

Distribution, incidence and severity of the dieback (*Lasiodiplodia* spp.) in persa lime in Morelos, Mexico

Distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa en Morelos, México

Mairel Valle-De la Paz, Escuela Superior de Ciencias Naturales, UAGro, Avenida Universidad S/N, Ex Rancho El Shalako, Carretera Nacional Chilpancingo-Petaquillas, Guerrero, México. C.P. 39105; **Dagoberto Guillén-Sánchez***, Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc (EESuX), UAEM, Av. Nicolás Bravo S/N, Parque industrial Cuautla, Ayala, Morelos; **Daniel Perales-Rosas**, **Víctor López-Martínez**, **Porfirio Juárez-López**, Facultad de Ciencias Agropecuarias. UAEM. Avenida Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209; **Edgar Martínez-Fernández**, CIB, UAEM, Avenida Universidad No. 1001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209; **Marianguadalupe Hernández-Arenas**, INIFAP, C. E. - Zacatepec, Carretera Zacatepec-Galeana Km 0.5, Zacatepec, Morelos, México; **Rafael Ariza-Flores**, INIFAP, C. E. - Iguala. Carretera Iguala-Tuxpan Km 2.5, Tuxpan, Iguala de la Independencia, Guerrero, México C.P. 40000; **Adriana Rosalía Gijón-Hernández**, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales-INIFAP, Coyoacán. CDMX.*Autor para correspondencia: dagoguillen@yahoo.com.

Recibido: 14 de Abril, 2019.

Aceptado: 13 de Agosto, 2019.

Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Perales-Rosas D, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández E, Hernández-Arenas M, Ariza-Flores R and Gijón-Hernán AR. 2019. Distribution, incidence and severity of dieback (*Lasiodiplodia* spp.) in persa lime in Morelos, Mexico. Mexican Journal of Phytopathology 37(3): 464-478.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1904-7

Primera publicación DOI: 30 de Agosto, 2019.

First DOI publication: August 30, 2019.

Resumen. Se determinó la distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en lima persa (*Citrus latifolia*) en 46 huertos de seis años de edad, 25 árboles por huerto en los municipios de Amacuzac (7 huertos), Ayala

Abstract. The distribution, incidence and severity damage caused by the dieback complex (*Lasiodiplodia* spp.) in Persian lime (*Citrus latifolia*) was determined in 46 orchards of six average years old, 25 trees per orchard in the municipalities of Amacuzac, Ayala, Coatlan del Rio, Cuautla, Jantetelco, Jonacatepec, Puente de Ixtla, Tepalcingo and Tlaltizapan of Zapata, Morelos State, Mexico. Incidence was evaluated according to the number of plants having symptoms of dieback. There were four levels of severity, where 0= healthy tree, 1= gum exudation, 2= cracking with exposure of internal tissue and 3= well-defined canker and branch dieback. Which were transformed to a percentage of means of a scale of three levels of severity, transforming to a percentage of infection using the Townsend and

(4), Coatlán del Río (9), Cuautla (1), Jantetelco (5), Jonacatepec (1), Puente de Ixtla (5), Tepalcingo (3) y Tlaltizapán de Zapata (11), del estado de Morelos, México. La incidencia fue determinada con base al número de plantas enfermas y la severidad mediante escala de daño de cuatro clases: 0= árbol sano, 1= exudación de goma, 2= agrietamiento con exposición de tejidos internos y 3= cancro bien definido y muerte descendente de ramas. La severidad fue transformada a porcentaje de infección con la fórmula de Townsend y Heuberger, analizados por Kruskal Wallis y separados por la comparación de medias, prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) y $p<0.0001$ en incidencia y severidad. La enfermedad se registró en el 78% de los huertos, con incidencias de 31.8 a 100% y severidades de 30.0 al 100%. Los huertos con menor incidencia y severidad fueron los ubicados en Amacuzac, Ayala, Coatlán del Río y Tlaltizapán de Zapata.

Palabras clave: *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia citricola*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Citrus latifolia*.

México ocupa el segundo lugar y participa con el 21% de la producción en el mundo de limón mexicano (*Citrus aurantifolia*) y lima persa (*Citrus latifolia*), con una producción de 627.4 miles de t (FAOSFAT, 2018), donde el 70% del total se destina al mercado nacional y el resto al mercado de exportación, principalmente a los Estados Unidos de América. En el 2016 se tuvo una producción de 2'439,477 t de lima persa, destacando Veracruz (717,014 t), Michoacán (619,612 t) y Oaxaca (263,448 t); Morelos ocupa el doceavo lugar con una producción de 3,880 t y actualmente cuenta con 612 ha plantadas en 17 municipios, donde destaca el limón (32%) y la naranja Valencia (66%) de la superficie total establecida y, un rendimiento de 12.1 y 7.7 t ha⁻¹ respectivamente (SIAP, 2018).

Heuberger equation. Data were analyzed through the Kruskal Wallis test and Tukey ($\alpha=0.05$) and $p<0.0001$ in incidence and severity. There was a high incidence of dieback on stems 78% of Persian lime trees. The incidence and severity of dieback of Persian trees on different orchards had a range of 31.8 to 100% and 30 to 100%, respectively. By the other hand, municipalities such as Amacuzac, Ayala, Coatlán del Río and Tlaltizapán, had the lowest levels of incidence and severity of dieback.

Key words: *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia citricola*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *Citrus latifolia*.

Mexico ranks second in Mexican lemon (*Citrus aurantifolia*) and Persian lime (*Citrus latifolia*) production and accounts for 21% of production worldwide with 627.4 thousand tons (FAOSFAT, 2018), from which 70% of the total production is used to supply the national market and the rest is exported mainly to United States. In 2016, Mexico produced 2'439,477 ton of Persian lime mostly in the states of Veracruz (717,014 t), Michoacán (619,612 t) and Oaxaca (263,448 t); Morelos is in twelfth place with 3,880 ton and currently has 612 ha sown to citrus in 17 municipalities, where lemon (32%) and Valencia orange (66%) prevail on the established area and yield 12.1 and 7.7 ton ha⁻¹, respectively (SIAP, 2018).

However, Persian lime trees are affected by fungal diseases that infect roots, trunk, foliage and fruits, and cause production losses (Christensen, 2017). In Morelos, it was thought that the death of trees was caused by gummosis (*Phytophthora parasitica*), since it had been reported in the states of Colima and Tabasco, where symptoms of gum secretion and rot of the foot caused the death of ungrafted and grafted rootstock citrus trees and, consequently, the elimination of orchards (Acosta-

No obstante, los árboles de lima persa presentan enfermedades fungosas en raíces, tronco, follaje y frutos, que causan pérdidas al cultivo (Christensen, 2017). En Morelos se asumía que la muerte de árboles era ocasionada por la gomosis (*Phytophthora parasitica*), debido a que fue reportada en los estados de Colima y Tabasco, causando síntomas de secreción de goma y pudrición del pie, llegando a ocasionar la muerte de árboles de cítricos de pie franco e injertado, provocando la eliminación de huertas (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Vidales 1982). No obstante, existen varios géneros de hongos de la familia Botryosphaeriaceae considerados como patógenos endófitos muy agresivos, que a menudo matan gran parte de su hospedante después del daño físico, generalmente cuando se encuentra en estrés, otros síntomas que causan son manchas foliares, pudriciones de frutas, muerte descendente, gomosis, canchales perennes y finalmente la muerte en especies económicamente importantes de cultivos perennes leñosas y plantas ornamentales, así como especies de árboles forestales nativas e introducidas (Mohali *et al.*, 2007; Slippers and Wingfield, 2007).

