causadas por alrededor de 50 patógenos que les provocan

síntomas tales como gomosis, antracnosis, agrietamiento de la corteza, caída de frutos, mancha grasienta, roña, muerte de ramas, entre otros (Orozco *et al.*, 2013). Los agentes causales de dichas enfermedades pertenecen a todos los grupos conocidos: bacterias, hongos, virus, viroides, spiroplasmas y fitoplasmas.

El Huanglongbing (HLB), también conocida como enfermedad del brote amarillo es considerada actualmente entre las mas preocupantes en México. Es causada por varias especies de la bacteria *Candidatus Liberibacter* (*Ca. Liberibacter asiaticus*, *Ca. Liberibacter africanus* y *Ca. Liberibacter americanus*), y puede causar una variedad de síntomas incluyendo moteado y descoloración de las hojas, amarillamiento de brotes, caída de hojas, muerte descendente de ramas y caída de frutos (Deng *et al.*, 2012; Palomo *et al.*, 2017). La enfermedad conocida como cancro o cáncer de los cítricos es provocada por la bacteria *Xanthomonas citri*, causa pérdidas económicas debido principalmente por la defoliación, abscisión prematura y manchado de frutos (Delgadillo, 2016). El stubborn es una de las principales enfermedades de las regiones citrícolas con clima caliente y seco, es producida por el mollicute *Spiroplasma citri*. Las plantas se observan achaparradas, con un aspecto arbustivo y compacto, a veces da lugar a la formación de rosetas de hojas en el extremo de los brotes. Las hojas de las plantas afectadas son de tamaño pequeño, acucharadas y pueden presentar moteados con diversas tonalidades desde el verde pálido al verde oscuro (Conciver, 2017). La clorosis variegada de los cítricos es una enfermedad que afecta principalmente al naranjo dulce. Es causada por la bacteria *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. Los síntomas suelen empezar por una clorosis similar a una deficiencia nutrimental por zinc por lo general en las ramas terminales, las hojas presentan lesiones gomosas y clorosis,

hojas pequeñas, marchitez de ramas y disminución del tamaño de los frutos. Esta enfermedad no ha sido detectada en México (SAGARPA, 2013).

La enfermedad exocortis es producida por el viroide del mismo nombre. Entre los síntomas que causa la exocortis se citan la aparición de escamas y grietas verticales en la corteza y peciolo, epinastia en los brotes tiernos y enanismo en variedades susceptibles, sin embargo, en la mayoría de los casos es asintomática dependiendo de la combinación portainjerto/injerto (Bernard *et al.*, 2009). Otra enfermedad de naturaleza viroidal es la cachexia de los cítricos, la cual se caracteriza por la aparición de acanaladuras en la madera, impregnaciones de goma, en situaciones extremas los árboles afectados pueden presentar grietas con goma adheridas (Duran, 2004), pero al igual que la exocortis, los síntomas dependen de la combinación portainjerto/injerto. Una de las enfermedades más devastadora del cultivo de cítricos es ocasionada por el virus de la tristeza de los cítricos. Esta enfermedad ha ocasionado la muerte de millones de árboles de cítricos en el mundo y está considerada como un problema fitosanitario de los cítricos en México, ya que puede causar el colapso de la citricultura como ha ocurrido en otras partes del mundo (Cruz, 2002), lo anterior se debe a que la mayor superficie de la citricultura en el país está injertada sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium*) como portainjerto. La enfermedad conocida comúnmente como pudrición del pie o gomosis, es un problema de importancia en todas las zonas productoras de México. Afecta tanto los cítricos dulces, así como al limón mexicano y Persa. En México se ha reconocido a *Phytophthora parasitica*, como la especie principal que provoca la gomosis de los cítricos, pero hay otras especies que pudieran estar implicadas (Rocha y Padrón, 2009).

### **1.3. HONGOS FITOPATÓGENOS Y SU IDENTIFICACIÓN**

Los hongos constituyen un amplio grupo de organismos eucariotas, de nutrición heterótrofa y que ocupan la mayor parte de los hábitats terrestres. La mayoría de las más de 100,000 especies conocidas de hongos son saprofitas estrictas, es decir, viven sobre una matriz de tejido orgánico muerto al que ayudan a descomponerse. Muchos de ellos son macroscópicos y algunos también comestibles. Aproximadamente el 10% del total de especies de hongos conocidas son capaces de colonizar tejidos vegetales y sólo una fracción menor es capaz de producir enfermedades en las plantas (Schäfer, 1994). Por el contrario, sólo unas 50 especies de hongos son patógenas de humanos y animales, y la mayor parte de ellos causan enfermedades superficiales en la piel.

Todas las plantas son atacadas por varios tipos de hongos. Algunos de los hongos patógenos pueden infectar y causar enfermedad sobre varios tipos de plantas. El efecto nocivo de los hongos se debe a su capacidad para destruir físicamente los tejidos de la planta, alterar la fisiología vegetal reduciendo el crecimiento de toda la planta o de órganos determinados, o producir toxinas que afectan tanto a plantas como animales (Agrios, 2005).

Algunos hongos, conocidos como biotrofos, pueden crecer y multiplicarse manteniéndose durante todo su ciclo de vida en la planta huésped, viviendo y obteniendo nutrientes sin causar la muerte de la planta, pero en algunos casos si causan muerte celular en las células parasitadas y por lo tanto no pueden sobrevivir a expensas del huésped. Otros son necrótrofos, los cuales en una parte de su ciclo vital requieren una planta huésped pudiendo crecer sobre tejido muerto o producir la muerte celular para absorber los nutrientes del tejido muerto. Muchas infecciones empiezan con una fase biotrófica que se convierte más tarde en necrotrófica. Otros hongos son parásitos facultativos, creciendo

tanto libres como asociados a plantas, y otros son parásitos obligados, creciendo sólo si están asociados a plantas.

### **1.3.1. La familia Botryosphaeriaceae**

La familia Botryosphaeraceae fue reconocida por Theissen y Sydow en 1918. Esta familia pertenece al orden de los Ascomycetes y comprende un rango de especies de hongos morfológicamente muy diversos, incluyendo patógenos, endófitos y saprobios (Phillips *et al.*, 2013). En medios de cultivo presentan crecimiento rápido, el micelio se presenta inicialmente de coloración blanquizca y luego se torna marrón-grisáceo y negro (Crous *et al.*, 2006).

Las especies de hongos pertenecientes a esta familia han despertado gran interés debido a su frecuente asociación como causantes de enfermedades en un gran número de especies vegetales leñosas (Phillips *et al.*, 2013), principalmente la muerte regresiva.

En Turquía, la especie *Botryosphaeria obtusa* puede producir muerte regresiva y cáncer especialmente en la base del tallo en huertos de pera, y es considerada una amenaza potencial debido a la severidad de los síntomas que produce (Kubetli y Demirci, 2014).

En Italia, *Neofusicoccum parvum*, *N. vitifusiforme* y otras especies de la familia Botryosphaeriaceae fueron aislados del cultivo de la vid que presentaban síntomas de muerte regresiva (Mondello *et al.*, 2013). En Uruguay, en árboles de *Eucalyptus* spp. fueron identificadas las especies *Botryosphaeria dothidea*, *Neofusicoccum parvum*, *N. ribis*, *N. eucalyptorum*, *N. macroclavatum*, *N. eucalypticola*, *Teratosphaeria africana*, y otras especies, causando canchros en el fuste y habitando como endófitos en las hojas, volviéndose patógenos después de que el árbol ha sufrido algún estrés (Pérez *et al.*, 2008).

En Brasil, *L. subglobosa* fue aislada de árboles de nogal (*Carya illinoensis*). Los síntomas observados inicialmente fueron lesiones pequeñas en el tronco y ramas, llegando a formar canchales y posteriormente la muerte de los árboles (Poletto *et al.*, 2016).

En varias huertas ubicadas en diferentes localidades de Florida, EE.UU., *Botryosphaeria* spp., ha sido aislada y relacionada con los tizones en el tallo, muerte prematura y muerte regresiva de arándano (*Vaccinium corymbosum*) (Wright y Harmon, 2010).

Otro de los géneros de esta familia, *Diplodia* spp. ha sido detectado en pinos (*Pinus resinosa* y *P. banksiana*) ocasionando síntomas como tizones, canchales en los tallos y marchitamiento de copa (Munck y Stanosz, 2009).

La pudrición del pedúnculo y muerte regresiva de ramas fue observada en árboles de mango (*Mangifera indica* L.) en varios estados de México. Los patógenos identificados correspondieron a *L. theobromae* y *Neofusicoccum parvum*, asociados con la pudrición del pedúnculo, y la muerte regresiva correspondió a *L. pseudotheobromae* y *N. parvum* (Sandoval *et al.*, 2013). En Guerrero, México se reportó la especie *L. theobromae* en frutales de zapote mamey (*Pouteria zapota*) ocasionando marchitez, muerte de la yema apical y consecuentemente muerte descendente con secamiento gradual a los 22 días después del injerto (Tovar *et al.*, 2012).

Adicionalmente, en cítricos el hongo *Lasiodyplodia* spp. ha sido reportado como causante de muerte regresiva y otros síntomas (Adesemoye *et al.*, 2014).

### 1.3.2. Identificación de hongos por técnicas moleculares

Las técnicas moleculares han sido utilizadas en los últimos años para clarificar la taxonomía de los géneros, al mismo tiempo son una poderosa herramienta para diferenciar entre especies basados en la amplificación y secuenciación del ADN, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de las secuencias de varias regiones. Una de las aplicaciones de la secuenciación del ADN es proveer a los taxónomos de datos para determinar las relaciones filogenéticas de los hongos, y por este medio muchas de las especies dentro de la familia Botryosphaeriaceae han sido reubicadas taxonómicamente (Phillips *et al.*, 2013). De esta manera, de forma rápida y eficaz se identifican los microorganismos mediante la secuencia de regiones del ADN específicas (Ochoa *et al.*, 2007). Por lo general, la secuencia de los espaciadores transcritos internos (ITS), la  $\beta$ -tubulina y el factor de elongación son las regiones más utilizadas en la identificación de hongos fitopatógenos (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Adesemoye *et al.*, 2014; Rincón *et al.*, 2016).

La identificación y taxonomía de muchas especies de la familia Botryosphaeriaceae que afectan el cultivo de cítricos ha sido muy compleja debido a que el estado sexual de algunos hongos es muy ocasional en la naturaleza. Por consiguiente, su identificación se ha basado en las características morfológicas del estado asexual. En los últimos años, la identificación se ha simplificado gracias a la combinación de los métodos morfológicos y moleculares (Adesemoye *et al.*, 2014). Resulta, por lo tanto, de gran interés la identificación precisa de los hongos fitopatógenos que se presentan en una planta, ya que posibilita el control específico de la especie y evita las posibles consecuencias que potencialmente se pueden presentar.

## 1.4. CONTROL DE ENFERMEDADES EN PLANTAS

### 1.4.1. Control químico

Los hongos comúnmente son controlados mediante la utilización de sustancias químicas para matar o inhibir al patógeno en alguna etapa de la patogénesis (Pitt *et al.*, 2013). La mayoría de estas sustancias son fungistáticos o bacteriostáticos, o sea que no matan, sino que inhiben el desarrollo del microorganismo. Se clasifican de acuerdo con su modo o espectro de acción, y al mismo tiempo influyen otros factores que determinan su eficacia como son el ingrediente activo, la formulación, la dosis y el momento de aplicación (Achicanoy, 2001).

Algunos fungicidas han sido descubiertos después del bioensayo de colecciones de microorganismos con propiedades antibióticas, aunque la mayoría resulta de la síntesis y ensayo de un gran número de compuestos, normalmente relacionados estructuralmente con compuestos ya existentes con propiedades antifúngicas. Unos pocos han sido diseñados para aprovechar las diferencias entre la bioquímica de hongos y otros organismos. La mayoría de los agentes antifúngicos en la actualidad, tienen alta especificidad, ya que interaccionan con un número limitado de componentes o procesos bioquímicos de la célula. Existen compuestos inhibidores de la mitosis (benzimidazoles), de la síntesis de DNA (5-fluorocitosina), RNA (acicilalaninas), ergosterol (imidazoles), quitina (polioxinas y nikomicinas), inhibidores de la respiración (carboxamidas), o los que alteran la membrana plasmática (Odds *et al.*, 2003).

Una de las clases de fungicidas más recientes y significativas son las estrobilurinas, cuyo desarrollo se produce tras el descubrimiento de compuestos antimicrobianos naturales producidos por determinados hongos. A partir de éstos se han generado distintas familias de

derivados sintéticos más eficaces y estables para su aplicación en protección vegetal. En los últimos cinco años las estrobilurinas y entre ellas la azoxystrobina han pasado a tener una posición dominante en el mercado global de fungicidas (Bartlett *et al.*, 2002; Balba, 2007).

#### **1.4.2. Control biológico**

El control biológico de enfermedades puede ser definido como la reducción de la densidad de inóculo de las actividades del patógeno en estado activo o en dormancia por uno o más organismos, que ocurre en forma natural o a través del manejo del medio ambiente, del hospedero o del antagonista (Fischbein, 2012).

El control biológico fue utilizado por algunas culturas como la china en el siglo III, no obstante, es a partir del siglo XIX cuando esta técnica toma auge debido al éxito que obtuvo el depredador *Rodolia cardinalis* (Coleoptera: Coccinellidae) en el control de la cochinilla *Icerya purchasi* (Nicholls, 2008).

En las últimas décadas el control biológico ha sido utilizado como una herramienta eficaz contra muchos microorganismos fitopatógenos que permite proteger los cultivos sin el uso exclusivo de químicos, los cuales traen como consecuencia la resistencia de plagas y enfermedades, la reducción de microorganismos benéficos y la contaminación al ambiente. Los agentes utilizados como biocontrol reducen significativamente las poblaciones de fitopatógenos y con su uso se pretende equilibrar las perturbaciones ecológicas provocadas por los agroquímicos (Badii y Abreu, 2006). El control biológico da respuesta a muchos de los problemas de la agricultura moderna y es uno de los componentes esenciales en el desarrollo de la agricultura sostenible (FAO, 2002).

Otro factor importante que ha estado impulsando el control biológico es la producción de cultivos orgánicos. Continuamente la superficie de terreno destinada al cultivo de productos orgánicos va en aumento en todo el mundo, al mismo tiempo se ha incrementado la demanda de estos productos y han surgido nuevas regulaciones y restricciones en el uso de pesticidas sintéticos (FAO, 2014). El uso de microorganismos benéficos representa una alternativa para el control de enfermedades de plantas para minimizar las constantes aplicaciones de agroquímicos, mejorar la sanidad de los agroecosistemas y al mismo tiempo aprovechar la gran fuente de recursos antimicrobianos presentes en el suelo (Pazos *et al.*, 2016)

**1.4.2.1. Mecanismos de biocontrol.** Las interacciones más estudiadas entre diversos microorganismos afectando un mismo hospedero son las antagonistas, competitiva debido a la producción de toxinas por parte de uno de ellos (Carisse *et al.*, 2001), la competencia por nutrientes y espacio (Mutawila *et al.*, 2011), inhibición del crecimiento micelial y micoparasitismo (Cheng *et al.*, 2012).

El micoparasitismo ocurre cuando el antagonista se adhiere a las hifas y conidios del patógeno, penetra y multiplica en su interior y finalmente se libera a través de las células de las hifas moribundas del patógeno, involucrando un complejo de estrategias como la producción y difusión de metabolitos antifúngicos (Askary *et al.*, 1997). Uno de los hongos más conocido capaz de producir parasitismo es *Trichoderma* spp. Este hongo tiene la capacidad de producir micoparasitismo en *Lasiodiplodia* mediante el enrollamiento de este sobre el patógeno, causando malformaciones y lisis (Morales *et al.*, 2013).

El mecanismo de biocontrol de fitopatógenos mediante la competencia por nutrientes ocurre cuando el antagonista crece más rápido que el patógeno y sobrevive bajo ciertas condiciones desfavorables para el desarrollo de la enfermedad sin ser afectado (Abano y Sam, 2012). Algunas especies de antagonistas poseen una habilidad innata para esporular bajo condiciones limitadas de nutrientes, lo que les confiere ventajas sobre los patógenos (Mehl y Cotty 2013).

**1.4.2.2. Los actinomicetos como antagonistas.** Históricamente, los actinomicetos fueron clasificados dentro del filum de los hongos, debido a que comparten características similares con este grupo por la similitud en su forma de crecer y desarrollarse en medio de cultivo, formación de hifas, algunos desarrollan micelio aéreo y esporas, sin embargo, los actinomicetos son bacterias (Quiñones *et al.*, 2016).

Los actinomicetos se encuentran en suelos fértiles, representando alrededor del 64% de la población microbiana, siendo sus principales actividades las de fijar nitrógeno, promover el crecimiento de las plantas, solubilizar fosfatos, degradar la materia orgánica y producir una serie de compuestos antimicrobianos, terpenoides, pigmentos y enzimas extracelulares (Ezziyyani *et al.*, 2004). Algunos factores pueden influir en la distribución y actividad de los actinomicetos en el suelo, tales como el tipo de suelo, el pH y la temperatura. Generalmente son aerobios, y se encuentran en suelos con buen drenaje que permiten un adecuado intercambio gaseoso. Otros son micro aerófilos y toleran bajas presiones de oxígeno (Koneman, 2001).