Estudios recientes citan a especies del género *Lasiodiplodia* causando enfermedades en el trópico en cultivos importantes como cacao (*Theobroma cacao*), aguacate (*Persea americana*), papaya (*Carica papaya*), caucho (*Hevea brasiliensis*), chirimoya (*Annona cherimola*), durazno (*Prunus persica*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), uvas (*Vitis vinifera*) y cítricos (Picos-Muñoz *et al.*, 2015). Valle-De la Paz *et al.* (2019) reportan la presencia de al menos tres especies del género *Lasiodiplodia* (*L. theobromae*, *L. citricola* y *L. pseudotheobromae*), causando gomosis, muerte descendente de ramas y la muerte de árboles de lima persa en Morelos. Sin embargo, se desconoce la distribución e impacto de estos patógenos en huertas comerciales de lima persa en la entidad. Por lo tanto, el ob-

Pérez *et al.*, 2012; Vidales 1982). However, there are several fungi genera of the Botryosphaeriaceae family that are considered to be very aggressive endophyte pathogens that often kill most of their host after causing physical damage, usually when under stress; another symptoms are foliar spots, fruit rot, dieback, gummosis, perennial canker and, finally, the death of economically important species of woody perennial crops and ornamental plants, as well as species of native and introduced forest trees (Mohali *et al.*, 2007; Slippers and Wingfield, 2007).

Recent studies cite species of *Lasiodiplodia* genus in the tropic that cause diseases in important crops such as cocoa (*Theobroma cacao*), avocado (*Persea americana*), papaya (*Carica papaya*), natural rubber (*Hevea brasiliensis*), chirimoya (*Annona cherimola*), peach (*Prunus persica*), sugarcane (*Saccharum officinarum*), grape (*Vitis vinifera*) and citrus (Picos-Muñoz *et al.*, 2015). Valle-De la Paz *et al.* (2019) reported the presence of at least three species of *Lasiodiplodia* (*L. theobromae*, *L. citricola* and *L. pseudotheobromae*) genus that cause gummosis, dieback of branches and the death of Persian lime trees in Morelos. However, the distribution and impact of these pathogens in lime commercial crops in Morelos is unknown. Therefore, the objective of this study was to determine the distribution, the incidence and the severity of dieback caused by the complex of *Lasiodiplodia* spp. in Persian lime orchards in Morelos.

Samples were collected in 46 Persian lime orchards from September 2014 to August 2015 (Figure 1). In order to identify the species, according to Valle-De la Paz *et al.* (2019), 46 samples were taken from primary and secondary branches, as well as from trunks showing disease symptoms; the 15 monosporic isolates obtained from the samples were re-sown in V8-Agar medium. The

jetivo fue determinar la distribución, incidencia y severidad de la muerte descendente ocasionada por el complejo de especies de *Lasiodiplodia* spp., en plantaciones de lima persa en Morelos.

Se realizó un muestreo en 46 huertos de lima persa en el período de septiembre de 2014 a agosto del 2015 (Figura 1). Para la identificación de las especies por Valle-De la Paz *et al.* (2019) se tomaron 46 muestras de ramas primarias, secundarias y troncos con síntomas de la enfermedad, de los que se obtuvieron 15 aislamientos monospóricos, los cuales fueron resembrados en medio V8-Agar. La identificación morfológica a nivel de género se realizó con claves y descripciones taxonómicas de Phillips *et al.* (2013).

La identificación molecular se realizó a partir de ADN genómico (ADNg), obtenido de micelio por el método AP descrito por Sambrook y Russell (2012). Los cebadores empleados fueron ITS5 e ITS4 de los genes ribosomales (ADNr). El análisis de las

morphological identification at the genus level was achieved using the keys and taxonomic descriptions of Phillips *et al.* (2013).

The molecular identification was performed using genomic DNA (ADNg) from mycelium following the AP method described by Sambrook and Russell (2012). The primers used were ITS5 and ITS4 from ribosomal genes (ADNr). The results of the sample analysis were corroborated through traditional PCR according to the protocol described by Ahrens and Seemüller (1992), with modifications to the components, according to Sambrook and Russell (2012). The quality was evaluated through horizontal electrophoresis in 1% agarose gel (Ultrapure, Gibco, USA) and the bands were visualized using a transilluminator (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). The concentration of DNA was quantified using a NanoDrop 2000 ((Thermo Scientific®). The DNA fragments amplified by PCR were purified with the Wizard (Promega®,

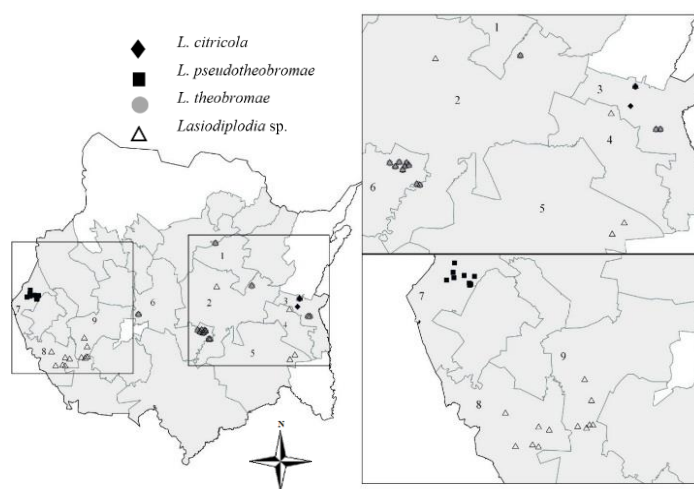


Figura 1. Distribución de especies de *Lasiodiplodia* en huertas de lima persa (*Citrus latifolia*) cultivadas en Morelos, México. Municipios muestreados= 1: Cuautla; 2: Ayala; 3: Jantetelco; 4: Jonacatepec; 5: Tepalcingo; 6: Tlaltizapán de Zapata; 7: Coatlán del Río; 8: Amacuzac; 9: Puente de Ixtla. Polígonos en blanco no registran superficie de cítricos.

Figure 1. Distribution of *Lasiodiplodia* species in Persian lime (*Citrus latifolia*) orchards in Morelos, Mexico. Municipalities where samples were collected = 1: Cuautla; 2: Ayala; 3: Jantetelco; 4: Jonacatepec; 5: Tepalcingo; 6: Tlaltizapan de Zapata; 7: Coatlán del Río; 8: Amacuzac; 9: Puente de Ixtla. White polygons do not include a citrus area.

muestras fue corroborado mediante PCR tradicional de acuerdo al protocolo descrito por Ahrens y Seemüller (1992), con modificaciones en los componentes según Sambrook y Russell (2012). La calidad se evaluó por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% (Ultrapure, Gibco, USA) y las bandas se visualizaron en un transiluminador (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). La concentración de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®). Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron purificados con el kit Wizard (Promega®, USA), siguiendo el protocolo del fabricante. El producto de PCR purificado fue secuenciado en ambas direcciones por MacroGen Inc. (Seoul, Korea del Sur). Las secuencias fueron ensambladas y editadas con la opción CAP (Contig Assembly Program) del Software BioEdit v7.0.9.1. Las secuencias de hongos fueron comparadas y depositadas en la base de datos del GenBank. Los árboles filogenéticos fueron construidos con los datos de las terminaciones de ITS5 e ITS4, además se analizaron con el software MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 7.0.14 (Tamura *et al.*, 2007), alineadas con ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) y comparados con las secuencias de genes homólogos depositados en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information. Después de analizar la congruencia entre los conjuntos de datos, se hizo un análisis de máxima parsimonia (MP), se realizaron los análisis filogenéticos en PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) versión 4.0b10 (Swofford, 2003). Los árboles filogenéticos se obtuvieron con la función de búsqueda heurística con 1,000 repeticiones de adición aleatoria, bisección y reconstrucción de árboles (TBR) como algoritmo de intercambio de ramas y los espacios o datos faltantes fueron considerados deleciones completas (Kimura, 1980; Hillis y Bull, 1993). La secuencia HQ231345 de *Phoma tracheiphila* de GenBank se utilizó como el taxón fuera de grupo.

USA) kit, following the manufacturer's protocol. The purified PCR product was sequenced in both directions by MacroGen Inc. (Seoul, South Korea). The sequences were assembled and edited using the CAP option (Contig Assembly Program) in the BioEdit software v7.0.9.1. The fungi sequences were compared and deposited in the GenBank's database. The phylogenetic trees were built using data from the ITS5 and ITS4 ends and analyzed with MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) software version 7.0.14 (Tamura *et al.*, 2007), aligned using ClustalW 1.8.1 (Thompson *et al.*, 1994) and compared to sequences of homologous genes in the database of the National Center for Biotechnology Information. After analyzing the congruence among data sets, an analysis of maximum parsimony (MP) was conducted, and phylogenetic analyses were done by using the Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP) software version 4.0b10 (Swofford, 2003). The phylogenetic trees were found using the heuristic search function with 1,000 random addition replicates, tree bisection and reconstruction (TBR) selected as branch-swapping algorithm, and the missing spaces or data were considered complete deletions (Kimura, 1980; Hillis and Bull, 1993). The HQ231345 sequence of *Phoma tracheiphila* from the GenBank was used as a taxon external to the group.

The incidence was evaluated following the methodology proposed by Acosta-Pérez *et al.* (2012), that is, by selecting five rows from each orchard, 4 to 21 trees per row, and a total of 21 to 50 trees per orchard. The percentage of incidence was determined by dividing the number of infected plants by the total of plants evaluated and then multiplied by 100. The disease severity was evaluated using the scale proposed by Orozco-Santos (1995) and modified by Valle-De la Paz, which consists of four classes, where 0= healthy tree, 1= presence of gum exudation on the main

La incidencia se evaluó con la metodología propuesta por Acosta-Pérez *et al.* (2012), seleccionando cinco hileras de cada huerto, 4 a 21 árboles por hilera y un total de 21 a 50 árboles por huerto. El porcentaje de incidencia se determinó dividiendo el número de plantas enfermas entre el total de plantas evaluadas y multiplicadas por 100. La severidad se evaluó mediante escala propuesta por Orozco-Santos (1995) y modificada por Valle-De la Paz, que consta de cuatro clases, donde 0= árbol sano, 1= presencia de exudaciones de goma en tronco principal o en ramas primarias y secundarias, 2= agrietamiento visible, exposición de tejidos internos, en tronco principal o en ramas primarias y secundarias y 3= presencia de cancro bien definido y muerte descendente de ramas (Figura 2). La severidad se transformó a porcentaje de infección (% PI) con la fórmula de Townsend y Heuberger (1943). A los datos se les aplicaron las pruebas de normalidad (Shapiro-Wilk) y homogeneidad de varianza (Levene y Bartlett) y como no se ajustaron a dichos principios, el análisis se realizó con estadística no paramétrica, utilizando la prueba de Kruskal Wallis y la comparación de medias con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) y $p < 0.0001$.

Los síntomas observados en árboles de lima persa en Morelos son rajaduras en tallo, exudaciones de goma (Figura 2 B), canchros en la base del tallo (Figura 2 E), agrietamiento visible con exposición de tejidos internos (Figura 2 C), amarillamiento del follaje, muerte descendente de ramas y necrosis descendente en ramas con presencia de puntos negros (Figura 2 D), que corresponden a los cuerpos fructíferos (picnidios) del patógeno (Figura 3 E y F). La enfermedad descendió a la base de la rama anual e invadió las ramas secundarias, lo cual coincide con Khanzada *et al.* (2004), quienes reportan que en plantas afectadas las ramas nuevas comienzan con una marchitez, posteriormente las hojas se tornan de color marrón y sus márgenes se doblan

trunk or on the primary and secondary branches, 2= visible cracks, exposure of internal tissue, on the main trunk or on the primary and secondary branches, and 3= presence of well-defined canker and dieback of branches (Figure 2). The severity was converted to percentage of infection (% PI) using the formula of Townsend and Heuberger (1943). The resulting data were subjected to tests of normality (Shapiro-Wilk) and homogeneity of variance (Levene and Bartlett), but since the principles were not fulfilled, a nonparametric statistics analysis was done using the Kruskal Wallis test and a mean comparison using Tukey's test ($\alpha=0.05$) and $p < 0.0001$.

The symptoms observed in Persian lime trees in Morelos were stem cracks, gum exudation (Figure 2 B), cankers at the stem base (Figure 2 E), visible cracking with internal tissue exposure (Figure 2 C), canopy yellowing, dieback of branches, descending necrosis and black spots on the branches (Figure 2 D), which correspond to the pathogen's fructiferous bodies (pycnidia) (Figure 3 E and F). The disease advanced to the base of the annual branch and invaded the secondary branches, a fact that is in agreement with the results obtained by Khanzada *et al.* (2004), who reported that new branches of infected plants start to wilt, and then the leaves become brown, their margins fold up, dry and fall off. Under severe conditions, the branches dry one after another in sequence until the entire tree dies.

Some of the symptoms are similar to those caused by *P. parasitica*, particularly gum secretion and the formation of cankers (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Vidales, 1982), while *Lasiodiplodia* spp. causes dieback of branches, formation of pycnidia, as well as browning of the vascular tissue of dead branches (Figure 2). Valle-De la Paz *et al.* (2019), based on morphological traits, identified the *Lasiodiplodia* sp. genus. The molecular analysis determined groups of four clades: one for 11



Figura 2. Síntomas y niveles de daño de muerte descendente en árboles de lima persa en Morelos. A) 0: Árbol sano; B) 1: Presencia de exudaciones de goma en tronco principal o en ramas primarias y secundarias; C) 2: Agrietamiento visible con exposición de tejidos internos; D y E) 3: Muerte descendente de ramas y cancro bien definido.
Figure 2. Symptoms and levels of damage caused by dieback of Persian lime trees in Morelos. A) 0: Healthy tree; B) 1: Presence of gum exudation on the main trunk or on the primary and secondary branches; C) 2: Visible cracks, exposure of internal tissue, on the main trunk or on the primary and secondary branches; D and E) 3: Dieback of branches and well-defined canker.

hacia arriba, se secan y caen. En condiciones severas las ramas se secan una tras otra en secuencia, resultando en la muerte de todo el árbol.