Los actinomicetos juegan un papel muy importante como biocontroladores por su prolífica producción de antibióticos y antifúngicos naturales. Adicionalmente, producen un amplio rango de metabolitos secundarios que son conocidos por tener actividades anticancerígenas, antialgal, antimalaria, antiinflamatorias, entre otras (Ravikumar *et al.*, 2011). Adicionalmente, los actinomicetos producen compuestos bioactivos que ejercen acción directa o indirectamente como biocontroladores de un gran número de fitopatógenos que causan enfermedades de importancia agrícola (Dávila *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015).

### **1.5. PATOGENICIDAD**

La patogenicidad de *Lasiodiplodia* spp. ha sido objeto de estudio en diferentes cultivos. Al-Sadi *et al.* (2014) aislaron a *L. theobromae* a partir de árboles de lima ácida o limón mexicano (*Citrus aurantifolia* S.), lo inocularon y produjo síntomas de muerte regresiva en 40% de las plantas inoculadas de las cuales fue re-aislado posteriormente. De la misma manera Cedeños y Palacios (1992), demostraron mediante los postulados de Koch que *L. theobromae* (anteriormente llamada *Botryodiplodia theobromae*), produjo gomosis y lesiones en las plantas de cítricos inoculadas, parecidas a las observadas en el campo. Al mismo tiempo, las características morfológicas y las dimensiones de los conidios re-aislados, permitieron asociar a *L. theobromae* como el causante de la enfermedad. En plantas de vid (*Vitis vinífera*) inoculadas con *L. mediterránea*, se ha podido observar necrosis y decoloración de la corteza y tejidos vasculares semejantes a las producidas en campo (Linaldeddu *et al.*, 2014).

Algunos cultivos comúnmente pueden ser infectados por más de un fitopatógeno al mismo tiempo o por un complejo de especies de una misma familia (McDonald y Eskalen

2011). Tal es el caso de *Lasiodiplodia* spp., el cual ha sido aislado de árboles de cítricos con síntomas de cancrrosis, gomosis y muerte regresiva en conjunto con *Alternaria* sp., *Phomopsis* sp. y *Cladosporium* sp. (Adesemoye *et al.*, 2014).

## **1.6. HIPÓTESIS Y OBJETIVO GENERAL**

### **1.6.1. Hipótesis General**

- a) Hongos de la familia Botryosphaeriaceae se encuentran causando muerte regresiva en frutales, por lo tanto, especies de esta familia son los responsables de dicha enfermedad y están provocando síntomas similares en huertas de cítricos en el noreste de México.
- b) En los suelos de Nuevo León existen microorganismos benéficos con capacidad de inhibir a los hongos causante de muerte regresiva de los cítricos.

### **1.6.2. Objetivo General**

Aislar e identificar mediante técnicas tradicionales y moleculares los hongos presentes en árboles de cítricos causando necrosis y muerte regresiva en huertas de Nuevo León y Tamaulipas; y aislar y evaluar el antagonismo de microorganismos nativos contra los hongos fitopatógenos causantes de dicha enfermedad.

### **1.6.3. Objetivos Específicos**

- a) Aislar e identificar los hongos causantes de la muerte regresiva de los cítricos en huertas de Nuevo León y Tamaulipas, y evaluar su patogenicidad.

- b) Aislar microorganismos de suelo con potencial antagonico y evaluar su actividad frente a fitopatógenos que afectan el cultivo de cítricos.
- c) Evaluar *in vitro* tres fungicidas comerciales a diferentes concentraciones contra hongos patógenos de cítricos.

## 1.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abano, E.E. and Sam-Amoah, L.K. 2012. Application of antagonistic microorganisms for the control of postharvest decays in fruits and vegetables. *I.J.A.B.R* 2:1-8.
- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi, G.E., Zare, R., Phollips, A.J.L. 2010. Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Persoonia* 25: 1–10.
- Achicanoy, L.H. 2001. Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín*. 54: 1251-1273.
- 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 Disease* 98: 55 – 61.
- Agrios, G. 2005. *Plant Pathology*. 5th edition. Elsevier Academic Press, Nueva York. 922 p.
- 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. *Int. J. Agric. Biol.* 16: 371-376.
- Askari, H., Benhamou, N., and Brodeur, J. 1997. Ultrastructural and cytochemical investigations of the antagonistic effect of *Verticillium lecanii* on cucumber powdery mildew. *Phytopathology* 87:359-368.
- Badii, M.H. y Abreu, J.L. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience* 1: 82-89.
- Balba, H. 2007. Review of strobilurin fungicide chemicals. *J. Environ. Sci. Health* 42: 441-451.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. 2002. The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58: 649-662.

- Bernard L, Duran V.N. and Elena S.F. 2009. Effect of citrus hosts on the generation, maintenance and evolutionary fate of genetic variability of citrus exocortis viroid. *Journal of General Virology* 90: 2040–2049.
- Carisse, O., El Bassam, S., and Benhamou, N. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. strain P130A on germination and production of sclerotia of *Rhizoctonia solani* and interaction between the antagonism and the pathogen. *Phytopathology* 91:782-791.
- Cedeño, L. y Palacios, P.E. 1992. Identificación de *Botryodiplodia theobromae* como la causante de lesiones y gomosis en cítricos. *Fitopatología Venezolana* 5: 10-13.
- Consejo Estatal Citrícola de Veracruz. Principales enfermedades bacterianas de los cítricos. Fecha de consulta: 04/01/ 2019 <http://www.concitver.com>.
- Cheng, C.H., Yang, C.A., and Peng, K.C. 2012. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 on *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology* 102: 1054-1063.
- Crous, P.W., Slippers, B., Wingfield, M.J., Rheeder, J., Marasas, W.F., Philips, A.J.L., Alves, A., Burgess, T., Barber, P., Groenewald, J.Z. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology* 55:235-253.
- Cruz, F.M. 2002. El virus de la tristeza de los cítricos (VTC) en la Huasteca Potosina. SAGARPA-INIFAP. Desplegable Técnica No. 2.
- Dávila, M.M.D., Gallegos, M.G., Hernández, C.D., Ochoa, F.Y.M. y Flores, O.A. 2013. Actinomicetos antagónicos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4: 1187-1196.
- Delgadillo, V.I. 2016. Cancro de los cítricos. *Xanthomonas citri*. SAGARPA-SENASICA. Ficha Técnica No. 33.
- Deng, X., Gao, Y., Chen, J., Pu, X., Kong, W., and Li, H. 2012. Current situation of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in Guangdong, China, where citrus Huanglongbing was first described. *Journal of Integrative Agriculture* 11: 424-429.
- Durán, V.N. 2004. Enfermedades de cítricos causadas por viroides: exocortis y caquexia. *Vida Rural* 1: 52-55.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Requena, M., Rubio, L. y Candela, M. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei-ziyani*, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. *Anales de Biología* 26: 69-78.
- Fischbein, D. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. Serie Técnica: Manejo Integrado de Plagas Forestales 15: 1851-4103.

- Koneman, E.W. 2001. Diagnóstico Microbiológico: Texto y Atlas a Color. Quinta Edición. Medica Panamericana, Buenos Aires, Argentina 82 pp.
- Kubetli, I. and Demirci, F. 2014. Outbreak of stem canker and dieback of pear trees caused by *Botryosphaeria obtusa* (anamorph *Diplodia seriata*) in Turkey. New Disease Reports 30: 6.
- Lerma, C.J., Ibarra, T.A., Galván, G.V., Martínez, D.J., Rodríguez, R.G., Tellez, G.V., Fernández, S.C., Núñez, G.M., Galicia, C.J. 2015. Situación de la citricultura en Nuevo León. Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León. OEIDRUS, N.L. Washington 2000, 82 p.
- Linaldeddu, B.T., Deidda, A., Scanu, B., Franceschini, A., Serra, S., Berraf-Tebbal, A., Zouaoui, B.M., Ben Jamaa, M.L., and Phillips, A.J.L. 2014. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterránea* sp. nov. Fungal Diversity 71: 201-214.
- McDonald, V. and Eskalen, A. 2011. Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California. Plant Disease 95: 1465-1473.
- Mehl, H.L. and Cotty, P.J. 2013. Nutrient environments influence competition among *Aspergillus flavus* genotypes. Applied and Environmental Microbiology 79: 1473-1480.
- Mondello, V., Lo Piccolo, S., Conigliaro, G., Alfonzo, A., Torta, L., and Burruano, S. 2013. First report of *Neofusicoccum vitifusiforme* and presence of other Botryosphaeriaceae species associated with *Botryosphaeria* dieback of grapevine in Sicily, Italy. Phytopathologia Mediterranea 52: 388-396.
- Morales, S.F.J., Valenzuela, S.C. y Hernández, M. R. 2013. Biocontrol de enfermedades de la madera de vid usando *Trichoderma* spp. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California. INIFAP. Campo Experimental Valle de Mexicali. 1ª Ed. 15 p.
- Mullis, K.B. 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scientific American. April 56-65.
- Munck, I.A. and Stanosz, G.R. 2009. Quantification of conidia of *Diplodia* spp. extracted from red and Jack pine cones. Plant Disease 93: 81-86.
- Mutawila, C., Fourie, P.H., Halleen, F., and Mosteri, L. 2011. Grapevine cultivar variation to prunnin wound protection by *Trichoderma* species against trunk pathogens. Phytopathologia Mediterranea 50: 274-276.

- Nicholls, E.C.I. 2008. Control Biológico de Insectos: Un Enfoque Agroecológico.. Editorial Universidad de Antioquia. 1ª Ed. Colombia. 294 p.
- Ochoa, J.L, Hernández, M.L.G., Latisnere, B.H., Leon, L.J.L. y Larralde, C.C.P. 2007. Aislamiento e identificación de hongos patógenos de naranja *Citrus sinensis* L. Osbeck cultivada en Baja California Sur, México. Ciencia Tecnol. Aliment. 5: 352-359.
- Odds, F.C., Brown, A.J.P., and Gow, N.A.R. 2003. Antifungal agents: mechanisms of action. Trends Microbiol. 11: 272-279.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) 2002. World Agriculture: Towards 2015-2030. Summary Report. 106 p.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) 2014. Anuario Estadístico. La alimentación y la agricultura en América Latina y el Caribe. [www.fao.org/publications](http://www.fao.org/publications) Fecha de consulta 13/05/17.
- Orozco, S.M., Robles, G.M., Velázquez, M.J.J., Manzanilla, R.M.A., Hernández, F.L.M., Manzo, S.G. y Nieto, A.D. 2013. Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades en limón mexicano y limón persa. Memorias IX Simposio Internacional Citrícola 113-171.
- Pazos, R.L.A., Marín, C.V., Morales, G.Y., Báez, A., Villalobos, L.M., Pérez, S.M. y Muñoz, R.J. 2016. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. Revista Iberoamericana de Ciencias 3:72-85.
- Pérez, C.A., Altier, N., Simeto, S., Wingfield, M.J., Slippers, B., and Blanchette, R.A. 2008. Botryosphaeriaceae from Eucalyptus and native Myrtaceae in Uruguay. Agrociencia 12:19-30.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., and Crous, P.W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. Studies in Micology 76: 51-167.
- Pitt, W.M., Huang, R., Stell, C.C., and Savocchia S. 2013. Pathogenicity and epidemiology of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevines in Australia. Australasian Plant Pathology 42: 573-582.
- Poletto, T., Gonzatto Maciel, C., Muñoz, M., Blume, E., Polettoand, I., and Bioso, P. 2016. First report of stem canker caused by *Lasidiopodia subglobosa* on *Carya illinoensis* in Brazil. Plant Disease 100:1016.
- Quiñones, A.E.E., Evangelista, M.Z. y Rincón, E.G. 2016. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. Elementos 101: 59-64.

- Ravikumar, S., Inbaneson, S.J., Uthiraselvam, M., Priya, S.R., and Ramu, A. 2011. Diversity of endophytic actinomycetes from Karangkadu mangrove ecosystem and its antibacterial potential against bacterial pathogens. *Journal of Pharmacy Research* 4: 294-296.
- Rincón, L.D.F., Barboza, C.J.E, Salcedo, H.R., Abraham, J.R., Valadez, L.J.A., Quistian, M.D., y De la Fuente, S.N.M. 2016. Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (ITS y FE-1 $\alpha$ ) y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1: 417-422.
- Rocha, P.M.A. y Padrón, C.J.E. 2009. El cultivo de cítricos en el estado de Nuevo León. INIFAP. Libro Científico No. 1 485 p.
- Sandoval, S.M., Nieto, A.D., Sandoval, I.S., Téliz, O.D., Orozco, S.M. y Silva, R.H.V. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-73.
- Schäfer, W. 1994. Molecular mechanisms of fungal pathogenicity to plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 461-477.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. 2013. Clorosis variegada de los cítricos. *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca*. Ficha Técnica No. 34. <http://www.sagarpa.com.mx>
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2018. Diario Oficial. <http://www.sagarpa.com.mx>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) 2014. Fecha de consulta: 02/05/2017.
- Tovar, P.J., Mora, A.J.A., Nava, D.C., Téliz, O.D., Valdovinos, P.G., Villegas, M.A., and Hernández, M.J. 2012. Identificación, patogenicidad e histopatología de *Lasiodiplodia theobromae* en injertos de Zapote Mamey en Guerrero, México. *Agrociencia* 46: 147 – 161.
- Varela, G.F. 2018. Importancia y distribución de los cítricos. *TecnoAgro* No. 124: 1-3.
- Wang, L., Xing, M., Di, R., and Luo, Y. 2015. Identification and antifungal activities of *Streptomyces aureovercillatus* HN6. *J. Plant Pathol Microb.* 6: 281.
- Wright, A., and Harmon, P.F. 2010. Identification of species in the Botryosphaeriaceae family causing stem blight on southern highbush blueberry in Florida. *Plant Disease* 94:966-971.

## CAPÍTULO 2

### HONGOS ASOCIADOS CON LA MUERTE REGRESIVA DE LOS CÍTRICOS EN NUEVO LEÓN Y TAMAULIPAS, MÉXICO

Aceptado para su publicación en la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas

#### RESUMEN

El cultivo de cítricos es afectado por varios hongos fitopatógenos, los cuales pueden causar enfermedades y reducir su producción. El hongo *Lasiodiplodia* spp. causa muerte regresiva y otros síntomas en cítricos y en otros cultivos en diversos países, incluyendo México. El objetivo de este trabajo fue identificar cepas fúngicas aisladas de árboles de cítricos con síntomas de muerte regresiva y evaluar su patogenicidad bajo condiciones de invernadero. Los hongos aislados fueron identificados con base en sus características morfológicas como *Lasiodiplodia theobromae*, *Fomitopsis meliae* y *Eutypella citricola*, confirmados con la amplificación por PCR y secuenciación de la región ITS al comparar con las secuencias del GenBank. En el bioensayo de invernadero se comprobó que *L. theobromae* y *F. meliae* provocan síntomas de marchitez, muerte descendente y lesiones necróticas en las áreas inoculadas a partir del cuarto día posterior a la inoculación en plantas de naranjo dulce variedad Valencia. *F. meliae* + *L. theobromae* causaron daños más severos, provocando lesiones necróticas de 22 a 27 cm de longitud, marchitez y muerte regresiva, y ambos fueron re-aislados a partir de las lesiones producidas. *E. citricola* sólo produjo necrosis alrededor del área inoculada. De acuerdo con los resultados de la prueba de patogenicidad, los hongos *L. theobromae* y *F. meliae* causan muerte regresiva de los cítricos.

**Palabras clave:** hongos fitopatógenos, *Lasiodiplodia*, patogenicidad

## SUMMARY

Citrus trees are affected by pathogen fungi, which could produce diseases and reduce their yield. *Lasiodiplodia* spp. cause citrus death and other symptoms in citrus plants and other species worldwide, including Mexico. The objective of this work was to identify fungi isolated from trees with citrus death symptoms and to evaluate their pathogenicity under greenhouse conditions. Isolated fungi were identified based on morphological and molecular characteristics as *Lasiodiplodia theobromae*, *Fomitopsis meliae* and *Eutypella citricola*, confirmed by DNA sequencing of the ITS region. In greenhouse bioassay we corroborated that *L. theobromae* and *F. meliae* cause wilting symptoms, falling death and necrotic lesions in the inoculated areas since the fourth day after inoculation in Valencia sweet orange plants. *F. meliae* + *L. theobromae* caused more severe injury producing necrotic lesions from 8.66 to 10.63 in. in length, wilting, and falling death, and both were re-isolated from the lesions. *E. citricola* only produced necrosis around inoculated area. According with these results of pathogenicity test, *L. theobromae* and *F. meliae* produce citrus death.

**Key words:** Plant pathogens, *Lasiodiplodia*, pathogenicity

## 2.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de cítricos es afectado por varios hongos fitopatógenos, los cuales pueden causar diversas enfermedades y reducen su producción. Estos patógenos causan lesiones en las hojas, canchales, necrosis, pudriciones de raíces, pedúnculos y frutos, marchitez, muerte de ramas y muerte regresiva (McBride *et al.*, 2010; Adesemoye *et al.*, 2014). El hongo *Lasiodiplodia* spp., ha sido reportado como causante de muerte regresiva y otros síntomas

en cítricos y en una amplia gama de cultivos (Adesemoye *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2016).