Algunos de estos síntomas son similares a los que ocasiona *P. parasitica*, particularmente la secreción de goma y formación de canchales (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Vidales, 1982), mientras que *Lasiodiplodia* spp. causa muerte descendente de ramas y la formación de picnidios, adicionalmente los tejidos vasculares de ramas muertas se tornan de color marrón (Figura 2). Valle-De la Paz *et al.* (2019) con base a caracteres morfológicos identificaron el género *Lasiodiplodia* sp. El análisis molecular determinó agrupamiento de cuatro clados; uno con 11 aislamientos a género *Lasiodiplodia* sp. y tres clados a especies, un aislado alineó para *Lasiodiplodia citricola*, otro para *L. pseudotheobromae* y dos para *L. theobromae* (Figura 3).

En la Figura 1 se presenta la distribución de las especies de *Lasiodiplodia*, describiéndose por municipio muestreado: Cuautla (*Lasiodiplodia* sp., y *L. theobromae*), Tlaltizapán de Zapata (*Lasiodiplodia* sp. y *L. theobromae*) y Jantetelco (*Lasiodiplodia* sp., *L. citricola* y *L. theobromae*). Mientras que

isolates of the *Lasiodiplodia* sp. genus, three clades for species, one isolate aligned for *Lasiodiplodia citricola*, another for *L. pseudotheobromae* and two for *L. theobromae* (Figure 3).

Figure 1 shows the distribution of *Lasiodiplodia* species by municipality where the samples were collected: Cuautla (*Lasiodiplodia* sp., and *L. theobromae*), Tlaltizapan de Zapata (*Lasiodiplodia* sp. and *L. theobromae*) and Jantetelco (*Lasiodiplodia* sp., *L. citricola* and *L. theobromae*). *L. pseudotheobromae* was found only in Coatlan del Rio, *Lasiodiplodia* sp. in Ayala, Jonacatepec, Tepalcingo, Amacuzac and Puente de Ixtla. *L. theobromae* was the prevailing species (28.57%), followed by *L. pseudotheobromae* (16.07%) and *L. citricola* (3.57%). *Lasiodiplodia* sp. was found in 51.78% of the sampled orchards, which indicates that new species are likely present.

The mean tests of dieback incidence were separated in 18 groups with statistical differences among them. In the group A were the orchards with the highest percentage of incidence (96.7-100%), located in the municipalities of Jonacatepec (1 orchard), Coatlan del Rio (2 orchards), Tlaltizapan

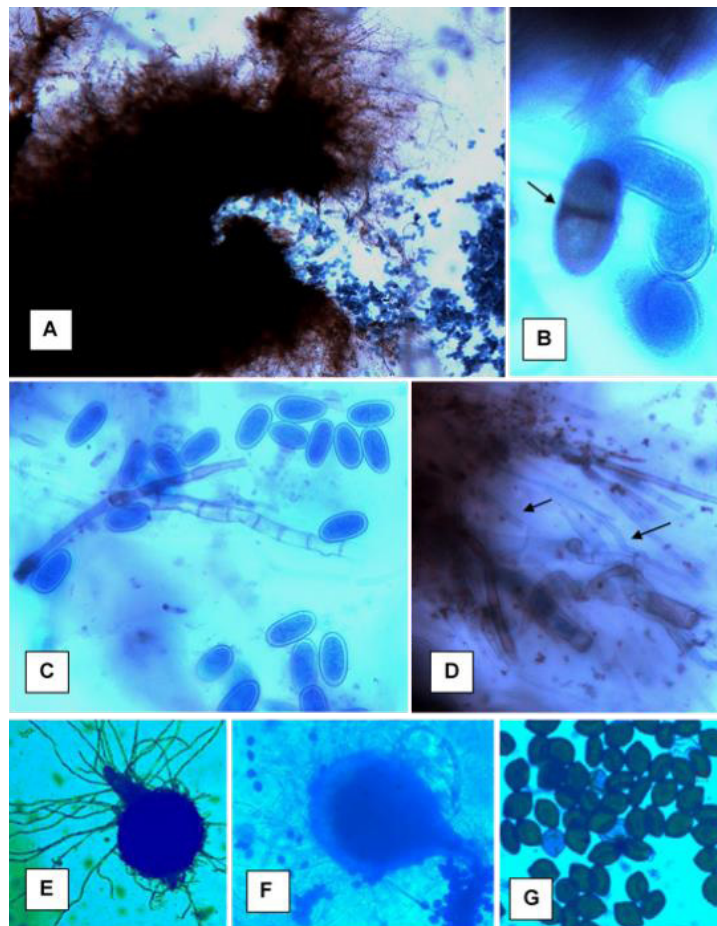


Figura 3. Estructuras de *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* y *L. citricola* en medio PDA. A) Conidio de *L. theobromae*; B) didimospora madura y amerosporas inmaduras de *L. theobromae*; C) conidios inmaduras (amerosporas) de *L. pseudotheobromae*; D) paráfisis de *L. pseudotheobromae*; E y F) picnidios y conidios de *L. citricola*; G) conidios de *L. citricola*. Fotografías tomadas en Microscopio óptico (A, F y E) 10 X; B, C, D y G) 100 X.

Figure 3. *Lasiodiplodia theobromae*, *L. pseudotheobromae* and *L. citricola* structures in a PDA medium. A) *L. theobromae* conidium; B) *L. theobromae* mature didymospore and immature ameroconidia; C) *L. pseudotheobromae* immature conidia (ameroconidia); D) *L. pseudotheobromae* paraphyses; E and F) *L. citricola* pycnidia and conidia; G) *L. citricola* conidia. Photographs taken under an optical microscope (A, F and E) 10 X; B, C, D and G) 100 X.

en Coatlán del Río sólo se encontró a *L. pseudotheobromae*; en Ayala, Jonacatepec, Tepalcingo, Amacuzac y Puente de Ixtla se identificó a *Lasiodiplodia* sp. La especie predominante fue *L. theobromae* con 28.57 %, seguido de *L. pseudotheobromae* con 16.07% y finalmente *L. citricola* con 3.57%. En el 51.78% de los huertos muestreados se encontró a *Lasiodiplodia* sp. lo cual indica la probable presencia de especies nuevas.

de Zapata (2 orchards) and Cuautla (1 orchard). The following 10 groups included the orchards with intermediate-high incidence (55.4-88.1%), located in the municipalities of Jantetelco (2 orchards), Coatlán del Río (4 orchards), Amacuzac (3 orchards), Tlaltizapan de Zapata (3 orchards), Puente de Ixtla (4 orchards), Tepalcingo (3 orchards) and Ayala (1 orchard). In the group EDHIGCF were the orchards with intermediate incidence (48.1-49.2%), located

Las pruebas de medias de la incidencia de la muerte descendente se separaron en 18 grupos, con diferencias estadísticas entre ellos. En el grupo A se ubicaron huertos con mayor porcentaje de incidencia, que fue de 96.7 a 100 %, estos se ubicaron en los municipios de Jonacatepec (1 huerto), Coatlán del Río (2), Tlaltizapán de Zapata (2) y Cuautla (1). En los siguientes 10 agruparon los huertos que presentaron una incidencia de media a alta, con porcentajes de 55.4 a 88.1%, ubicándose en los municipios de Jantetelco (2 huertos), Coatlán del Río (4), Amacuzac (3), Tlaltizapán de Zapata (3), Puente de Ixtla (4), Tepalcingo (3) y Ayala (1). En el grupo EDHIGCF se agruparon huertos donde la incidencia fue media de 48.1 a 49.2%, con ubicación en los municipios de Amacuzac (1), Puente de Ixtla (1 huerto) y Jantetelco (2). Seguido de cinco grupos donde la incidencia se presentó de media a baja de 44.3 a 23.8%, ubicándose en los municipios de Coatlán del Río (2), Jantetelco (1), Tlaltizapán de Zapata (3) y Ayala (1). Finalmente, en el grupo I se tuvieron los huertos que presentaron la menor incidencia de la enfermedad con 11.9 a 25.4% y se ubicaron en los municipios de Tlaltizapán de Zapata (3 huertos), Ayala (2), Amacuzac (3) y Coatlán del Río (1) (Figura 6).

La enfermedad presentó porcentajes de incidencia de 49 a 100%, en 37 de los 46 huertos evaluados, de los cuales el 78% de huertos presenta incidencias que oscilan del 31.8 al 100% (Figura 6), es decir que se observa en todas las áreas productoras de lima persa del estado de Morelos, donde se detectaron factores como la edad de la planta, manejo agronómico, podas, fertilización, etc., que predisponen su presencia; sin embargo es importante destacar que los municipios de Coatlán del Río y Tlaltizapán de Zapata están localizados en la parte sur-poniente del estado de Morelos, donde predomina un clima cálido, integrado por la prolongación de la zona de pie de monte. El centro

in the municipalities of Amacuzac (1 orchard), Puente de Ixtla (1 orchard) and Jantetelco (2 orchards). Then there were five groups of orchards with low-to-intermediate incidence (44.3-23.8%), located in the municipalities of Coatlan del Rio (2 orchards), Jantetelco (1 orchard), Tlaltizapan de Zapata (3 orchards) and Ayala (1 orchard). Finally, in the group I were the orchards with the lowest disease incidence (11.9-25.4%), located in the municipalities of Tlaltizapan de Zapata (3 orchards), Ayala (2 orchards), Amacuzac (3 orchards) and Coatlan del Rio (1 orchard) (Figure 6).

The percentage of incidence ranged from 49 to 100% in 37 out of the 46 orchards evaluated, from which 78% showed a level of incidence ranging from 31.8 to 100% (Figure 6), which means that the disease was observed in all the Persian lime producing areas in the state of Morelos, where factors that favor the disease were observed, including age of the plant, agronomic management, pruning and use of fertilizers, among others. However, it is important to highlight that the municipalities of Coatlan del Rio and Tlaltizapan de Zapata are located in southern-western Morelos, integrated by the extension of the foothills area where the weather is warmer. The center of the location along with the southern mountain accounts for 60% of the state surface, with 22-26°C annual average temperature, 34°C maximum temperature and summer and winter rains up to 900 mm (INEGI, 2018).

The municipality with a lower percentage of disease incidence was Coatlan del Rio (11.97%), located in southern-western Morelos, and area adjacent to Guerrero and the State of Mexico, which is characterized by a prevailing sub-humid weather with summer and winter rains A (W). There are also humid subtropical and hot tropical microclimates with indefinite winter periods. The average rainfall

de la entidad conjuntamente con la montaña sur constituye el 60% de la superficie estatal, donde se logran temperaturas medias anuales de 22 a 26°C, temperaturas máximas de 34°C y lluvias predominantes en los meses de verano e invierno hasta de 900 mm (INEGI, 2018).

El municipio con menor porcentaje de incidencia de la enfermedad fue Coatlán del Río (11.97 %) y se localiza al sur poniente del estado, colindando con Guerrero y el Estado de México, caracterizado por un clima subhúmedo con lluvias en verano y en invierno A (W) es el predominante. También se tienen microclimas como el subtropical húmedo y el caluroso tropical con invierno indefinido. La precipitación promedio es de 1,000 milímetros anuales, con temperaturas máximas de 34 °C, la media 24 °C y la mínima 14 °C. (Enciclopedias municipios y delegaciones de México, 2018). Estas condiciones meteorológicas influyen en la infección y desarrollo de la enfermedad. En este sentido, Picos-Muñoz *et al.* (2015) manifestaron que humedades relativas y temperaturas altas favorecen la aparición de este hongo. Además, plantearon que puede causar importantes pérdidas económicas sobre todo en frutales. Reportan que la fuente de infección son la presencia de plantas enfermas y restos de poda que quedan tirados en el campo, además, es favorecida por altas temperaturas, lluvias y humedad proporcionada por el riego, este factor favorece la expulsión de las esporas de los picnidios y se acumulen en la atmósfera que rodea el cultivo y suelo (Muhammad, 2009).

La muerte descendente de árboles frutales susceptibles a la enfermedad puede resultar de la interacción de este patógeno con estrés hídrico, suelos arcillosos, escasa materia orgánica, elevada cantidad de caliza activa, fertilización inadecuada, exceso de riego, alta humedad por sombra excesiva, quemadura de sol, presencia de heridas por causas naturales o por el uso de herramientas de

is 1,000 annual millimeters, 34 °C maximum temperature, 24 °C average and 14 °C minimum (Enciclopedias Municipios y Delegaciones de México, 2018). The meteorological conditions have an impact on infection and disease development. In this regard, Picos-Muñoz *et al.* (2015) indicated that relative humidity and high temperatures favor the development of the fungus. The authors also stated that the fungus can cause important economic losses, especially in fruit orchards. It has also been reported that a source of spreading are infected plants and pruning debris left in the field, and that high temperatures and moisture provided by irrigation also favor the disease, because the latter promotes the release of spores from pycnidia that then accumulate in the atmosphere surrounding the crop and the soil (Muhammad, 2009).

Dieback of fruit trees susceptible to the disease can cause the interaction of the pathogen with water stress, clay soils, low organic matter, a large amount of active limestone, inadequate fertilization, excess irrigation, high moisture caused by excessive shade, sunburn, wounds from natural causes or caused by the use of crop cutting tools, pruning and compacted alkaline soils that hinder root development, nutrition and airing (Agustí, 2003; Ko *et al.*, 2004).

The mean tests of dieback severity were separated in 30 groups with statistical differences among them (Figure 6). The highest level of severity (100%) was found in orchards located in the municipalities of Tlaltizapan de Zapata (1 orchard) and Coatlan del Rio (1 orchard), which were significantly different from all the orchards from the group A. The following 14 groups included the municipalities with 55.5-95%: Tepalcingo (1 orchard), Puente de Ixtla (3 orchards), Ayala (1 orchard), Coatlan del Rio (5 orchards), Tlaltizapan de Zapata (3 orchards), Amacuzac (3 orchards), Jonacatepec (1 orchard), Jantetelco (2 orchards)

corte en la cosecha, podas y suelos compactados alcalinos que complican el desarrollo radicular, nutrición y aireación (Agustí, 2003; Ko *et al.*, 2004).