En México, la pudrición del pedúnculo y muerte regresiva de ramas fue observada en árboles de mango (*Mangifera indica* L.) en los estados de Guerrero y Michoacán. Los patógenos identificados fueron *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *Neofusicoccum parvum* (Sandoval *et al.*, 2013). En Guerrero, se reportó la especie *L. theobromae* en árboles de zapote mamey (*Pouteria zapota* [Jacq] H. E. Moore and Stearn) ocasionando marchitez, muerte de la yema apical y consecuentemente muerte descendente con secamiento gradual a los 22 días después del injerto (Tovar *et al.*, 2013). En Nayarit, la muerte regresiva ha sido observada en huertos de guanábano, iniciando en las ramas, las cuales continuaban secándose desde la punta hacia la base, y se pudo identificar a *L. theobromae* como el agente causal (Hernández *et al.*, 2013).

La patogenicidad de *Lasiodiplodia* spp. ha sido objeto de estudio en diferentes cultivos. Al-Sadi *et al.* (2014) aislaron a *L. theobromae* a partir de árboles de lima ácida (*Citrus aurantifolia*), inocularon al hongo y produjeron síntomas de muerte regresiva en el 40% de las plantas inoculadas de las cuales fue re-aislado posteriormente. De la misma manera Cedeño y Palacios (1992), demostraron mediante los postulados de Koch que *L. theobromae* produjo gomosis y lesiones en las plantas de cítricos inoculadas, síntomas parecidos a los observados en el campo. Al mismo tiempo, las características morfológicas y las dimensiones de los conidios re-aislados, permitieron asociar a *L. theobromae* como el causante de la enfermedad.

A principios del año 2015, citricultores del estado de Sinaloa reportaron la muerte regresiva de árboles en limón persa (*Citrus latifolia* Tan). En ese mismo año, productores

de Nuevo León reportaron la muerte de ramas en dirección descendente al tronco principal en limón persa y naranja dulce (*Citrus sinensis* [L.] Osbeck) variedad Valencia injertada sobre naranjo agrio (*Citrus aurantium* L.); posteriormente, también se observaron síntomas similares en huertas de cítricos en el estado de Tamaulipas (Dr. R. González, com. personal). En varios de los casos se aisló e identificó a *Lasiodiplodia* spp. como el posible agente causal, sin embargo, no existen publicaciones al respecto. Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar cepas fúngicas aisladas de árboles de cítricos con síntomas de muerte regresiva y evaluar su patogenicidad bajo condiciones de invernadero.

## **2.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Muestreo de plantas y aislamiento de hongos**

El muestreo fue dirigido hacia árboles de naranjo dulce (*Citrus sinensis* L.) con síntomas de muerte regresiva y necrosis en el tronco y ramas, recolectados en huertas de los municipios de General Terán y Montemorelos, Nuevo León, y Llera de Canales, Tamaulipas.

Los tejidos afectados con síntomas de necrosis y muerte regresiva fueron cortados en secciones de aproximadamente 1 cm en la zona de transición entre la parte necrótica y la parte aparentemente sana, se desinfectaron con blanqueador comercial al 10% por un minuto, posteriormente se lavaron con agua bidestilada, se sembraron en cajas Petri con papa dextrosa agar (PDA) y se incubaron a  $25\pm 2$  °C con un fotoperíodo de 12 horas luz y 12 horas de obscuridad (Marques *et al.*, 2013). Los hongos aislados se resembraron mediante el método de punta de hifa en agar agua y se incubaron en las mismas condiciones

de luz y temperatura durante 4 semanas, con el fin de obtener cepas puras (Twizeyimana *et al.*, 2013).

### **2.2.2. Identificación morfológica y molecular de hongos**

Para la identificación morfológica de los hongos aislados se tomaron en cuenta características culturales como crecimiento, color, tipo y forma de la colonia, además de la velocidad de crecimiento (Úrbaez *et al.*, 2013) observados con el microscopio en preparaciones de los hongos teñidos con lactofenol. La identificación de las especies de hongos se realizó utilizando las claves de Phillips *et al.* (2013).

Para la identificación molecular, las cepas se cultivaron en PDA a  $25 \pm 2$  °C por 7 días. La extracción del ADN se realizó utilizando el DNeasy Plant Mini Kit<sup>MR</sup> (Qiagen, Inc.) con ligeras modificaciones a las instrucciones del fabricante y el ADN fue cuantificado utilizando un espectrofotómetro Take3<sup>MR</sup> (Bioselec).

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en volúmenes de 25 µL. Se amplificó la región ITS-1, gen ribosomal 5.8S e ITS-2 utilizando los oligonucleótidos ITS-1fu 5`-tccgtagtggaacctgcgg-3` e ITS-4 5`-tcctccgcttattgatatgc-3` (White *et al.*, 1990).

Para las reacciones se utilizaron 5 µL de solución amortiguadora de PCR 5X, 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 2 µL de dNTP`s (2.5 mM), 0.2 µL de la enzima go-Taq (5U/µL) (Promega<sup>MR</sup>), 9.8 µL de agua grado Mili-Q, 2 µL de cada primer (10 pmoles/µL) y 2 µL de ADN. La PCR consistió de un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 20 s, 55 °C por 25 s, y 72 °C durante 50 s, seguido de un paso de elongación final por 4 min. Los productos de PCR se visualizaron en geles de

agarosa al 1%, previamente teñido con  $0.5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de bromuro de etidio y se compararon con un marcador de peso molecular (ladder-100<sup>MR</sup>, Axygen).

Los productos de la PCR obtenidos fueron secuenciados en la compañía Macrogen (EE.UU.) y comparados con secuencias del GenBank para confirmar la identidad de los hongos a nivel de especie.

### **2.2.3. Evaluación de la patogenicidad de los hongos aislados**

Para determinar la patogenicidad de las cepas aisladas se realizó un bioensayo en condiciones de invernadero en las instalaciones de la Facultad de Agronomía de la UANL localizadas en Gral. Escobedo, N.L. Este municipio se localiza a  $25^{\circ} 47' 5.98''$  L.- N. y  $100^{\circ} 17' 12.12''$  L.- O. a una altura de 481 msnm.

Para la evaluación de la patogenicidad se utilizaron plantas de naranjo dulce (*C. sinensis*) variedad Valencia de un año de injertadas sobre pie franco, las cuales medían de 60 a 75 cm de altura y se obtuvieron de un vivero comercial. El inóculo se obtuvo cultivando los hongos en PDA durante 6 días a  $25 \pm 2$  °C y 50 % de humedad relativa.

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con 9 tratamientos. Tres tratamientos con los hongos individualmente, tres tratamientos donde las diferentes cepas fueron combinadas por parejas, un tratamiento con la combinación de las tres cepas, un control (plantas inoculadas con PDA estéril) y un control absoluto de plantas en las cuales sólo se realizó el corte (Cuadro 1). Para cada tratamiento se utilizaron tres repeticiones.

**Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en la evaluación de la prueba de patogenicidad de los hongos aislados.**

<b>Tratamientos</b>	<b>Número</b>
Control absoluto (corte)	1
Control (PDA estéril)	2
<i>Fomitopsis meliae</i> (F)	3
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (L)	4
<i>Eutypella citricola</i> (E)	5
F+L	6
F+E	7
L+E	8
F+L+E	9

Para la inoculación de los hongos, a las plantas se les realizaron heridas longitudinales de 1 cm utilizando navajas estériles. La corteza fue desprendida ligeramente a modo de pestaña, provocando una herida por planta. En la herida se inocularon los hongos colocando discos miceliales de 5 mm de diámetro tomados del margen del crecimiento micelial, luego se cerró la pestaña y se cubrió con parafilm para evitar la desecación del hongo y de la planta. Se realizaron observaciones periódicas a intervalos de siete días para medir la longitud de las lesiones.

De las plantas inoculadas con síntomas de necrosis y muerte regresiva, se procedió a re-aislar e identificar los hongos fitopatógenos siguiendo el método previamente descrito.

#### **2.2.4. Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para la longitud de las lesiones en los tallos inoculados en la prueba de patogenicidad, para determinar la efectividad media de

cada tratamiento y una comparación múltiple de medias con el método de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa estadístico SPSS 22 (IBM Corp., 2013).

## 2.3. RESULTADOS

### 2.3.1. Aislamiento, purificación e identificación de hongos

En los cultivos realizados, entre los 2 y 5 días, crecieron varios hongos, los cuales fueron purificados por punta de hifa e identificados mediante sus características morfológicas como *L. theobromae*, el cual en medio PDA mostró inicialmente una coloración de la colonia blanquecina, volviéndose gris y oscureciendo al pasar los días, los conidios formados en conidióforos, inicialmente de forma ovalada, hialinos y sin septos, pero al envejecer el cultivo llegaron a ser septados y adquirieron una coloración café. *Fomitopsis* sp. fue identificado por su micelio aéreo de color grisáceo-negro y conidios hialinos, unicelulares, ovoides y elipsoidales. *E. citricola* fue identificado por su crecimiento colonial de color blanco, con micelio aéreo y al madurar formó picnidios libres, oscuros y dispersos. Los conidios presentes fueron hialinos, filiformes, unicelulares y algunos con forma curveada. Con respecto a la identificación molecular, se tuvo éxito con la extracción de ADN de las 3 especies de hongos aislados a partir de muestras sintomáticas de naranjo dulce. En los 3 casos se tuvieron en promedio  $30 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  de ADN con relaciones de absorbancia 260/280 entre 1.8 y 2.0 indicando buena calidad.

En las reacciones de PCR, se lograron las amplificaciones de ADN de las 3 especies de hongos utilizando los primers universales para hongos ITS-1fu/ITS-4. La secuencia consenso de los productos de PCR fue de 515 pb para la región ITS-1, 5.8S e ITS-2, además de secuencias parciales de 18S y 28S RNA. Al comparar las secuencias de ADN de

los aislamientos con secuencias del GenBank, en los tres casos coincidieron en un 99% de similitud con *L. theobromae* (accesión MK166047.1), *F. meliae* (HQ248221.1) y *E. citricola* MG456731.1 (Figs. 2-13 del apéndice I).

### 2.3.2. Prueba de patogenicidad

Cuatro días posteriores a la inoculación, las plantas inoculadas con *F. meliae* (tratamiento 3), mostraron síntomas de necrosis, marchitez y muerte de ramas en dirección descendente. Después de 32 días las lesiones necróticas exteriores midieron entre 9.5 y 29 cm de largo, siendo este hongo el causante de síntomas más agresivos de muerte descendente (Cuadro 2, Figura 2). Al finalizar el bioensayo, se realizaron cortes longitudinales de las plantas con síntomas de marchitez, pudiéndose observar en los mismos, manchas de color café en los tejidos vasculares.

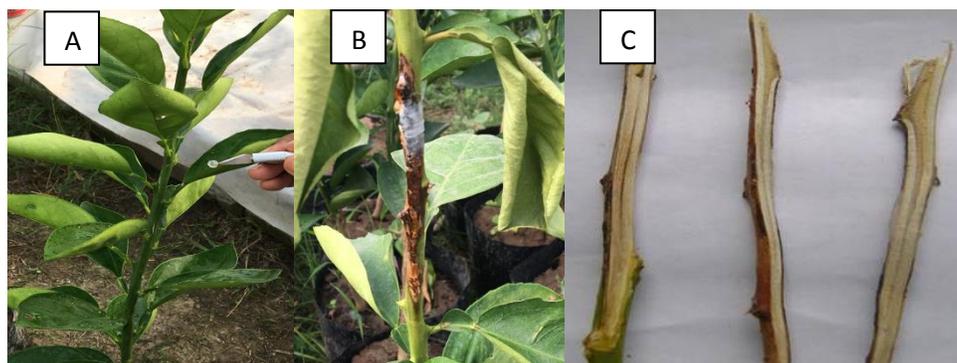
**Cuadro 2. Análisis de varianza de la longitud de las lesiones en tallos en los tratamientos de inoculación con hongos en plantas de naranjo dulce (*C. sinensis*).**

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SC</b>	<b>CM</b>	<b>Fc</b>	<b>Sig</b>
Tratamientos	8	2335.630	291.954	36.316	0.000
Error	18	144.707	8.039		
Total	26	2480.336			

**Cuadro 3. Comparación de medias de la longitud de las lesiones en tallos en los tratamientos de inoculación con hongos en plantas de naranjo dulce (*C. sinensis*).**

Tratamientos		Longitud de las lesiones <sup>1</sup> (cm)	
3	<i>Fomitopsis meliae</i> (F)	25 ± 1.52	a
6	F + L	22 ± 8.11	a
9	F + L + E	3 ± 1.33	b
7	F + E	3 ± 0.96	b
4	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (L)	2 ± 0.40	b
8	L + E	2 ± 0.43	b
5	<i>Eutypella citricola</i> (E)	1.56 ± 0.51	b
1	Control absoluto (corte)	0	b
2	Control (PDA estéril)	0	b

<sup>1</sup>Promedio de 3 repeticiones ± 2 desviaciones estándar a los 32 días después de la inoculación. Tratamientos con la misma letra no tienen diferencia significativa al nivel de significancia 0.05.



**Figura 1. Prueba de patogenicidad de hongos causantes de muerte regresiva en naranjo dulce (*C. sinensis* L.). A. Inoculación con discos de micelio, B. Síntomas de muerte regresiva, C. Haces vasculares del tallo.**

En los tratamientos en los cuales se utilizó como inóculo a *E. citricola*, los síntomas fueron menos agresivos, ya que solamente se observaron necrosis de 1 a 4 cm alrededor de la zona inoculada, pero no expresaron síntomas de marchitez.

De todas las plantas inoculadas se realizaron montajes directos en laminillas y resiembras en PDA. Las características morfológicas y de crecimiento colonial fueron similares a las descritas previamente para las cepas de *F. meliae* y *L. theobromae* utilizadas para la inoculación. La secuenciación de ADN de los productos de PCR coincidieron en un 99% únicamente para *L. theobromae* y *F. meliae*, pero el re-aislamiento de *E. citricola* a partir de las plantas inoculadas no fue posible.

## 2.4. DISCUSIÓN

Está reportado que el género *Lasiodiplodia* spp., y otros géneros pertenecientes a la familia Botryosphaereacea causan muerte regresiva en diversas especies leñosas (Adesemoye *et al.*, 2014). Otros síntomas comunes son gomosis, canchrosis, pudrición del pedúnculo y frutos (McDonald y Eskalen, 2011). En México existen reportes de *L. theobromae* como causante de muerte regresiva en mango, zapote y guanábana (Sandoval *et al.*, 2013; Tovar *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2013); pero no hay ningún reporte publicado en cítricos, aunque si están documentados varios casos en la Dirección General de Sanidad Vegetal de la SAGARPA reportados por el laboratorio Biociencia (Dr. R. González, com. personal). En el presente trabajo se logró aislar a *L. theobromae* y se comprobó su patogenicidad. El estudio de esta especie afectando árboles de cítricos, en donde no se había comprobado su patogenicidad anteriormente, resulta de gran interés, ya que algunos factores posiblemente estén influyendo para que produzcan la enfermedad. Uno de esos

factores puede ser el estrés por sequía (Mullen *et al.*, 1991), puesto que algunas de estas especies pueden estar presentes en los cultivos como saprófitas y no causar ningún tipo de síntomas (Trakuningcharoen *et al.*, 2015) hasta que se presenten las condiciones favorables.

Con respecto a la identificación de *F. meliae* causante de este problema en cítricos, estos resultados coinciden con lo reportado por Roccotelli *et al.* (2014), quienes demostraron mediante pruebas de patogenicidad que al inocular a *F. meliae* en ramas de limón (*Citrus limon*), éste puede colonizar rápidamente las ramas inoculadas, lo que indica que es un patógeno potencial de los cítricos. Nuestros resultados también coinciden con lo reportado por Mayorquin *et al.* (2016), quienes señalan que *Eutypella* sp. causó canchros y lesiones necróticas en las ramas de cítricos inoculadas. A pesar de que *F. meliae* es un patógeno agresivo (Roccotelli *et al.*, 2014), su patogenicidad disminuyó cuando fue combinado con *E. citricola*.

La longitud de las lesiones varió dependiendo del hongo inoculado. Esta diferencia en el largo de las lesiones puede ser comparado con lo reportado por Chen *et al.* (2014), donde *Lasiodyplodia citricola* produjo cancro y decaimiento en ramas del nogal (*Juglans nigra*) cuando fueron inoculados mediante una suspensión de esporas, a diferencia de la inoculación con discos de micelio. No obstante, el método de inoculación empleado para *Lasiodyplodia* spp. ha demostrado que es un patógeno agresivo porque provoca necrosis, decoloración vascular, marchitamiento de copa y muerte regresiva (Adesemoye *et al.*, 2014; Linaldeddu *et al.*, 2014).

El hecho de poder re-aislar los hongos de las plantas inoculadas, evidencian que se logró la infección porque se registró la penetración de las hifas de los patógenos y colonización del sistema vascular de las plantas (Figura 1).

## 2.5. CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de 3 hongos fitopatógenos de árboles de cítricos con síntomas de muerte regresiva en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, México. Los hongos fueron identificados como *L. theobromae*, *F. meliae* y *E. citricola* mediante características culturales, morfológicas, moleculares y patogénicas. De las especies identificadas únicamente *L. theobromae* y *F. meliae* reprodujeron los síntomas de la enfermedad en condiciones de invernadero, las cuales fueron re-aisladas, y se corroboró su identificación.