Las pruebas de medias de la severidad de la muerte descendente se separaron en 30 grupos, con diferencias estadísticas entre ellos (Figura 6). La severidad más alta (100%), se encontró en huertos ubicados en los municipios de Tlaltizapán de Zapata (1 huerto) y Coatlán del Río (1), los cuales fueron significativamente diferentes a todos los huertos, correspondiendo al grupo A. En los siguientes 14 grupos se agruparon los municipios con porcentajes que van de 55.5 a 95% en los siguientes municipios Tepalcingo (1 huerto), Puente de Ixtla (3), Ayala (1), Coatlán del Río (5), Tlaltizapán de Zapata (3), Amacuzac (3), Jonacatepec (1), Jantetelco (2) y Cuautla (1) (Figura 4). Enseguida se presenta el grupo KEJMIHLGN con una severidad medias de 50.5 con un huerto del municipio de Tepalcingo (1), en seguida con 13 grupos presentaron porcentajes de infección de 9.8 a 43.3% en municipios de Jantetelco (2 huertos), Puente de Ixtla (2), Coatlán del Río (2), Amacuzac (4), Tlaltizapán de Zapata (5) y Amayuca (1) (Figura 5). Por último, en el grupo Q se agruparon dos huertos del municipio de Tlaltizapán de Zapata, los cuales fueron significativamente diferentes con un porcentaje de severidad de 3.7 a 5.08 %. Las agrupaciones anteriores, indica que más del 71 % de los huertos evaluados, presentan severidades que van del 30.0 al 100% de porcentaje de infección de la enfermedad (Figura 6).

Rodríguez (2010) señala que la actividad del hongo se ve favorecida por temperaturas de 24 ± 26 °C. Mientras que Almaguer *et al.* (2015) coinciden en que especies de *Lasiodiplodia* son comunes en los trópicos y causan varias enfermedades en etapas de cultivo como en postcosecha, como *L. theobromae* que afecta a principalmente frutales, donde las lluvias y el viento son factores que

and Cuautla (1 orchard) (Figure 4). Then was the group KEJMIHLGN with 50.5 mean severity in an orchard in the municipality of Tepalcingo (1), followed by 13 groups with 9.8-43.3% of infection in the municipalities of Jantetelco (2 orchards), Puente de Ixtla (2 orchards), Coatlán del Río (2 orchards), Amacuzac (4 orchards), Tlaltizapán de Zapata (5 orchards) and Amayuca (1 orchard) (Figure 5). Finally, the group Q included two orchards in the municipality of Tlaltizapán de Zapata, which were significantly different with a level of disease severity of 3.7-5.08%. The above-mentioned groups indicate that the level of infection severity ranged from 30.0 to 100% in more than 71% of the evaluated orchards (Figure 6).

Rodríguez (2010) points out that the fungus activity is favored by temperatures of 24 ± 26 °C. While Almaguer *et al.* (2015) agrees that *Lasiodiplodia* species are common in the tropics and cause several diseases at crop stages, for example, postharvest, *L. theobromae* affects mainly fruit trees in sites where the rain and the wind are the factors that determine spore spreading within a cropping area.

The results of this study corroborate that the highest level of damage produced by *Lasiodiplodia* spp. was observed in the municipalities located in southeast Morelos (Figure 1), a region characterized by a semi-warm weather with 800 mm rainfall and 24°C annual average temperature, where the soils are abundantly irrigated with underground water, a factor that can be decisive for the fast spreading of the pathogen, as in the case of other pathogens in clay soils. Prior to this study, Acosta-Pérez *et al.* (2012) pointed out that there was a new disease in *C. latifolia* plantations with external symptoms similar to those of gummosis and that producers were mistakenly managing it as such. The disease was found in 44% of *C. latifolia* plantations with an average incidence of 10.2% and 1.7-25.0% interval.

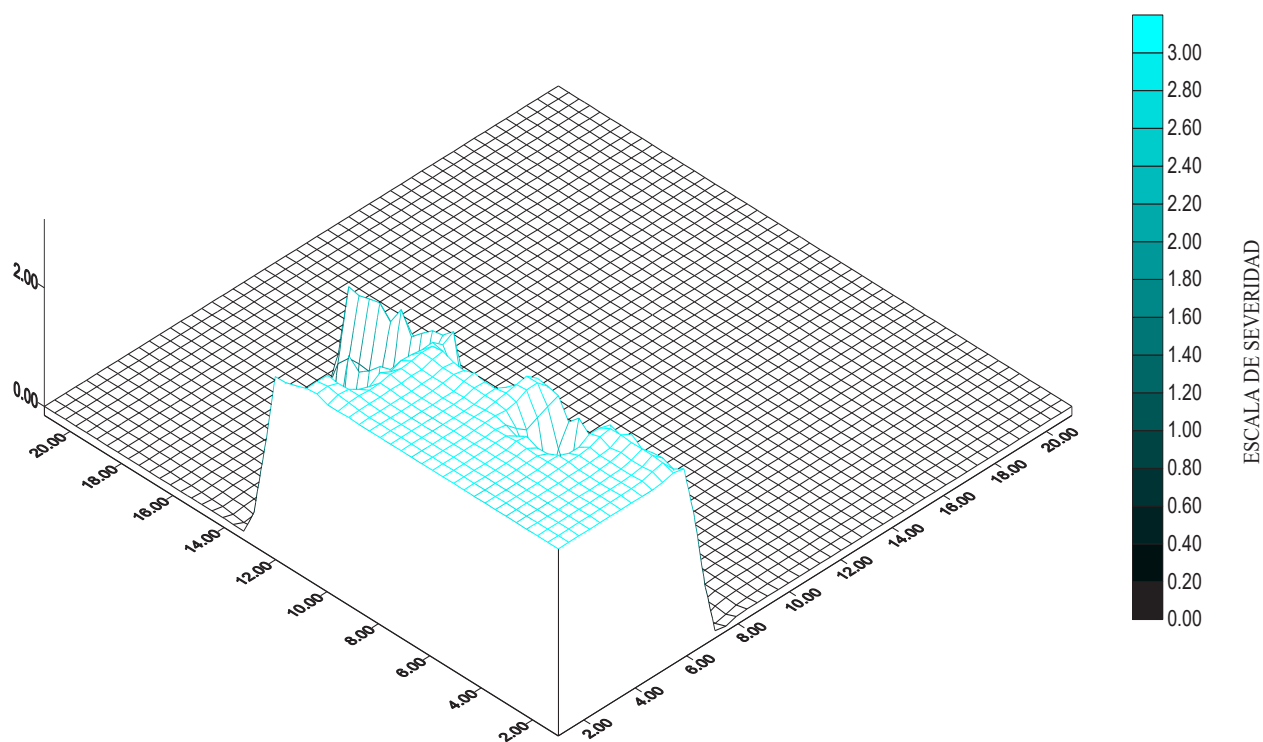


Figura 4. Severidad (2.4) de muerte descendente en lima persa (*Citrus latifolia*) en un huerto de Coatlán del Río, Morelos.
Figure 4. Severity (2.4) of die back in Persian lime (*Citrus latifolia*) in an orchard in Coatlán del Río, Morelos.

determinan la dispersión de las esporas dentro de las áreas de cultivo.