## 2.6. APÉNDICE I



**Figura 2. Electroferograma de ADN de un aislamiento de *Lasiodiplodia theobromae* del estado de Nuevo León con el primer ITS-4.**

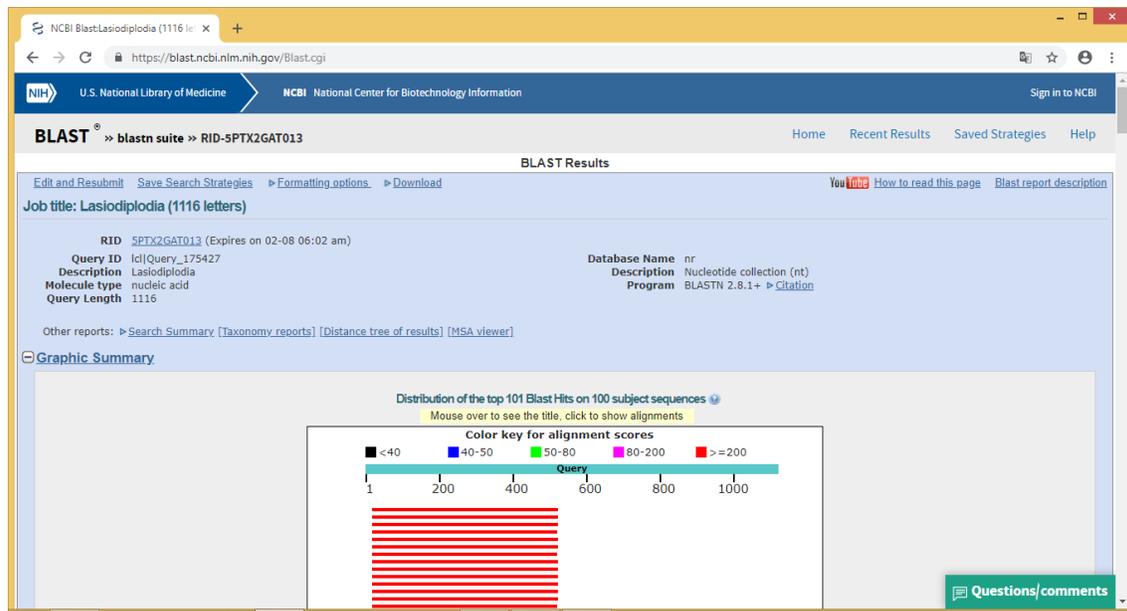
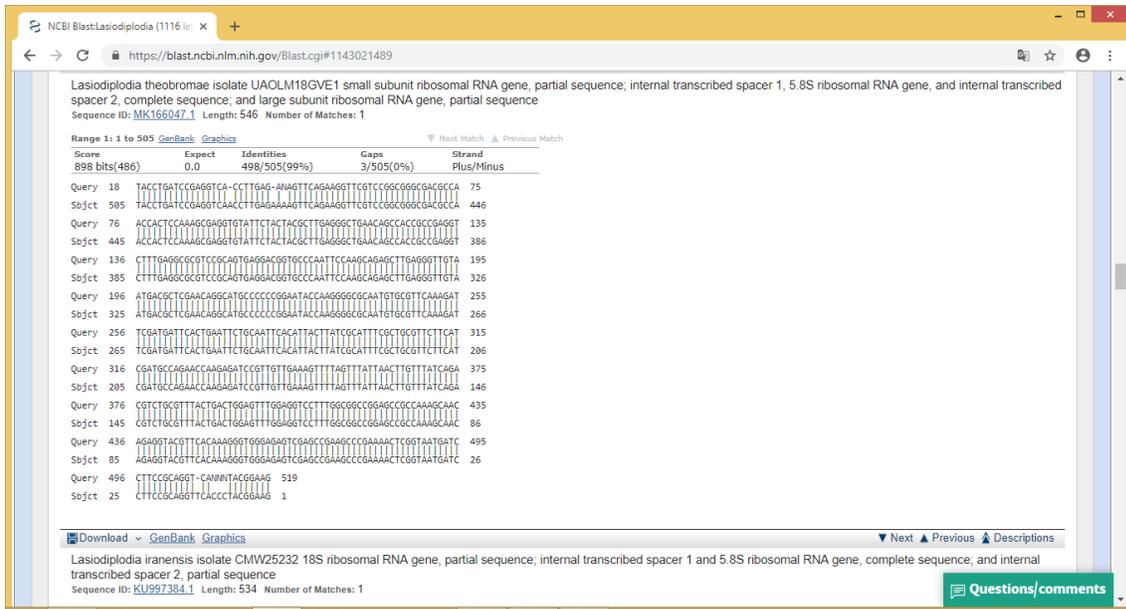


Figura 3. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de *Lasiodiplodia theobromae* del estado de Nuevo León con el primer ITS-4.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Lasiodiplodia oseudotheobromae isolate SSB2B 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	900	900	44%	0.0	99%	KP998516.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae isolate UAOLM180VE1 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	898	898	44%	0.0	99%	MK166047.1
<a href="#">Lasiodiplodia tranensis isolate CMW25232 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	898	898	44%	0.0	99%	KU997384.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain A9-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	898	898	44%	0.0	99%	JN048466.1
<a href="#">Botryosphaeria sp. 62CHV5 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene</a>	898	898	44%	0.0	99%	GU066640.1
<a href="#">Lasiodiplodia oseudotheobromae isolate JDHNY2a small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	MH863527.1
<a href="#">Lasiodiplodia sp. strain B13 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KY579359.1
<a href="#">Lasiodiplodia oseudotheobromae isolate MTZ53 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KY052959.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae isolate Coconut small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	MG697234.1
<a href="#">Lasiodiplodia tranensis isolate CMW25231 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KU997383.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae isolate SSB2A 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KP998515.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain D022 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KU377483.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain C013 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KU377460.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain L11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KR260801.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain L8 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KR260798.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain L2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KR260792.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence</a>	896	1102	47%	0.0	99%	LC074359.1
<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain 2 ITS4_G19_13Q 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1 and 5.8S ribosomal RNA gene, complete sequence, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	43%	0.0	99%	KF293981.1
<a href="#">Lasiodiplodia sp. 1088AMSTITTYEL 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	896	896	44%	0.0	99%	KY052959.1
<a href="#">Lasiodiplodia oseudotheobromae strain Ls7.4 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene</a>	894	894	44%	0.0	99%	KY052959.1

Figura 4. Similitud de la secuencia de ADN de *Lasiodiplodia theobromae* de un aislamiento del estado de Nuevo León con secuencias del GenBank.



**Figura 5. Similitud de la secuencia de ADN de *Lasiodiplodia theobromae* de un aislamiento del estado de Nuevo León con la secuencia de la accesión MK166047.1 del GenBank.**



**Figura 6. Electroferograma de ADN de un aislamiento de *Fomitopsis meliae* del estado de Tamaulipas con el primer ITS-1fu.**

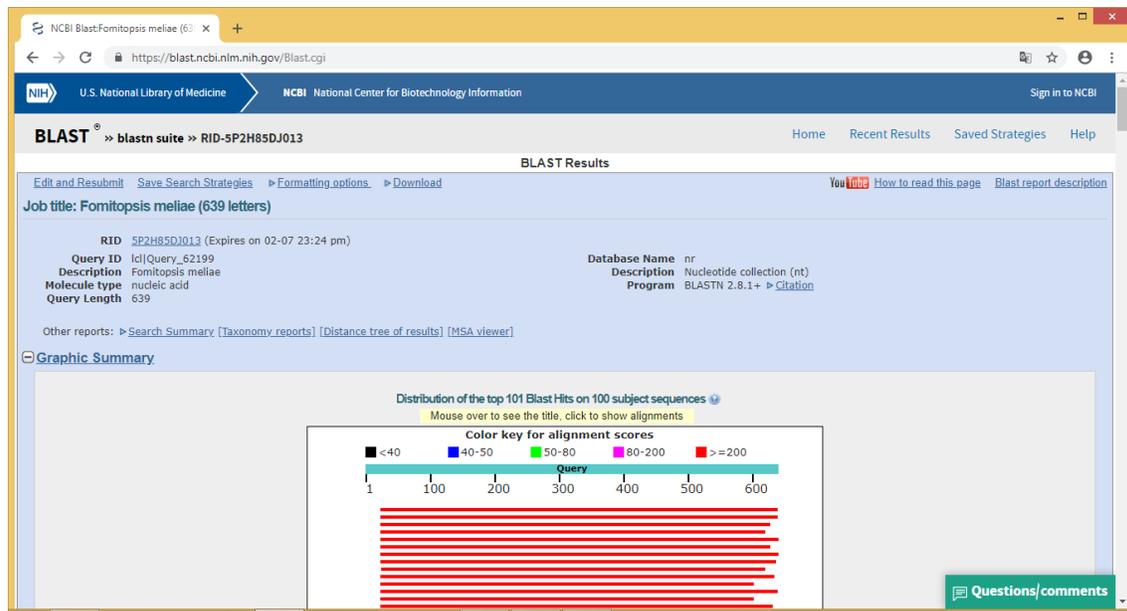


Figura 7. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de *Fomitopsis meliae* del estado de Tamaulipas con el primer ITS-1fu.

NCBI Blast:Fomitopsis meliae (6) x +  
 https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi  
 Descriptions  
 Sequences producing significant alignments:  
 Select: All None Selected:0  
 Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results  

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Fomitopsis meliae isolate PCO-22 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1085	1085	96%	0.0	99%	HQ248221.1
Uncultured fungus clone CMH535 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1067	1067	96%	0.0	99%	KF800624.1
Fomitopsis meliae voucher SRM-209 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1061	1061	94%	0.0	99%	KC585351.1
Fomitopsis meliae voucher JV 1109/40-1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1058	1058	93%	0.0	99%	KY264030.1
Fomitopsis sp. 1 GMR-2014 voucher MEL 2382710 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1052	1052	96%	0.0	98%	KP012890.1
Fomitopsis sp. KN1 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1049	1049	94%	0.0	99%	KU253767.1
Fomitopsis sp. X244 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1035	1035	96%	0.0	97%	KC595914.1
Fomitopsis cf. meliae WS3JB14 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1031	1031	95%	0.0	98%	KT844682.1
Fomes meliae strain CBS 179.34 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1031	1031	92%	0.0	99%	DQ491421.1
Fomitopsis cf. meliae WS1JB14 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1028	1028	95%	0.0	98%	KT844680.1
Fomitopsis meliae voucher Ryvarden 16893 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1027	1027	90%	0.0	99%	KR605776.1
Fomitopsis meliae strain RCKF7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1023	1023	96%	0.0	97%	KT718002.1
Fomitopsis meliae voucher Roberts GA863 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1022	1022	90%	0.0	99%	KR605775.1
Fomitopsis cf. meliae WS2JB14 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1022	1022	94%	0.0	98%	KT844681.1
Fomitopsis meliae strain DK12 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1014	1014	93%	0.0	98%	KT210092.1
Fomitopsis sp. isolate G13A internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and large subunit of 28S ribosomal RNA gene	1013	1013	90%	0.0	99%	KU847467.1
Fomitopsis cf. meliae WS4JB14 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1012	1012	94%	0.0	99%	KU847468.1
Fungal sp. IIMMK/BM/19 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S ribosomal RNA gene	1012	1012	94%	0.0	99%	KU847469.1

 Questions/comments

Figura 8. Similitud de la secuencia de ADN de *Fomitopsis meliae* de un aislamiento del estado de Tamaulipas con secuencias del GenBank.



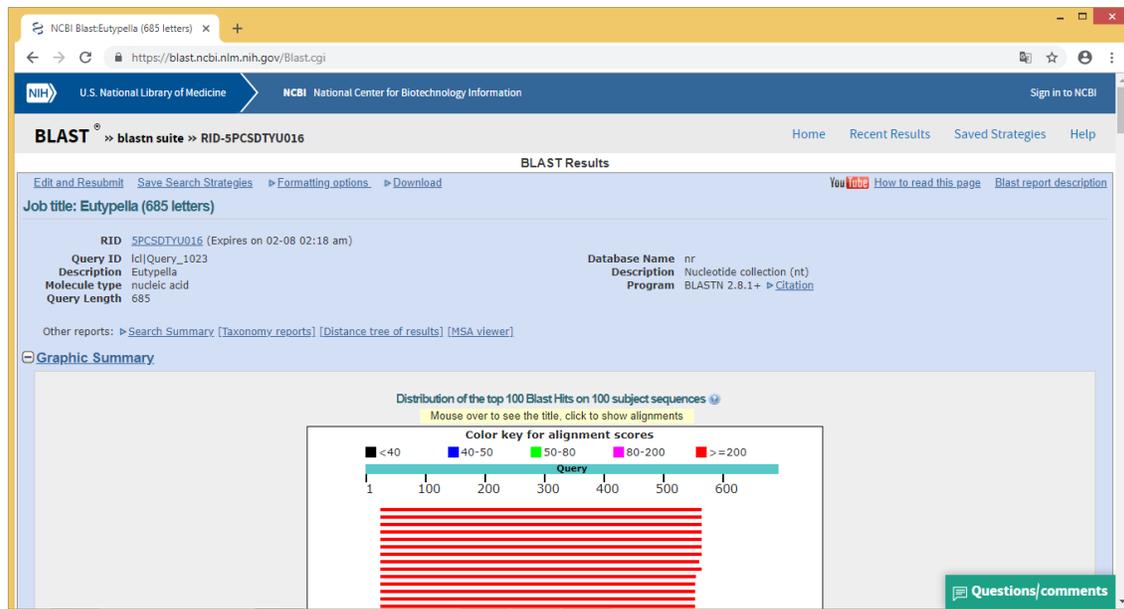


Figura 11. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de *Eutypella citricola* del estado de Tamaulipas con el primer ITS-1fu.

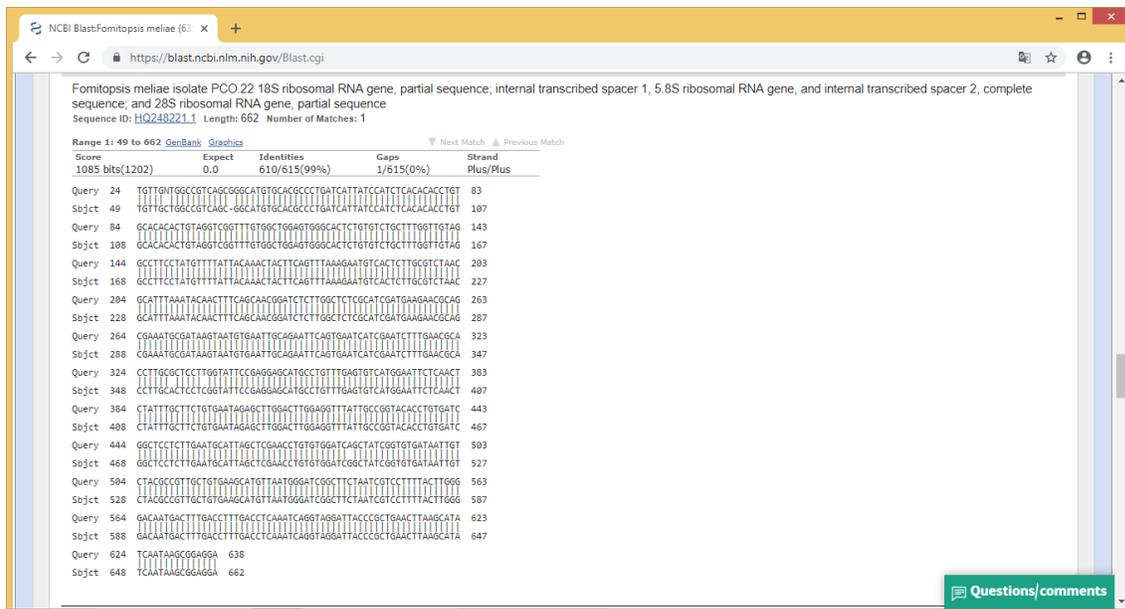
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella citricola</i> strain IRNHM-KZU5 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and	953	953	77%	0.0	99%	MG456731.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. 1_DACA-2015 voucher HUEFS 192192 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal trans	949	949	77%	0.0	99%	KM396645.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. 1_DACA-2015 voucher HUEFS 192069 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal trans	949	949	77%	0.0	99%	KM396643.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. HUEFS 131045 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, comple	949	949	77%	0.0	99%	KM396638.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. M2025-1-MIN-SNA1 isolate PanM20251M1NSNA1CC22 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp	947	947	77%	0.0	99%	JQ922158.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. P50193EM1CC27 internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence and 28S ribosomal RNA ge	947	947	77%	0.0	99%	JQ411346.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella citricola</i> voucher HUEFS 194248 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed sp	940	940	77%	0.0	99%	KM396616.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella citricola</i> strain CBS 128333 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcriber	939	939	77%	0.0	99%	MH864884.1
<input type="checkbox"/> Uncultured fungus clone ZMTDH201308-7 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal trans	936	936	77%	0.0	99%	KX515875.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. ATCC MYA-4425 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	929	929	76%	0.0	99%	FJ172286.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella citricola</i> strain CBS 128331 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcriber	925	925	76%	0.0	99%	MH864882.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella citricola</i> strain CBS 128330 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcriber	925	925	76%	0.0	99%	MH864881.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. ATCC MYA-4426 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	925	925	76%	0.0	99%	FJ172287.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. ATCC MYA-4421 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	925	925	76%	0.0	99%	FJ172282.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella citricola</i> strain CBS 128334 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcriber	923	923	77%	0.0	99%	MH864885.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. 1_DACA-2015 voucher HUEFS 136872 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal trans	922	922	77%	0.0	99%	KM396640.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. ATCC MYA-4421 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, com	921	921	75%	0.0	99%	FJ430597.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. KUC21241 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete s	920	920	75%	0.0	99%	KT207759.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella</i> sp. KUC21218 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete s	920	920	75%	0.0	99%	KT207724.1
<input type="checkbox"/> <i>Eutypella citricola</i> strain GNS46 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence, and 28S r	918	918	75%			

Figura 12. Similitud de la secuencia de ADN de un aislamiento de *Eutypella citricola* del estado de Tamaulipas con secuencias del GenBank.



**Figura 13. Similitud de la secuencia de ADN de un aislamiento de *Eutypella citricola* del estado de Tamaulipas con la secuencia de la accesión MG456731.1 del GenBank.**

## 2.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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 Disease* 98: 55 – 61.
- Al-Sadi, A.M.; Al-Ghathithi, A.G.; Al-Fahdi, N.; and 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.
- Cedeño, L. y Palacios, P.E. 1992. Identificación de Botryodiplodia theobromae como la causante de lesiones y gomosis en cítricos. *Fitopatología Venezolana* 1: 10-13.
- Chen, S.F.; Morgan, D.P.; Hasey, J.K.; Anderson, K.; and Michailides, T.J. 2014. Phylogeny, morphology, distribution, and pathogenicity of Botryosphaeriaceae and Diaporthaceae from English walnut in California. *Plant Disease* 98:636-652. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0706-RE>.
- Hernández, F.L.M.; Gómez, J.R. y Agustín, J.A. 2013. Importancia, plagas insectiles y enfermedades fungosas del cultivo del guanábano. Libro técnico No. 1. Campo Experimental Santiago Ixcuintla, Nayarit, México. 87 p.
- IBM Corp. Released. 2013. IBM SPSS Statistic for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.

- Linaldeddu, B.T.; Deidda, A.; Scanu, B.; Franceschini A.; Serra S.; Berraf-Tebbal; A.; Zouaoui; B.M.; Ben Jamaa, M.L.; and Phillips, A.J.L. 2014. Diversity of Botryosphaeriaceae species associated with grapevine and other woody hosts in Italy, Algeria and Tunisia, with descriptions of *Lasiodiplodia exigua* and *Lasiodiplodia mediterranea* sp. nov. *Fungal Diversity* 71: 201-214. DOI 10.1007/s13225-014-0301-x.
- Marqués, M.W.; Lima, N.B.; Morais, M.A.; Michereff, S.J.; Phillips, A.J.L.; and Camara, M.P.S. 2013. *Botryosphaeria*, *Neofusicoccum*, *Neocyttalidium* and *Pseudofusicoccum* species associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61: 195-208. DOI 10.1007/s13225-013-0258-1.
- Mayorquin, J.S.; Wang, D.H.; Twizeyimana, M.; and Eskalen, A. 2016. Identification, distribution and pathogenicity of Diatrypaceae and Botryosphaeriaceae associated with citrus branch canker in the southern California desert. *Plant Disease* 100:2402-2413. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0362-RE>.
- McBride, S.; French, R.; Schuster, G.; y Ong, K. 2010. Guía de enfermedades de los cítricos. AgriLife Extension. Texas A&M System. 12 p.
- McDonald, V. and Eskalen, A. 2011. Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Disease* 95: 1465-1473. doi:10.1094 / PDIS-02-11-0136.
- Mullen, J.M.; Gilliam, C.H.; Hagan, A.K.; and Morgan-Jones, G. 1991. Canker of dogwood caused by *Lasiodiplodia theobromae*, a disease influenced by drought stress or cultivar selection. *Plant Disease* 75: 886-889.
- Phillips, A.J.L.; Alves, A.; Abdollahzadeh, J.; Slippers, B.; Wingfield, M.J.; Groenewald, J.Z.; and Crous, P.W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Micology* 76: 51-167. doi:10.3114/sim0021.
- Rocotelli, A.; Schena, L.; Sanzani, S.M.; Cacciola, S.O.; Mosca, S.; Faedda, R.; Ippolito, A.; and Magnano di San Lio, G. 2014. Characterization of basidiomycetes associated with wood rot of citrus in southern Italy. *Phytopathology* 104: 851-858. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-10-13-0272-R>.
- 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* 121:1-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>.
- Sandoval, S.M.; Nieto, A.D.; Sandoval, I.S.; Téliz, O.D.; Orozco, S.M.; y Silva, R.H.V. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). *Agrociencia* 47: 61-73.

- Tovar, P. J.M.; Mora, A. J.A.; Nava, D.C.; Téliz, O.D.; Villegas, M.A.; and Leyva, M.S.G. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stern] grafts in Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 233-238.
- Trakunyingcharoen, L.; Lombard, L.; Groenewald, J.Z.; Cheewangkoon, R.; To-anum, C.; and Crous, P.W. 2015. *Caulicolus Botryosphaeriales* from Thailand. *Persoonia* 34: 87-99. <http://dx.doi.org/10.3767/003158515X685841>.
- Twizeyimana, M.; Forster, H.; McDonald, V.; Wang, D.H.; Adaskaveg, J. E.; and Eskaten, A. 2013. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease* 97: 1580 –1584. <http://dx.doi.org/10.1094 / PDIS-03-13-0230-RE>.
- Úrbaez, T., J.R.; Peduto, F.; Vossen, P.M.; Krueger, W.H.; and Gubler, W.D. 2013. Olive twig and branch dieback: etiology, incidence and distribution in California *Plant Disease* 97: 23 - 244. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0390-RE>.
- White, T.J.; Bruns, T.; Lee, S.; and Taylor, J. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 315-322.

### CAPITULO 3

## CONTROL DE *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* CAUSANTES DE LA MUERTE REGRESIVA DE LOS CÍTRICOS

### RESUMEN

La investigación fue realizada con el objetivo de aislar cepas de microorganismos de suelo y evaluar su capacidad antagónica *in vitro* frente a los fitopatógenos *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae*, y evaluar tres fungicidas sintéticos para su control. Para el aislamiento de los microorganismos se realizaron 17 muestreos de rizósfera en diferentes localidades y tipos de vegetación; las muestras se trataron con calor y se sembraron por extensión en el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) adicionado con extracto de levadura (0.3%) y extracto de malta (0.3%) (PDLM). Los aislamientos obtenidos se evaluaron preliminarmente por observación y confrontación del crecimiento. De 70 cepas aisladas, 15 tuvieron actividad antagónica, las cuales mostraron porcentajes de inhibición de 39-91%. Las cepas del actinomiceto M4 R, el hongo M104 (*Penicillium citrinum*) y el actinomiceto M1-101 causaron inhibición del 84, 85 y 91% respectivamente contra *L. theobromae*. Los fungicidas dicarboximida, oxiclورو de cobre + clorhidrato de oxitetraciclina + sulfato de estreptomicina, y cloratolonil + cymoxanil a concentraciones de 3, 0.6 y 3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente, no fueron efectivos en reducir el crecimiento micelial de *L. theobromae*. Se logró el aislamiento de bacterias, actinomicetos y hongos del suelo capaces de inhibir el crecimiento de los hongos *L. theobromae* y *F. meliae* causantes de muerte regresiva de los cítricos. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte de microorganismos con potencial antagónico contra los hongos causantes de la muerte regresiva de los cítricos.

**Palabras clave:** antagonismo, inhibición, microorganismos, control biológico

## SUMMARY

The work was carried out with the aim of isolation soil microorganisms and to evaluate their *in vitro* antagonistic capacity against *Lasiodiplodia theobromae* and *Fomitopsis meliae*; and to evaluate three commercial fungicides for their control. For the isolation of the soil microorganisms, seventeen samples of rhizosphere were carried out in different localities and vegetation; the samples were treated with heat and were seeded by extension in the artificial culture medium potato dextrose agar (PDA) added with 0.3% of yeast extract and 0.3% of malt extract (PDYM). The strains obtained were preliminarily evaluated by observation and growth confrontation. From 70 strains obtained 15 showed antagonistic activity, with 39-91% of inhibition. Strains M4 R actinomycete, M104 (*Penicillium citrinum*) and the actinomycete M1-101 caused inhibition of 84, 85 and 91% respectively against *L. theobromae*. The fungicides dicarboximide, cuprum oxychloride + oxitetracycline chlorhydrate + streptomycine sulphate, y cloratolonil + cymoxanil at 3, 0.6 y 3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  respectively, were not effective in reducing the mycelial growth of *L. theobromae*. The isolation of bacteria, actinomycetes and soil fungi capable of inhibiting the growth of the fungi *L. theobromae* and *F. meliae* causing of citrus dieback was succesful. Until now, this is the first report of microorganisms with antagonistic potential against the fungi that cause citrus dieback.

**Key words:** antagonism, inhibition, microorganisms, biological control

### 3.1. INTRODUCCIÓN

Los cítricos (*Citrus* spp) son considerados como la fruta universal ya que están presentes en más de 100 países y son el grupo de frutas más importante económicamente, abarcando el 20% del mercado mundial de frutas. Actualmente, la mayor parte de la cosecha de cítricos proviene de 10 países que aportan el 77% de la producción, los cuales China y Brasil producen el 42%, y México ocupa la cuarta posición después de los EE.UU. (Lerma *et al.*, 2015).

Las enfermedades constituyen un factor limitante en la producción de este cultivo en las zonas productoras de México, causadas por alrededor de 50 patógenos que les provocan diversos síntomas tales como gomosis, antracnosis, exocortis, caída de frutos, mancha grasienta, roña, muerte de ramas, entre otros (Orozco *et al.*, 2013).

El hongo *Lasiodiplodia* spp. ha sido reportado como causante de muerte regresiva y otros síntomas en cítricos y en una amplia gama de cultivos en diversos países (Adesemoye *et al.*, 2014; Rodríguez *et al.*, 2016). Por lo general, el método de control de este hongo es mediante las aplicaciones de fungicidas sintéticos. Los fungicidas químicos pueden producir efectos colaterales como la resistencia a plagas y enfermedades, la reducción de las poblaciones de microorganismos benéficos y la contaminación del ambiente (Adeniyi *et al.*, 2013; Álvarez, 2015; Tovar *et al.*, 2013).

Los agentes utilizados para biocontrol reducen significativamente las poblaciones de fitopatógenos y con su uso se pretende equilibrar las perturbaciones ecológicas provocadas por los agroquímicos (Badii y Abreu, 2006), mediante diversos mecanismos como la producción de toxinas (Carisse *et al.*, 2001), la competencia por nutrientes y espacio

(Mutawila *et al.*, 2011), inhibición del crecimiento micelial del patógeno y micoparasitismo (Cheng *et al.*, 2012).

Entre los grupos de microorganismos utilizados para biocontrol se encuentran los actinomicetos, los cuales han sido ampliamente estudiados por su capacidad de producir compuestos antibióticos y antifúngicos (Lee *et al.*, 2002), especialmente contra fitopatógenos de importancia agrícola (Sreevidya y Gopalakrishnan 2012, Abdallah *et al.*, 2013; Davila *et al.*, 2013). Los actinomicetos son bacterias Gram positivas, halladas generalmente, en suelo, ríos, lagos, material orgánico en descomposición, entre otros lugares. Muchos son saprofitos y algunas especies son patógenas (Quiñones *et al.*, 2016), como es el caso de *Streptomyces scabies* causante de la sarna común de la papa. Desde hace varias décadas, el número de actinomicetos utilizados en la agricultura ha estado en constante aumento como un medio para controlar o reducir las poblaciones de fitopatógenos (Dávila *et al.*, 2013).

El objetivo de este trabajo fue aislar cepas de microorganismos de suelo y evaluar su capacidad antagónica *in vitro* frente a los patógenos de los cítricos *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae*, causantes de la muerte regresiva, además de evaluar tres fungicidas sintéticos para su control.

## 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1. Cepas fúngicas fitopatógenas

Las cepas fúngicas de *Lasiodiplodia theobromae* y *Fomitopsis meliae* fueron aisladas a partir de árboles con síntomas de muerte regresiva de los cítricos en huertas localizadas en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, y se identificaron morfológicamente y por secuenciación de ADN.

### 3.2.2. Aislamiento de microorganismos del suelo

Se realizaron 17 muestreos de suelo con diferentes tipos de vegetación en zonas del estado de Nuevo León (Cuadro 4), se colectaron muestras de la rizosfera a una profundidad de 10 a 15 cm, después de eliminar la capa superficial. Para el muestreo se seleccionaron al azar cinco puntos diferentes para formar una muestra. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico, se sellaron y almacenaron en el laboratorio en condiciones de clima fresco.

**Cuadro 4.** Relación de lugares de muestreo y tipo de vegetación predominante.

Localización	Coordenadas	Vegetación predominante
FAUANL, Campus Marín, Municipio Marín	25°52'25.76" Latitud Norte; 100°3'21.25" Longitud Oeste	Cultivo de cítricos y terreno baldío
FAUANL, Campus La Ascensión, Municipio Aramberri	24.32° Latitud Norte; 99.91° Longitud Oeste	Cultivo de ajo
Municipio de Mina	25°52' a 26°44' Latitud Norte; 100°26' a 101°13' Longitud Oeste	Plantas silvestres

Un gramo de cada muestra se disolvió en 9 mL de agua destilada estéril. Las diluciones fueron tratadas con calor (50 °C) durante 10 min. De cada suspensión se prepararon diluciones seriadas 1:100, 1:1000 y 1:10000. De cada dilución se transfirieron 100 µL a cajas Petri con agar papa dextrosa adicionado con 0.3% de extracto de levadura y 0.3% de extracto de malta (APDLM) mediante el método de extensión. Las cajas Petri se incubaron a 25±2 °C. Se aislaron y purificaron microorganismos que presentaron halos de inhibición (Oskay *et al.*, 2004).

### **3.2.3. Caracterización morfológica y genética de bacterias y actinomicetos**

Las cepas de actinomicetos se caracterizaron de acuerdo con sus características de crecimiento macroscópico: forma, color del micelio aéreo, textura y la producción de pigmentos en el medio de cultivo. Adicionalmente, se realizaron observaciones microscópicas utilizando para ello la tinción Gram.

Para la identificación molecular de los actinomicetos se extrajo el ADN utilizando el DNeasy Plant Mini Kit<sup>MR</sup> (Qiagen Inc.), y luego se amplificó por PCR utilizando los iniciadores 8F (5'-aga gtt tga tcc tgg ctc ag-3') y 1492R (5'-ggt tac ctt gtt acg act t-3') (Sacchi *et al.*, 2002). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Thermo<sup>MR</sup>, las cuales consistieron en una denaturalización a 94°C por 1 min, seguido por 35 ciclos a 94°C por 30 seg, un anillamiento a 48°C por 50 seg y una extensión a 72°C por 80 seg, y una extensión final a 72 °C por 4 min. Los productos se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con 0.5 ng-µL<sup>-1</sup> de bromuro de etidio. Se utilizó el marcador de peso molecular ladder-100<sup>MR</sup> (Axygen).

### **3.2.4. Caracterización morfológica y genética de los hongos con actividad antagónica**

La identificación morfológica de los hongos obtenidos estuvo basada en las características de las colonias (color, tipo y forma) además de la morfología de conidios y conidióforos utilizando un microscopio óptico (Úrbaz *et al.*, 2013). Además se realizaron montajes en laminillas utilizando lactofenol azul de algodón como solución, y se describieron las características particulares de las estructuras. Los hongos se identificaron siguiendo los criterios de Barnett and Hunter (1998) y Phillips (2013).

Para la caracterización genética, se extrajo el ADN genómico a partir de micelio siguiendo las instrucciones del fabricante del kit DNeasy Plant Mini Kit<sup>MR</sup> (Qiagen Inc.). El ADN se cuantificó con un espectrofotómetro Take3<sup>MR</sup> (Bioselec). Se amplificó por PCR la región ITS-1, gen ribosomal 5.8S e ITS-2 utilizando los iniciadores ITS-1fu 5`-tccgtaggtgaacctgcgg-3` ITS-4 5`-tcctccgcttattgatatgc-3` (White *et al.*, 1990). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Termo<sup>MR</sup>, las cuales consistieron de una desnaturalización a 94 °C por 1 min, un anillamiento a 55 °C por 25 seg, una extensión a 72 °C durante 50 seg, con 35 ciclos, seguido de una extensión final a 72 °C por 4 min.

Los productos de la PCR fueron secuenciados y comparados con secuencias del GenBank para confirmar la identidad de las cepas a nivel de especie.