Los resultados del estudio corroboran que la mayor severidad de daños producidos por *Lasiodiplodia* spp, ocurren en los municipios ubicados en el Sureste del estado (Figura 1), caracterizado por un clima semicálido, con precipitaciones de 800 mm y temperatura media anual de 24°C, donde los suelos tienen una gran afluencia de aguas subterráneas lo que puede ser determinante para la diseminación rápida de este patógeno, como ocurre con otros patógenos en suelos arcillosos. Previo a este estudio Acosta-Pérez *et al.* (2012) señalaron, que, en plantaciones de *C. latifolia*, existía una nueva enfermedad con síntomas externos similares a la gomosis y que los productores equivocadamente estaban manejando como tal. Esta enfermedad estuvo presente en el 44% de las plantaciones de *C.*

The decrease in citrus area has been attributed to damage caused by *Phytophthora*, among other factors (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2015; Vidales, 1982). However, the preliminary results of this study show a growing effect with damage up to level 3, canker and dieback of branches, which are attributed to several *Lasiodiplodia* species. The intensity of dieback varies in the state of Morelos and within the same municipalities, which shows that Morelos has the adequate temperature and moisture conditions, which are ideal for the disease, in addition to an inefficient management control by the producers, and that these factors promote the development and spread of the disease.

The conclusion is that dieback is a disease associated with several *Lasiodiplodia* species, such as *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*, which cause serious damage

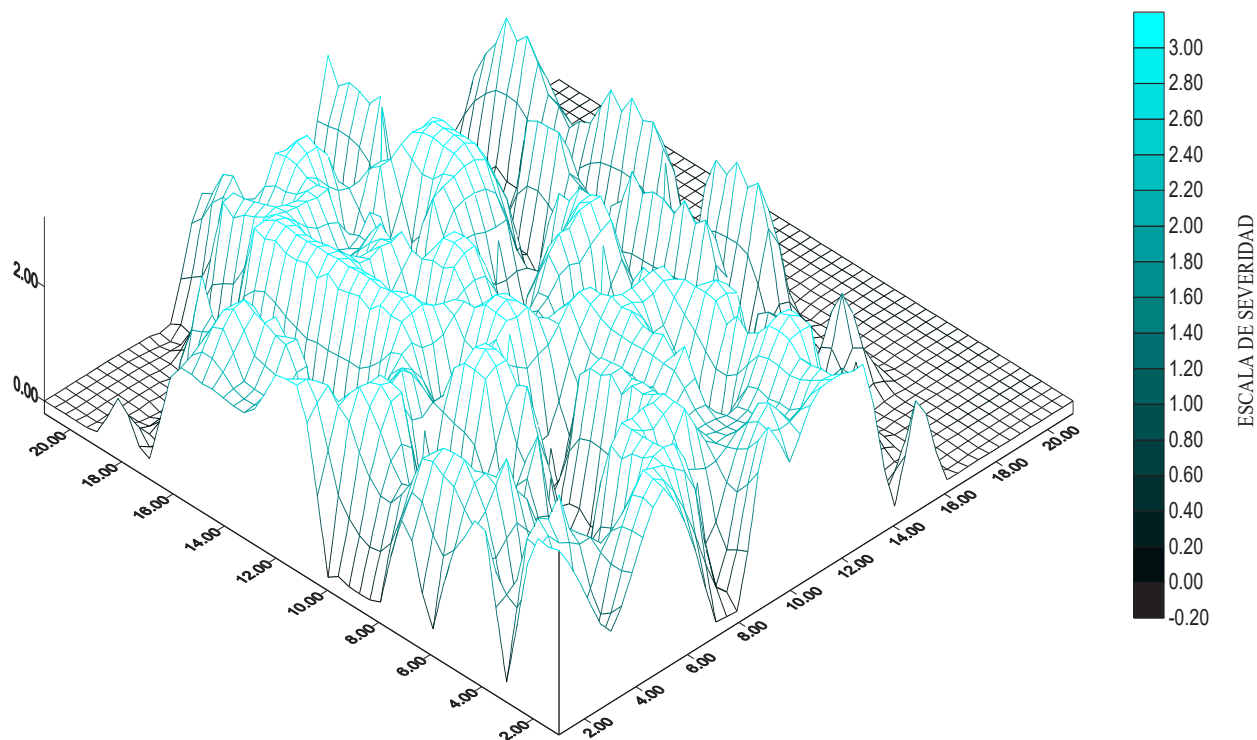


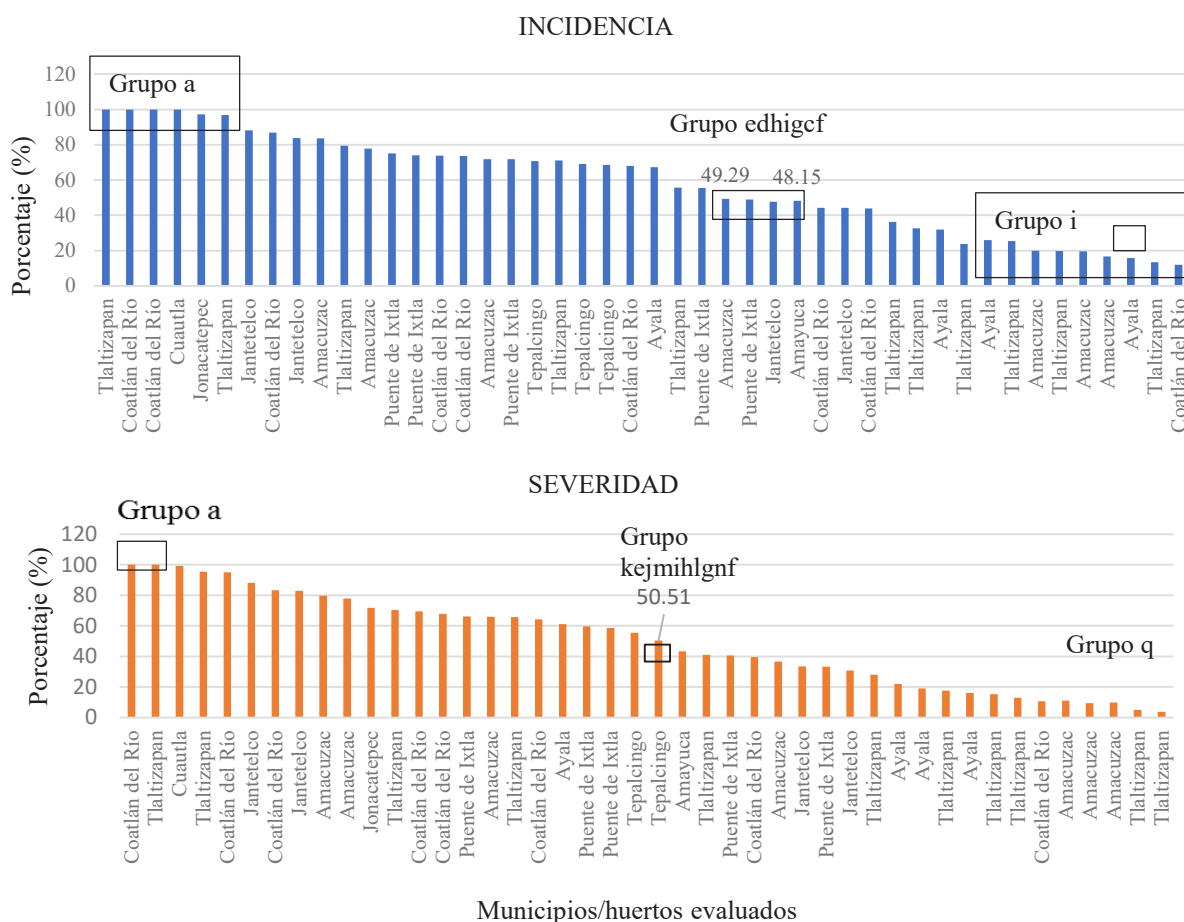
Figura 5. Severidad (1.6) de muerte descendente en lima persa (*Citrus latifolia*) en un huerto del municipio de Puente de Ixtla, Morelos.
Figure 5. Severity (1.6) of die back in Persian lime (*Citrus latifolia*) in an orchard in the municipality of Puente de Ixtla, Morelos.

latifolia con una incidencia promedio de 10.2% e intervalo de 1.7 a 25.0%. La disminución de la superficie de cítricos ha sido atribuida entre otros factores a los daños por *Phytophthora* (Acosta-Pérez *et al.*, 2012; Sosa *et al.*, 2015; Vidales, 1982). Sin embargo, estos resultados preliminares, exponen una afectación creciente, con daños hasta grado 3, con presencia de cancro y muerte descendente de ramas, atribuibles a varias especies de *Lasiodiplodia*. La muerte descendente se presenta con diferentes intensidades en el estado de Morelos y dentro de los mismos municipios, lo que demuestra que Morelos cuenta con las condiciones adecuadas tanto de temperatura y humedad, idóneas para el desarrollo de esta enfermedad, aunado al mal manejo por parte del productor, lo que desencadena el desarrollo y la propagación de la enfermedad.

to Persian lime trees given the high levels of incidence and severity in citrus orchards in the state of Morelos. It was found in 100% of the orchards evaluated and this shows the importance of the disease in reducing the crop profitability.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

Se concluye que la muerte descendente es una enfermedad que se encuentra asociada a varias especies de *Lasiodiplodia* tales como: *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*, las cuales atacan seriamente a los árboles de lima persa, presentando incidencias y severidades altas en los huertos de cítricos del estado de Morelos, encontrándose presente en el 100% de las huertas



**Figura 6. Incidencia y severidad de la muerte descendente asociado al género *Lasiodiplodia* spp. en huertos de Lima Persa (*Citrus latifolia*) en el estado de Morelos.**

**Figure 6. Level of incidence and severity of dieback associated with *Lasiodiplodia* spp. genus in Persian lime (*Citrus latifolia*) orchards in the state of Morelos.**

evaluadas, lo cual refleja la importancia de esta enfermedad en la reducción de la rentabilidad del cultivo.

## LITERATURA CITADA

Acosta-Pérez JA, Ortiz-García CF, Zaldívar-Cruz JM, Rodríguez-Cuevas M, Bautista-Muñoz CC y Castillo ACC. 2012. Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona citrícola de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia* 28(3): 245-258. <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v28n3/v28n3a4.pdf>

Agustí M. 2003. *Citricultura*. Mundi-Prensa. Madrid, España. 422 p.

Ahrens U. and Seemüller E. 1992. Detection de DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology* 82: 828-832. [https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08\\_828.pdf](https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1992Articles/Phyto82n08_828.pdf)

Almaguer CM, Sánchez EKC and Díaz VL. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* in the atmosphere of Havana. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*. 4 (2):130-134. <http://www.rcub.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/138>

Christensen J. 2017. Common Diseases of Lime Trees. <https://www.gardeningchannel.com/common-diseases-of-lime-trees/>.

FAOSFAT. 2018. *Citrus Fruit Fresh and Processed*. Statistical Bulletin 2016. <http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/citricos/es/>.

- Hillis DM and Bull JJ. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42:182-192. DOI:10.1093/sysbio/42.2.182
- INEGI. 2018. Clima morelos. [www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mor/territorio/clima.aspx?tema=me&e=17](http://www.cuentame.inegi.org.mx/monografias/informacion/mor/territorio/clima.aspx?tema=me&e=17).
- Khanzada MA, Lodhi AM and Shahzad S. 2004. Mango dieback and gummosis in Sindh, Pakistan caused by *Lasiodiplodia theobromae*. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/diagnosticguide/2004/mango/>. Plant Health Progress. DOI:10.1094/PHP-2004-0302-01-DG.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120. DOI:10.1007/BF01731581
- Ko WH, Wang IT and Ann PJ. 2004. *Lasiodiplodia theobromae* as a causal agent of Kumquat dieback in Taiwan. *Plant Dis*. 88: 1383. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30795207>
- Mohali S, Slippers B and Wingfield, MJ. 2007. Identification of Botryosphaeriaceae species from *Eucalyptus*, *Acacia* and *Pinus* in Venezuela. *Fungal Diversity* 25: 143-65. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/25-7.pdf>
- Muhammad, S, Zafar, I, Ahmad, S and Muhammad, A. 2009. Association of *Lasiodiplodia theobromae* with different decline disorders in mango (*Mangifera indica* L.) Pak. *J. Bot.* 41(1):359-368.
- Orozco-Santos M. 1995. Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México. 150 p.
- Phillips AJL, Alves A, Abdollahzadeh J, Slippers B, Wingfield MJ, Groenewald JZ, and Crous PW. 2013. The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*. 76: 51-167. DOI: 10.3114/sim0021
- Picos-Muñoz PA, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar R. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 33, núm. 1, pp. 54-74. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S018533092015000100054&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S018533092015000100054&lng=es&nrm=iso)
- Rodríguez GE. 2010. *Lasiodiplodia theobromae*: fitopatógeno de mango (*Mangifera indica*) y palto (*Persea americana*). Lima: Manufacturas Gráficas S.A.C.
- Sambrook J and Russell DW. 2012. *Molecular cloning. A laboratory manual*. Third Edition. 1. 1.32-1.34. Cold Spring Harbour Laboratory Press. New York. <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m8265?lang=es&region=MX>
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2018. Producción Anual. Cierre de la producción agrícola por cultivo. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=10&Itemid=15](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=10&Itemid=15).
- Slippers B and Wingfield MJ. 2007. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews* 21 (2007) 90–106. DOI:10.1016/j.fbr.2007.06.002.
- Sosa A, Ruíz G, Muro J y Gordillo G. 2015. Control de gomosis de los cítricos (*Phytophthora parasitica*) en mandarina cv. royal en el Petacal, Jalisco, México. XVII Congreso Latinoamericano de Fitopatología 2015, Nutrilite-Amway. DOI:10.13140/RG.2.1.3909.8008
- Swofford DL. 2003. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods) Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. DOI: 10.1111/j.0014-3820.2002.tb00191.x
- Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24:1596-1599. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17488738>
- Thompson JD, Higgins DG and Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22 (22), 4673–4680. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC308517/>
- Townsend GR. and Heuberger JV. 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Report*. 24: 340-343.
- Valle-De la Paz M, Guillén-Sánchez D, Gijón- Hernández AR, Alía- Tejacal I, López- Martínez V, Juárez- López P, Martínez- Fernández V, Hernández- Arenas M y Ariza- Flores F. 2019. Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, Mexico. *Revista Bio Ciencias* 6 e595. DOI: 10.15741/revbio.06.01.35
- Vidales FJA. 1982. Etiología de la Gomosis de los Cítricos en Tecmán, Colima y búsqueda de fuentes de resistencia. Tesis de Maestría. Chapingo, México.