### **3.2.5. Prueba de antagonismo *in vitro***

Se realizó una prueba preliminar para seleccionar las cepas que presentaran mayor efecto inhibitorio sobre los hongos patógenos. Las confrontaciones se realizaron con cada cepa de los microorganismos aislados contra los hongos fitopatógenos *L. theobromae* y *F.*

*meliae*. Se sembró una azada de cada uno de los microorganismos en los cuatro puntos cardinales (3 cm de distancia del centro, en cajas Petri) en el medio APDLM. Cuarenta y ocho horas después un explante de 0.5 cm de crecimiento de cada hongo fitopatógeno fue colocado en el centro. Las cajas fueron incubadas a  $25\pm 2$  °C durante 5 días. Cada microorganismo se tomó como un tratamiento con tres repeticiones, considerando cada caja Petri como una repetición y un control negativo con cada hongo sin antagonista. El ensayo se realizó dos veces.

La capacidad inhibitoria de los microorganismos se cuantificó midiendo el diámetro del crecimiento fúngico con un vernier, usando dos diámetros cardinales previamente dibujados en la parte baja de cada caja Petri como referencia.

El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente formula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(A1-A2)/A1] \times 100$$

Dónde:

A1= crecimiento de la colonia del fitopatógeno (testigo) y

A2=crecimiento de la colonia fungosa del fitopatógeno creciendo frente al actinomiceto.

Con base en los resultados de las pruebas preliminares de las confrontaciones *in vitro*, se seleccionaron las cepas M1-101 y M104 para un segundo ensayo porque presentaron los valores más altos de inhibición. Las cepas antagonistas fueron cultivadas en caldo papa dextrosa adicionado con extracto de levadura y extracto de malta al 0.3% (CPDLM), e incubadas a  $25\pm 2$  °C y 125 rpm durante 10 días. Posteriormente el contenido fue filtrado y colocado en frascos estériles.

La actividad de inhibición de cada antagonista fue evaluada a concentraciones de 25, 50 y 100%. La técnica consistió en esparcir por extensión 100  $\mu$ L del antagonista, posteriormente, fue colocado un disco de 5 mm del crecimiento micelial del fitopatógeno en el centro de la caja Petri. Además, se confrontó cada antagonista con los dos hongos fitopatógenos al mismo tiempo, para lo cual se esparcieron 100  $\mu$ L del antagonista por el método de extensión en cajas e inmediatamente un disco del crecimiento micelial de cada hongo de 5 mm de diámetro fue colocado a una distancia de 4 cm entre ellos.

Se realizaron observaciones diarias durante cinco días, al final de los cuales se midió el crecimiento micelial de los hongos, cuando el crecimiento del control cubrió por completo la caja Petri.

### **3.2.6. Inhibición de la germinación de conidios y micelio**

Con base en los resultados preliminares se seleccionó la cepa M1-101 para la prueba de inhibición de la germinación de conidios y micelio de los hongos *F. meliae* y *L. theobromae* respectivamente. La cepa M1-101 se sembró en 50 mL de CPDLM mediante la adición de un cuadro de la cepa en agar de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> por cada matraz Erlenmeyer bafleado de 250 mL. Los matraces se incubaron en agitación a 125 rpm y 25  $\pm$  2  $^{\circ}$ C durante 10 días. Al término del periodo de incubación, se filtró al cultivo y el sobrenadante se diluyó hasta tener concentraciones de 25, 50 y 100%.

Para la preparación del inóculo de los hongos fitopatógenos se usaron cepas incubadas por 6 días en PDA. Se agregaron 10 mL de agua destilada estéril a cada caja Petri para resuspender los conidios de *F. meliae* y micelio de *L. theobromae* raspando la

superficie de la caja con un asa bacteriológica. El inóculo se conservó en tubos cónicos de 15 mL.

La actividad de inhibición de la germinación del antagonista fue evaluada a concentraciones de 25, 50 y 100%. La técnica consistió en extender con ayuda de un asa de vidrio, 100 µL de cada concentración en cada caja Petri. Después de absorción, se añadieron 100 µL del inóculo de los fitopatógenos de la solución previamente preparada (conidios y micelio) de los fitopatógenos. Se evaluaron tres réplicas de cada concentración y las cajas Petri se incubaron a  $25 \pm 2$  °C. Cada 24 horas se realizaron observaciones para ver la inhibición de la germinación de conidios y los posibles cambios en la morfología del micelio.

El recuento de conidios germinados y no germinados fue realizado usando un microscopio compuesto (Leica DM500). Se contabilizaron 100 conidios/cm<sup>2</sup>, contabilizando 500 conidios en total (germinados y no germinados). Para determinar el porcentaje de conidios germinados se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Germinación} = (a / a + b) \times 100$$

Donde:

a = número de conidios germinadas

b = número de conidios sin germinar

Con *L. theobromae*, sólo se observaron los cambios en la morfología del micelio inducido por la presencia de los compuestos antifúngicos producidos por el antagonista, a un nivel microscópico.

### 3.2.7. Sensibilidad a fungicidas

Se evaluó *in vitro* la capacidad inhibitoria de tres fungicidas comerciales contra los hongos patógenos *L. theobromae* y *F. meliae* (Cuadro 5). El efecto de cada fungicida fue evaluado en el crecimiento micelial en cajas Petri con el medio de cultivo PDA. La solución “stock” de cada fungicida fue preparada siguiendo las dosis recomendadas por los fabricantes: 3 g L<sup>-1</sup> de Captán, 0.6 g L<sup>-1</sup> de Agrimy Cú y 3.5 g L<sup>-1</sup> de Leal 800 (Cuadro 5) y luego adicionando 20 µL del “stock” por 20 mL de PDA, quedando finalmente a las concentraciones de 3, 0.6 y 3.5 µg mL<sup>-1</sup> respectivamente (El-Habbaa *et al.*, 2016). Cada uno de los fungicidas fue añadido al medio PDA esterilizado cuando éste alcanzó una temperatura aproximada de 45 a 50 °C. En cada caja Petri se colocó en el centro un disco de 0.5 cm del crecimiento micelial de los fitopatógenos. Se realizaron tres repeticiones de cada concentración.

**Cuadro 5.** Fungicidas probados *in vitro* contra *L. theobromae* y *F. meliae*.

<b>Producto comercial</b>	<b>Ingrediente activo</b>	<b>Modo de acción</b>
Captan	N-triclorometiltio-4ciclohexeno-1,2 dicarboximida	Inhibidores multi sitio
Agrimy Cú	Sulfato de estreptomicina + clorhidrato de oxitetraciclina +oxicloruro de cobre	Sistémico y de contacto
Leal 800	Clorotalonil+cymoxanil	Contacto

Las observaciones fueron realizadas cada 24 horas hasta que el crecimiento micelial del control sin fungicida cubrió por completo la caja Petri. El crecimiento radial micelial se midió al sexto día.

### **3.2.8. Análisis estadístico**

Se usó un diseño completamente al azar con 5 tratamientos y 3 repeticiones. La variable a considerar fue el crecimiento micelial (mm) de los patógenos. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar la efectividad media de cada tratamiento y una comparación de medias con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) con el programa estadístico SPSS 21.

### **3.3. RESULTADOS**

Se aislaron 70 cepas de microorganismos de las cuales 15 presentaron actividad inhibitoria; y de estas, 8 presentaban características típicas de actinobacterias, 5 bacterias bacilares y 2 hongos (Cuadro 6).

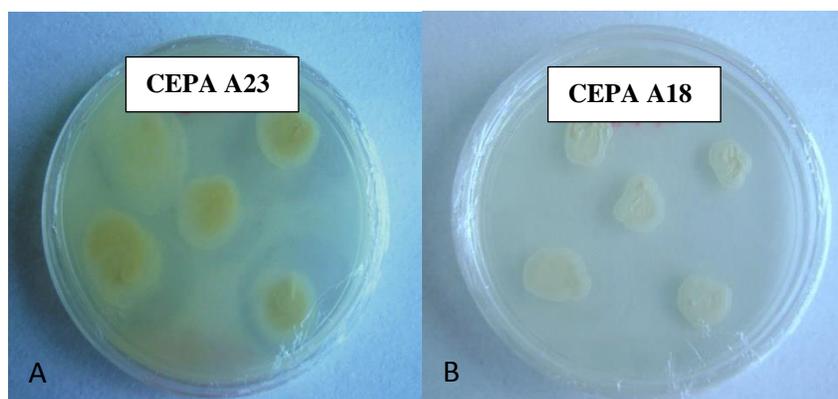
**Cuadro 6.** Microorganismos aislados de suelo en diferentes zonas del estado de Nuevo León con actividad antagónica.

<b>Cepas</b>	<b>Lugar de muestreo</b>	<b>Microorganismo</b>
A7	Mina	<i>Bacillus</i> sp.
A14	Mina	<i>Bacillus</i> sp.
A18	Mina.	<i>Bacillus</i> sp.
A20	Mina	<i>Bacillus</i> sp.
A23	Mina	<i>Bacillus</i> sp.
CH 102	La Ascensión	Actinomiceto
CH 103	La Ascensión	Actinomiceto
M 104	Marín	Hongo
M1-101	Marín	Actinomiceto
M2 R1	Mina	Actinomiceto
M2 R2	Mina	Actinomiceto
M3	Marín	Actinomiceto
M4	Marín	Actinomiceto
M4 R	Mina	Actinomiceto
M5-102	Marín	Hongo

### **3.3.1. Caracterización morfológica y genética de los actinomicetos y bacterias bacilares**

Las características de crecimiento colonial de los actinomicetos en cultivo fueron masas aéreas secas, polvosas, con bordes irregulares, de pigmentaciones variadas, observándose tonalidades de color amarillo, gris y otras de color anaranjado. Al microscopio (40X) mostraron las ramificaciones típicas de los actinomicetos. Por tinción Gram se observaron estreptobacilos esporuladas Gram positivos.

Con respecto a las bacterias, mostraron tonalidades variables, tales como amarillo y crema (Fig. 14), con textura acuosa y bordes regulares. Mediante tinción Gram se observaron bacilos Gram positivos.



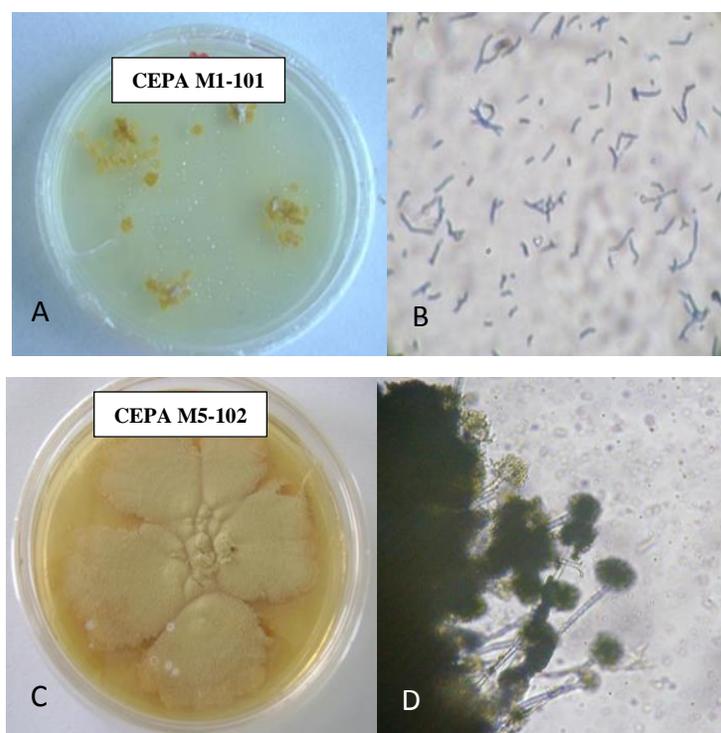
**Figura 14.** Bacterias aisladas del suelo. A) Cepa A23 mostrando halo de inhibición. B) Cepa A18.

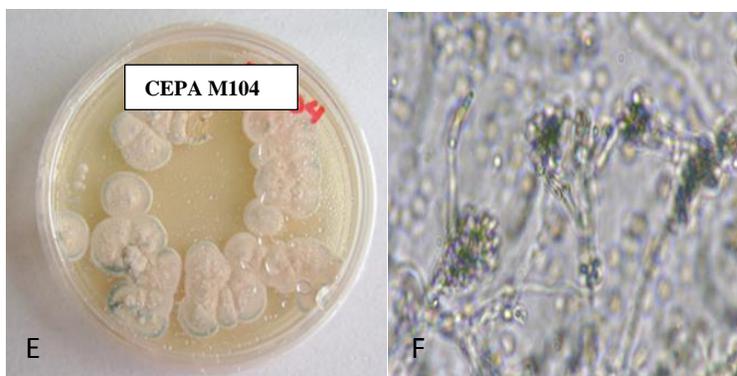
No se logró la identificación molecular de las cepas de actinomicetos por una falta de amplificación por PCR atribuida posiblemente a que los iniciadores han sido más utilizados con otras bacterias y tal vez no tengan la especificidad suficiente para unirse a las secuencias de actinomiceto.

Las bacterias bacilares obtenidas fueron amplificadas por PCR y se secuenció parte del gen 16S. Las secuencias consenso de las bacterias bacilares fueron comparadas con secuencias depositadas en el GenBank a través del programa Blast; la cepa A18 correspondió a *Achromobacter xylosoxidans* con un 96% de homología y A23 mostró 86% de similitud con *Delftia sp.* (Figs. 17-24).

### 3.3.2. Caracterización morfológica y genética de los hongos con actividad antifúngica

Las colonias de la cepa M104 en medio de cultivo fueron de color blanco, compactas y con bordes irregulares, y el micelio de la cepa M5-102 de color café. Con base en sus características morfológicas, la cepa M104 fue identificada como *Penicillium sp.* Las características del conidióforo mostraban forma de escobilla y conidios hialinos, unicelulares en forma cilíndrica. La cepa M5-102 presentó conidióforos y cabeza aspergilar, conidios hialinos, unicelulares y cilíndricos; esta cepa fue identificada como *Aspergillus sp.* (Fig. 15).





**Figura 15.** Hongos con actividad antifúngica. A) Colonias de la cepa M1-101 en PDA. B) Bacilos Gram positivos observados al microscopio. C) Cepa M5-102 en PDA. D) Conidióforos y cabezas aspergilar de *Aspergillus* sp. E) Cepa M104 en DPA. F) Conidióforos, fiálide y conidias de *P. citrinum*.

La identificación morfológica fue confirmada por PCR y secuenciación correspondiendo a *Aspergillus* sp. y *Penicillium citrinum* (Figs. 25-28)

### 3.3.3. Prueba de antagonismo *in vitro*

*Acromobacter xylooxidans* redujo el crecimiento micelial de *L. theobromae* 63% y a *F. meliae* 59%. Por otro lado, *Delftia* sp. inhibió en un 39% a ambos hongos fitopatógenos. *Aspergillus* sp. redujo 82% el crecimiento de *L. theobromae* y a *F. meliae* en un 83%. La cepa identificada como *P. citrinum* fue capaz de reducir el crecimiento micelial de *L. theobromae* en 83% manteniéndolo inhibido durante más 20 días.

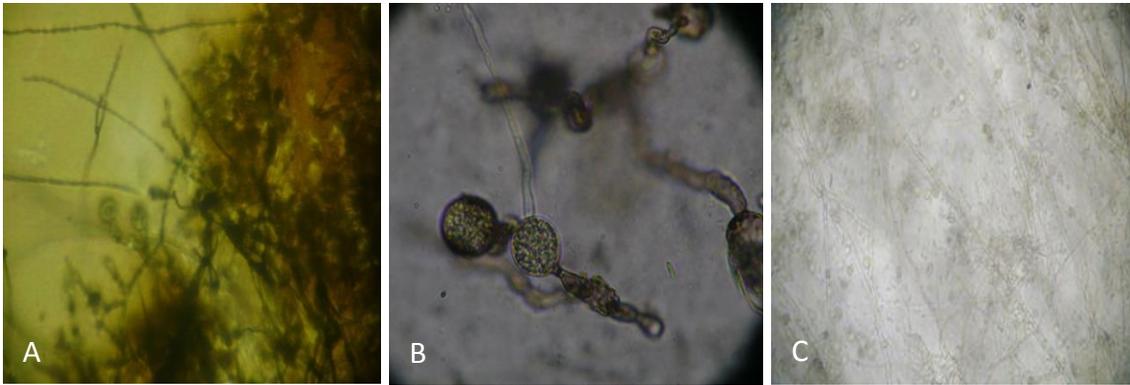
Los valores más altos de inhibición se obtuvieron el hongo *P. citrinum* (M104) y dos actinomicetos (M4R y M1-101), los cuales mostraron porcentajes de inhibición de 85, 84 y 91% contra *L. theobromae*; y contra *F. meliae* los resultados fueron de 91, 83 y 91% respectivamente.

En la prueba de inhibición con las diferentes concentraciones del actinomiceto y *P. citrinum* (25, 50 y 100%), hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.000$ ) en el porcentaje de inhibición de los patógenos. El control presentó el crecimiento micelial más alto a los 5 días, después de que los hongos se colocaron en PDA. Los hongos *L. theobromae* y *F. meliae* tuvieron un crecimiento similar, no mostrando diferencias significativas entre ellos. Los tratamientos que mostraron mayor inhibición de los patógenos fueron *L. theobromae* y *F. meliae* frente a *P. citrinum* al 100%, seguido por *L. theobromae* + *P. citrinum* y *F. meliae* + *P. citrinum* con la concentración al 100%. No hubo diferencias entre las tres concentraciones de la cepa M101 contra *F. meliae*.

#### **3.3.4. Inhibición de la germinación de conidios**

*L. theobromae* a las 96 horas de incubación cubrió por completo la caja Petri sin obtenerse ninguna estructura reproductiva. Sin embargo, en presencia del antagonista, *L. theobromae* produjo clamidosporas de color café oscuro, y células conidiógenas (Fig. 16).

Con la confrontación los conidios de *F. meliae* son inhibidos y no son capaces de germinar, se observó que los conidios se agrupan y engrosan tendiendo a formar clamidosporas (Fig. 16).



**Figura 16.** A. Células conidiógenas producidas por *L. theobromae*. B. Clamidosporas. C. Clamidosporas de *F. meliae*.

### 3.3.5. Control químico

*L. theobromae* no fue inhibido significativamente ( $p= 0.284$ ) por ninguno de los fungicidas a las dosis utilizadas, sin embargo, *F. meliae* fue inhibido en un 50 % por el fungicida clorotalonil + cymoxanil (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Inhibición del crecimiento micelial (mm) de *L. theobromae* y *F. meliae* expuestos a tres fungicidas *in vitro*.

Fungicidas	Ingrediente activo	Dosis $\mu\text{g mL}^{-1}$	% de crecimiento micelial (mm)	
			<i>L. theobromae</i>	<i>F. meliae</i>
Captan	Dicarboximida	3	91	99
Agrimy Cú	Oxicloruro de cobre + Clorhidrato de Oxitetraciclina+ Estreptomicina	0.6	92	84
Leal 800	Clorotalonil+ Cymoxanil	3.5	87	50
Control	Solo PDA	0	100	100

### 3.4. DISCUSIÓN

En este estudio la bacteria *A. xylosoxidans* fue efectiva en reducir el crecimiento de *L. theobromae* y *F. meliae in vitro*. La capacidad que presentó esta bacteria de biocontrolar estos patógenos es comparable con los resultados reportados por Moretti *et al.* (2008), quienes usaron esta bacteria para controlar a *Fusarium oxysporum* causante del marchitamiento del tomate. Bagheri y Ahmadzadeh (2016) también reportaron que *A. xylosoxidans* puede inhibir a *Curvularia lunata* y *Bipolaris sorokinian* presentes en el cultivo de trigo.

Por otro lado, algunas especies del género *Delftia* han sido reportadas por Han *et al.* (2005) inhibiendo a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Pyricularia*

*oryzae*. Adicionalmente, estas bacterias desempeñan un papel importante en tecnologías de biorremediación (Ubalde *et al.*, 2012). Jorgensen *et al.* (2009) citan a *Delftia* con capacidad de romper los enlaces glicosídicos en la quitina y los péptidoglucano, con lo cual pudieran mostrar mayor capacidad de inhibición de los hongos fitopatógenos como los usados por nosotros en este estudio.

Por lo general, las especies del genero *Aspergillus* están consideradas como hongos saprófitos u oportunistas (Cortés y Mosqueda, 2013). Algunas razas de *Aspergillus* sp. son consideradas como atoxigénicas debido a que no producen aflatoxinas y han sido registradas como cepas biocontroladoras, cuyo mecanismo de acción es la exclusión competitiva (Cotty, 1994). Debido a esas cualidades, una cepa de *Aspergillus* fue formulada y ha sido exitosamente comercializada como agente de biocontrol de la especie *Aspergillus flavus* productora de aflotoxina (Dorner, 2009).

En este estudio *Aspergillus* sp. produjo sustancias fungistáticas capaces de inhibir el crecimiento de *L. theobromae* y *F. meliae*. Estos resultados son confirmados por los hallazgos obtenidos por Adeniyi *et al.* (2013) quienes reportaron a *A. niger* como agente biocontrolador de *L. theobromae*, aunque sugieren que se debe explotar su potencial en otros fitopatógenos y manejar los posibles efectos adversos en los cultivos.

A pesar de que el hongo *P. citrinum* puede causar enfermedades en cultivos en campo y productos postcosecha (Marquardt, 1996), de acuerdo con nuestros resultados, algunas especies de *Penicillium* también poseen potencial de inhibir patógenos. Estos resultados pueden ser explicados de acuerdo con Quiroz *et al.* (2008), quienes reportaron que diferentes especies de hongos poseen mecanismos tanto de antagonistas como patógenos.

De las 15 cepas que se aislaron y evaluaron, se obtuvo como resultado que los actinomicetos mostraron los valores más altos de inhibición (M4 R y M1-101), siendo M1-101 la cepa con mayor actividad antagónica, con porcentajes de inhibición contra *L. theobromae* y *F. meliae* de 84 y 91% respectivamente. Sánchez *et al.* (2011) y Wang *et al.* (2015) aislaron actinomicetos con capacidad de inhibir a fitopatógenos de importancia agrícola como *Fusarium equiseti*.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la habilidad de los microorganismos para inhibir patógenos, puede ser incrementada o disminuida, dependiendo de las condiciones de las estructuras de sobrevivencia que puedan producir los últimos, y que el antagonista logra reducir su crecimiento por la producción de compuestos antifúngicos o exclusión competitiva.

Tovar *et al.* (2013) reportan que *Lasiodiplodia* sp. y otras especies pertenecientes a la familia Botryosphaeriaceae han mostrado sensibilidad a algunos fungicidas. Mientras que Syed *et al.* (2014) han reportado que Carbendazim y Benzimidazol fueron incapaces de reducir el crecimiento de *L. theobromae* a bajas concentraciones. Esto puede explicar una de las posibles causas de la nula inhibición de *L. theobromae* con los fungicidas utilizados en este estudio. Estos resultados también sugieren que bajo condiciones de prueba *in vitro*, *L. theobromae* presenta un rápido crecimiento, puesto que al quinto día el control fue capaz de cubrir por completo la caja Petri, así como también la virulencia y resistencia del patógeno.



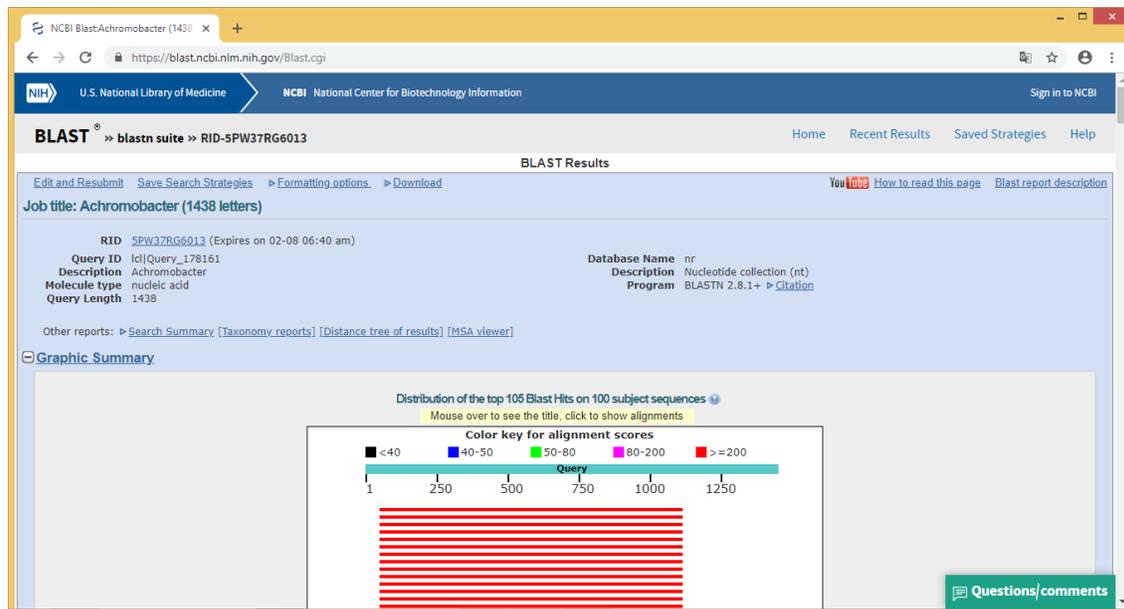


Figura 18. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de *Achromobacter xylosoxidans* del estado de Nuevo León con el primer 8F.

Sequences producing significant alignments:

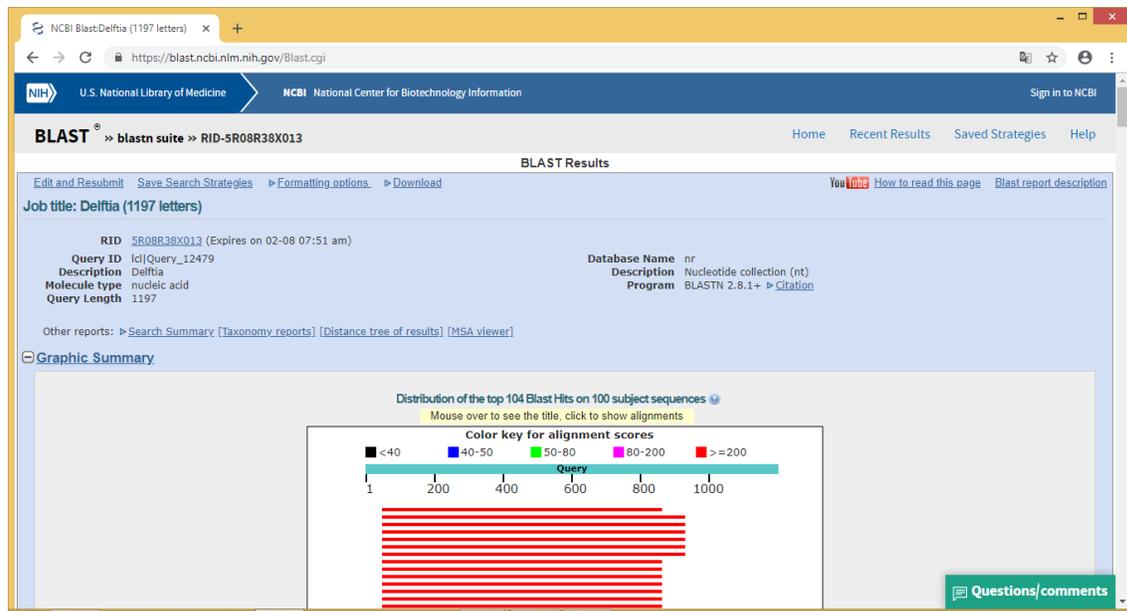
Select: All None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<a href="#">Achromobacter xylosoxidans strain E2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1797	1797	73%	0.0	96%	<a href="#">MK346041.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. API69 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1792	1792	73%	0.0	96%	<a href="#">KC010532.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. VA5 partial 16S rRNA gene, strain VA5</a>	1792	1792	73%	0.0	96%	<a href="#">FN794206.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. NT 5-04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1786	1786	73%	0.0	96%	<a href="#">KM253142.1</a>
<a href="#">Achromobacter xylosoxidans strain M2E7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1786	1786	73%	0.0	96%	<a href="#">KJ569364.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. LS-058 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1786	1786	73%	0.0	96%	<a href="#">KF870441.1</a>
<a href="#">Bacterium Ank26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1786	1786	73%	0.0	96%	<a href="#">HQ662224.1</a>
<a href="#">Uncultured Achromobacter sp. clona F4oct 53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1786	1786	73%	0.0	96%	<a href="#">GQ415969.1</a>
<a href="#">Achromobacter animicus partial 16S rRNA gene, strain CCUG 61967</a>	1783	1783	73%	0.0	96%	<a href="#">HG423440.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. BF07R04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1783	1783	73%	0.0	96%	<a href="#">KC195880.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. A3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1779	1779	73%	0.0	96%	<a href="#">KT316387.1</a>
<a href="#">Achromobacter animicus partial 16S rRNA gene, strain CCUG 61965</a>	1779	1779	73%	0.0	96%	<a href="#">HG423439.1</a>
<a href="#">Achromobacter pulmonis strain W13101 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1779	1779	73%	0.0	96%	<a href="#">KJ676963.1</a>
<a href="#">Achromobacter animicus strain R-46662 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1779	1779	73%	0.0	96%	<a href="#">NR_117615.1</a>
<a href="#">Achromobacter xylosoxidans strain BGR1 FBC SK18-T17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1775	1775	73%	0.0	96%	<a href="#">MK332530.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. strain QS16-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1775	1775	73%	0.0	96%	<a href="#">MH769438.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. strain CS16-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1775	1775	73%	0.0	96%	<a href="#">MH769374.1</a>
<a href="#">Achromobacter xylosoxidans strain GCCSB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1775	1775	73%	0.0	96%	<a href="#">MK000624.1</a>
<a href="#">Achromobacter sp. strain 79X4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1775	1775	73%	0.0	96%	<a href="#">KC302621.1</a>
<a href="#">Achromobacter xylosoxidans strain KBOR9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	1775	1775	73%	0.0	96%	

Figura 19. Similitud de la secuencia de ADN de *Achromobacter xylosoxidans* de un aislamiento del estado de Nuevo León con secuencias del GenBank.





**Figura 22.** Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de *Delftia* sp. del estado de Nuevo León con el primer 8F.

Sequences producing significant alignments:

Select: **All** None Selected: 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0036-T191-S-NIPCRAMoANb_000653 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	896	896	67%	0.0	86%	HQ755244.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0036-T191-S-NIPCRAMoANb_000246 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	73%	0.0	84%	HQ754827.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0034-T174-S-NIPCRAMoANb_000385 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	73%	0.0	84%	HQ753130.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0029-T142-S-NIPCRAMoANa_000533 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	73%	0.0	84%	HQ750724.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0029-T142-S-NIPCRAMoANa_000110 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	73%	0.0	84%	HQ750301.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0029-T142-S-NIPCRAMoANa_000001 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	891	891	73%	0.0	84%	HQ750192.1
<input type="checkbox"/> <i>Delftia acidovorans</i> strain S1-36-16S ribosomal RNA gene, partial sequence	889	889	73%	0.0	84%	MF111515.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0036-T191-S-NIPCRAMoANb_000301 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	885	885	67%	0.0	86%	HQ754882.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0032-T156-S-NIPCRAMoANb_000060 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	874	874	67%	0.0	85%	HQ752136.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0034-T174-S-NIPCRAMoANb_000279 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	870	870	67%	0.0	85%	HQ753024.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0038-T189-S-NIPCRAMoANb_000589 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ756407.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0038-T189-S-NIPCRAMoANb_000583 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ756401.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0038-T189-S-NIPCRAMoANb_000008 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ755826.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0038-T191-S-NIPCRAMoANb_000508 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ755089.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0036-T191-S-NIPCRAMoANb_000412 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ754993.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0036-T191-S-NIPCRAMoANb_000350 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ754931.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0038-T191-S-NIPCRAMoANb_000329 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ754910.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0034-T174-S-NIPCRAMoANb_000425 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ753170.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0034-T174-S-NIPCRAMoANb_000346 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%	0.0	85%	HQ753091.1
<input type="checkbox"/> Uncultured organism clone ELU0032-T156-S-NIPCRAMoANb_000340 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	869	869	67%			

**Figura 23.** Similitud de la secuencia de ADN de *Delftia* sp. de un aislamiento del estado de Nuevo León con secuencias del GenBank.

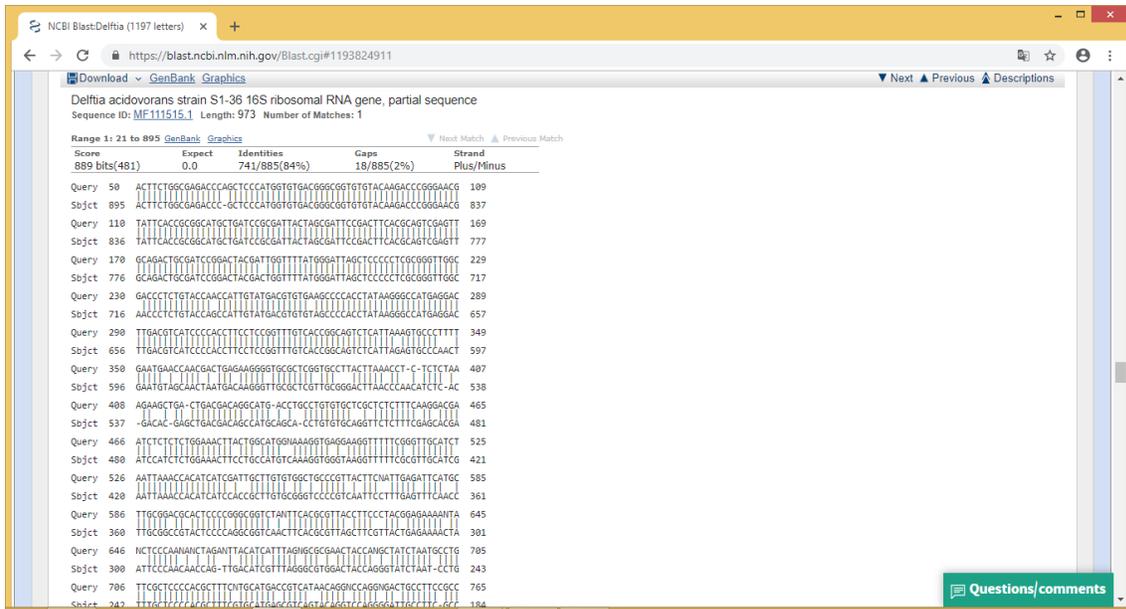


Figura 24. Similitud de la secuencia de ADN de *Delftia sp.* de un aislamiento de Nuevo León con la secuencia de la accesión MF111515.1 del GenBank.

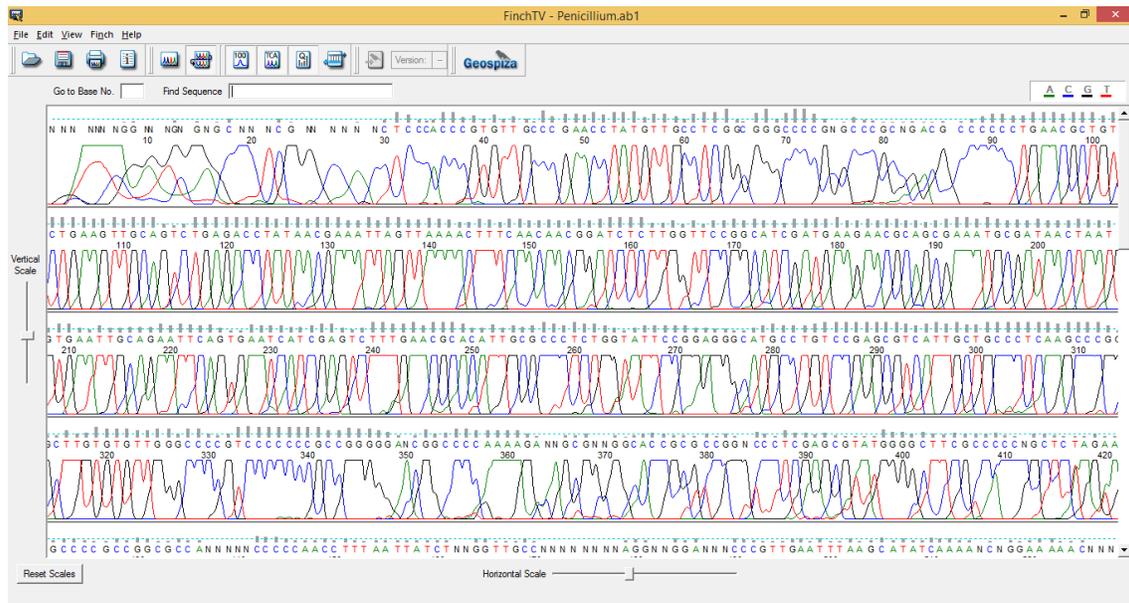


Figura 25. Electroferograma de ADN de un aislamiento de *Penicillium citrinum* del estado de Nuevo León con el primer ITS-1fu.

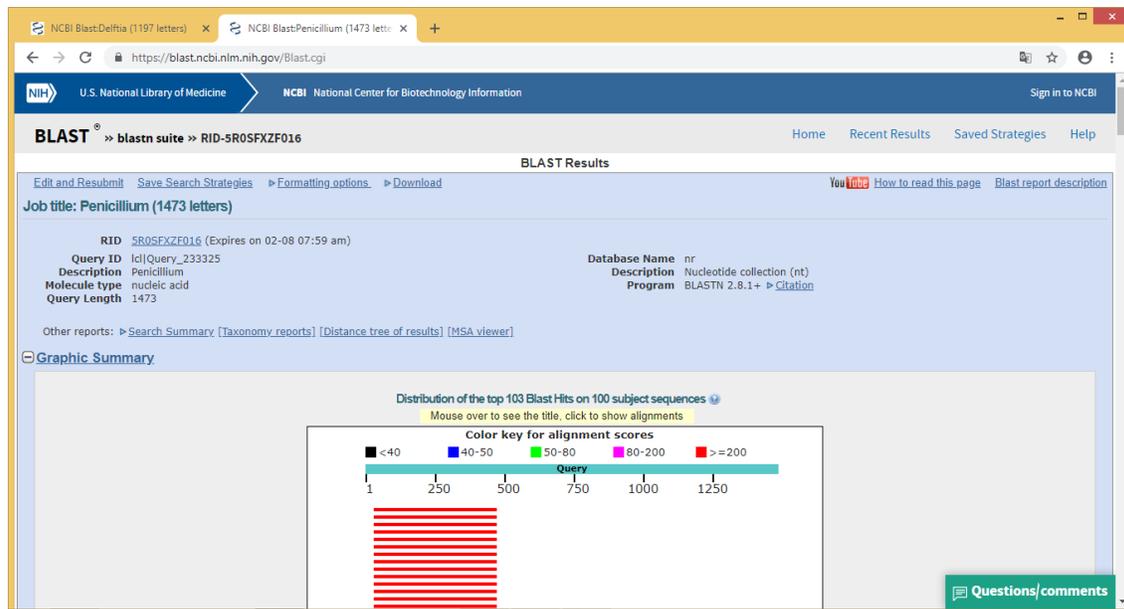


Figura 26. Alineamiento BLAST de la secuencia de ADN de un aislamiento de *Penicillium citrinum* del estado de Nuevo León con el primer ITS-1fu.

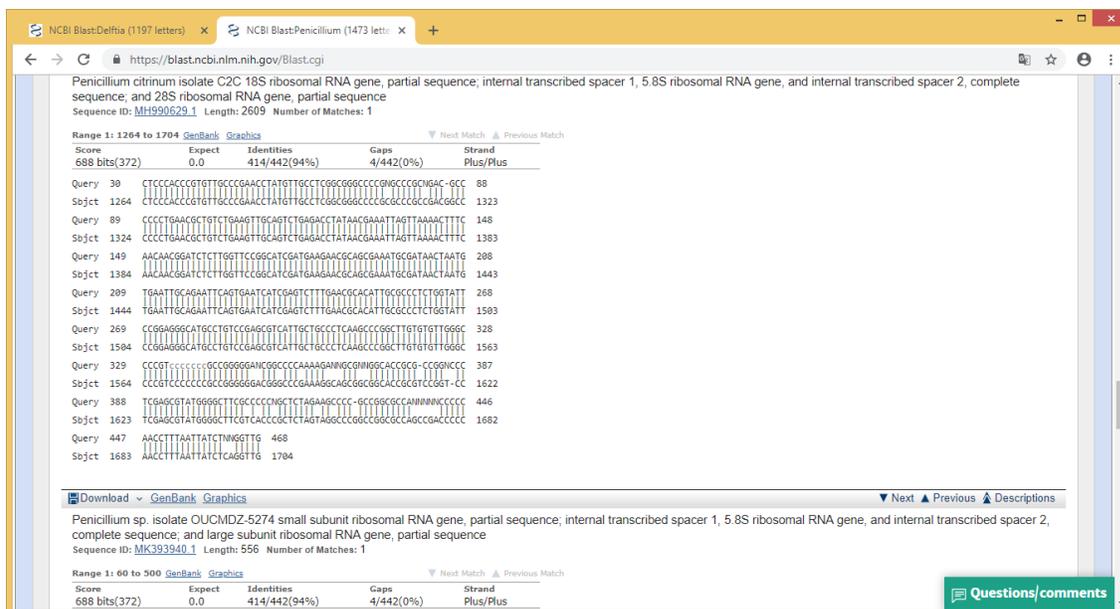
Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate C2C 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH990629.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium</i> sp. isolate OUCMDZ-5274 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK393940.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate 580827 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK387972.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium</i> sp. isolate Z-Y-58 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK367505.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium</i> sp. isolate OUCMDZ-5020 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK358957.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> strain UIMAGOD17 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH091068.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> strain ercha16 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK290862.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> strain ercha5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK288153.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate TY4-1 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH059538.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate TJ5-11 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH059536.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate FMS78 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH244407.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate FMS77 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH244406.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate FMS76 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH244405.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate FMS53 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH244391.1
<input type="checkbox"/> <i>Asteroides</i> sp. YX-6A internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK236612.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate BPT_06 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK229349.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium</i> sp. strain SQUCC13801 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MH368557.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate Seq_MEL-16 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK188658.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium citrinum</i> isolate AC24 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK188658.1
<input type="checkbox"/> <i>Penicillium oriseofulvum</i> isolate 8 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene	688	688	29%	0.0	94%	MK188658.1

Figura 27. Similitud de la secuencia de ADN de *Penicillium citrinum* de un aislamiento del estado de Nuevo León con secuencias del GenBank.



**Figura 28. Similitud de la secuencia de ADN de *Penicillium citrinum* de un aislamiento de Nuevo León con la secuencia de la accesión MH990629.1 del GenBank.**

### 3.7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah, M.E., Haroun, S.A., Gomah, A.A., El-Naggar, N.E., and Badr, H.H. 2013. Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 46: 1797-1808.

Adeniyi, D.O., Adedeji, A.R., Oduwaye, O.F., and Kolawolw, O.O. 2013. Evaluation of biocontrol agents against *Lasiodiplodia theobromae* causing inflorescence blight of cashew in Nigeria. *Journal of Agriculture and Veterinary Science* 5: 46-48.

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 Disease* 98: 55–61.

Agrios, G. 2005. *Plant Pathology*. 5th edition. Elsevier Academic Press, Nueva York. 922 p.

Álvarez, L.A. 2015. Eficacia fungicida en el control de *Lasiodiplodia theobromae* en plantas de palto (*Persea americana*) con el uso del bioestimulante a base de algas Fertimar. *Plagas y Enfermedades*. VIII Congreso Mundial de la Palta 135-140. [www.wacperu2015.com](http://www.wacperu2015.com) fecha de consulta: 19/05/2017.

Badii, M.H., y Abreu, J.L. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience* 1: 82-89.

Bagheri, N. and Ahmadzadeh, M. 2016. First report of *Acromobacter xyloxidans* on wheat rhizosphere in Iran and its biocontrol activity. *Sci. Agri.* 16: 36-42.

- Barnett, H. and Hunter, B. 1998. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. The American Phytopathological Society. Minnesota 4<sup>th</sup> Ed. 217p.
- Cano, M.A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Rev. U.D.C.A. y Div. Cient.* 14: 15-31.
- Carisse, O., El Bassam, S., and Benhamou, N. 2001. Effect of *Microsphaeropsis* sp. strain P130A on germination and production of sclerotia of *Rhizoctonia solani* and interaction between the antagonism and the pathogen. *Phytopathology* 91:782-791.
- Cheng, C.H., Yang, C.A., Cheng, P.K. 2012. Antagonism of *Trichoderma harzianum* ETS 323 grown in the presence of deactivated *Botrytis cinerea* mycelium in culture conditions. *Phytopathology* 102: 1054-1063.
- Cortés, S.A.D. y Mosqueda, O.T. 2013. Una mirada a los organismos fúngicos: Fábricas versátiles de diversos metabolitos secundarios de interés biotecnológico. *Revista Química Viva* 2: 64-90.
- Cotty, P.J. 1994. Influence of field application of an atoxigenic strain of *Aspergillus flavus* on the populations of *A. flavus* infecting cottonbolls and on the aflatoxin content of cottonseed. *Phytopathology* 84:1270-1277.
- Dávila, M. M.D., Gallegos, M.G., Hernández, C.D., Ochoa, F.Y.M. y Flores, O.A. 2013. Actinomicetos antagonísticos de importancia agrícola. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4: 1187-1196.
- Dorner, J.W. 2009. Biological control of aflatoxin contamination in corn using a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection* 72: 801-804.
- El-habaa, G.M., Abdou, M.M.M., Mohamed, F.G., and El-Shaery, S.A. 2016. Biological and chemical control of grapevine die-back disease and their effect on defense related enzymes. *International Journal of Scientific & Engineering Research* 7: 345- 351.
- Ferrera, C.F. y Alarcón, A. 2001. La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *Ciencia Ergo Sum* 8: 175-183.
- Han, J., Sun, L., Dong, X., Cai, Z., Sun, X., Yang, H., Wang, Y., and Song, W. 2005. Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. *Syst Appl Microbiol.* 28:66-76.
- Jorgensen, N.O.G., Brandt, K.K., Nybroe, O., and Hansen, M. 2009. *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan degrading bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59: 2195-2199.
- Lee, C.H., Kim, B.J., Choi, G.J., Cho, K.Y., Yang, H., Shin, C., Min, S., and Lim, Y. 2002. *Streptomyces* with antifungal activity against rice blast causing fungus *Magnaporthe grisea*. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 12: 1026-1028.

- Lerma, C.J., Ibarra, T.A., Galván, G.V., Martínez, D.J., Rodríguez, R.G., Tellez, G.V., Fernández, S.C., Núñez, G.M. y Galicia, C.J. 2015. Situación de la Citricultura en Nuevo León. Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León. OEIDRUS, N.L. Washington 2000, 82 p.
- Marquardt, R.R. 1996. Effects of molds and their toxins on livestock performance: a western Canadian perspective. *Anim. Feed Sci. Tech.* 58: 77-89.
- Moretti, M., Giladi, G., Gullino, M.L., and Garibaldi, A. 2008. Biological control of *Achromobacter xylosoydans* for suppressing Fusarium wilt of tomato. *International Journal of Botany* 4: 369-375.
- Mutawila, C., Fourie, P.H., Halleen, F., and Mosteri, L. 2011. Grapevine cultivar variation to prunnin wound protection by Trichoderma species against trunk pathogens. *Phytopathology Mediterranea* 50: 274-276.
- Orozco, S.M., Robles, G.M., Velázquez, M.J.J., Manzanilla, R.M.A., Hernández, F.L.M., Manzo, S.G., y Nieto, A.D. 2013. Manejo integrado de las principales plagas y enfermedades en limón mexicano y limón persa. *Memorias IX Simposio Internacional Citrícola*. Pp. 113-171.
- Oskay, M., Usume, T.A., and Azeri, C. 2004. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Tuley. *African Journal of Biotechnology* 3: 441-446.
- Pazos, R.L.A., Marín, C.V., Morales, G.Y., Báez, A., Villalobos, L.M., Pérez, S.M. y Muñoz, R.J. 2016. Uso de microorganismos benéficos para reducir los daños causados por la revolución verde. *Revista Iberoamericana de Ciencias* 3: 72-85.
- Pérez, C.D.A., García, G.N.Y., Gallegos, M.G., Ruiz, C.M.F., Berlanga, R.D.I. y Rios, V.C. 2015 Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagónicos a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 6:1629-1638.
- Phillips, A.J.L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M.J., Groenewald, J.Z., and Crous, P.W. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Micology* 76: 51-167.
- Pitt, J. and Hocking, A. 2009. *Fungi and Food Spoilage*. Third edition. Springer Science. New York, NY, USA. Pp.:208-210.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev. Iberoam. Micol.* 25: 78-82.
- Quiñones, A.E.E., Evangelista, M.Z. y Rincón, E.G. 2016. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. *Elementos* 101: 59-64.
- Quiroz, S. V.F., Ferrera, C.R., Alarcón, A., Lara, H.M.E. 2008. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo de ajo. *Revista Mexicana de Micología* 26: 27-34.
- Rodríguez, G.E., Guerrero, P., Barradas, C., Crous, P.W., and Alves, A. 2016. Phylogeny and pathogenicity of *Lasioidiplodia* species associated with dieback of mango in Peru. *Fungal Biology* 6:1-14.

- Sacchi, C.T., Whitney, A.M., Mayer, L.W., Morey, R., Steigerwalt, A., Boras, A., Weylant, R.S., and Popovic. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for the identification of *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Disease* 8: 1117-1122.
- Sánchez, O.M.R., Sánchez, P.S.R., Gallegos, M.G., y Sánchez, A.A. 2011. Actividad inhibitoria de actinomicetos aislados de hormigas cultivadoras de hongos (Hymenoptera:Formicidae) sobre *Colletotrichum lindemuthianu*, y *Rhizoctonia solani*. *Revista Agraria* 8: 14-17.
- Sreevidya, M. and Gopalakrishnan, S. 2012. Bacteria and Actinomycetes as Biocontrol Agents for the Control of Fungal of Chickpea and Sorghum. *International Crops Research Institute for the Semi Arid Tropics*. 293 p.
- Syed, R.N., Mansha, N., Khaskheli, M.A., Khanzada, M.A., and Lodhi, A.M. 2014. Chemical control of stem and rot of mango caused by *Lasiodiplodia theobromae*. *Pak. J. Phytopathol.* 26: 201-206.
- Tovar, P. J.M., Mora, A. J.A., Nava, D.C., Téliz, O.D., Villegas, M.A., and Leyva, M.S.G. 2013. Control of *Lasiodiplodia theobromae*, the causal agent of dieback of sapote mamey [*Pouteria sapota* (Jacq.) H. E. Moore and Stern] grafts in Mexico. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 233-238.
- Ubalde, M.C., Braña, V., Sueiro, F., Morel, M.A., Martínez, R.C., Marquez, C., and Castro, S.S. 2012. The iof *Delftia* sp. Isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. *Current Microbiology* 64:597 – 603.
- Wang, L., Xing, M., Di, R., and Luo, Y. 2015. Identification and antifungal activities of *Streptomyces aureoverticillatus* HN6. *J. Plant Pathol. Microb.* 6: 281.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. *PCR Protocols: A Guide to Methods 27 and Applications*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 315-322.
- Wu, W. Huang, H., Ling, Z., Yu, Z., Jiang, Y., Liu, P., and Li, X. 2015. Genome sequencing reveals mechanisms for heavy metal resistance and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Delftia lacustris* strain LZ-C. *Ecotoxicology* 25: 234–247.