

Huanglongbing y muerte de ramas en plantas de *Citrus aurantifolia* y *C. latifolia* en Colima, México

José Joaquín Velázquez-Monreal*, Manuel de Jesús Bermúdez-Guzmán, Mario Orozco-Santos, Karina de la Paz García-Mariscal, INIFAP Campo Experimental Tecomán, km. 35 Carretera Colima-Manzanillo, Tecomán, Colima, CP 28930, México; Norma Elena Leyva-López, CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa, Blvd. Juan de Dios Bátiz Paredes No. 250, Col. San Joaquín, Guasave, Sinaloa, CP 81049, México.

*Autor para correspondencia: velazquez.joaquin@inifap.gob.mx.

Recibido: Septiembre 08, 2022.

Aceptado: Noviembre 08, 2022.

Velázquez-Monreal JJ, Bermúdez-Guzmán MdeJ, Orozco-Santos M, García-Mariscal KP y Leyva-López NE. 2022. Huanglongbing y muerte de ramas en plantas de *Citrus aurantifolia* y *C. latifolia* en Colima, México. Revista Mexicana de Fitopatología 40(4).

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2022-10>

Resumen. En Colima desde 2012 se reportaron muertes de ramas (MR) en los árboles de limón Mexicano y Persa afectados por CLAs, de tal forma que la asociación MR-HLB se presenta en incidencias de 1 a 60%. El objetivo de este trabajo fue determinar la patogenicidad del agente causal de MR y si ésta es favorecida por la previa infección de CLAs en plantas de *C. aurantifolia* y *C. latifolia*. Los hongos que se aislaron fueron identificados como *Lasiodiplodia* spp. Solo *L. iraniensis* se identificó molecularmente. Se efectuaron dos pruebas de patogenicidad en invernadero, registrando la incidencia y severidad de MR, para esta última se utilizó una escala convencional de 1 (sano) a 5 (100% de daño en la copa). En la primera prueba, plantas de limón Mexicano previamente infectadas con CLAs y después individualmente inoculadas con cinco aislamientos del hongo, registraron de 40

a 100% de MR, con severidad de 2.2 a 5.0. En tanto que en la segunda prueba se emplearon plantas sanas de limón Mexicano y limón Persa, únicamente un aislado en cada caso ocasionó MR con un 33% de incidencia y con una severidad de 1.6 a 2.3, respectivamente. El CLAs puede favorecer a *Lasiodiplodia* spp. para manifestar más agresividad y por ello, actualmente hay reportes de problemas de muerte de ramas en cítricos en México.

Palabras clave: *Lasiodiplodia*, CLAs, *Citrus aurantifolia*, *Citrus latifolia*, enfermedad.

México es el primer productor de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) en el mundo. Para el año 2021, se cultivaron 97,918 hectáreas de este frutal con una producción de 1.253 millones de toneladas de fruta (SIAP, 2022). En la región del trópico seco del Pacífico Centro (Colima, Michoacán, Guerrero y Oaxaca) se tiene el 97% de la superficie nacional de este cítrico.

En las últimas décadas, el cultivo de limón Mexicano ha enfrentando nuevos retos y amenazas de tipo fitosanitario que han puesto en riesgo su permanencia como actividad agrícola. En la actualidad

su problema más serio es el Huanglongbing (HLB), enfermedad en México asociada a la bacteria *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) (Robles *et al.*, 2018). La cual se detectó por primera vez en abril de 2010 en Colima, México (Robles-González *et al.*, 2017), donde en solo tres años, se dispersó rápidamente hasta alcanzar el 100% de distribución estatal. Se estima que los cinco millones de árboles en producción en el estado están en mayor o menor grado afectados por esta enfermedad (Orozco *et al.*, 2016). El impacto económico más significativo del HLB fue la reducción de los volúmenes de fruta cosechada. En el año 2011, se produjeron 472,875 t en todo el estado de Colima y para los años 2014 y 2015, la producción estatal de fruta fue de 166,805 y 185,285 t, significando una disminución del 64.7 y 60.8%, respectivamente (SIAP, 2022).

El HLB es considerada la enfermedad más grave de los cítricos que afecta actualmente a esta industria a nivel mundial (Bové, 2006; Wang *et al.*, 2016). También se ha señalado que pueden ocurrir otros efectos potenciales en los árboles con HLB, como es una mayor susceptibilidad a otros problemas fitosanitarios entre los que está el ataque del cerambícido de antenas largas de los cítricos (*Anoplophora chinensis*). Además, puede presentarse el ataque de este insecto junto con el fitopatógeno *Phytophthora* cuando ocurren ataques severos de HLB (Halbert y Manjunath, 2004; Batool *et al.*, 2007).

La caída prematura de fruto de naranja se ha relacionado con el HLB y en frutos con síntomas de esta enfermedad, pueden ser menor tamaño, forma asimétrica e inversión de color (Bové, 2006; Dalla-Paula *et al.*, 2019). Por otro lado, se encontró a *Lasiodiplodia theobromae*, asociado a la pudrición del pedúnculo de frutos, induciendo una mayor zona de abscisión en ellos, sugiriéndose que al establecerse el hongo en dicha zona se incrementa la caída de los frutos en precosecha (Zhao *et al.*, 2015; 2016; 2019).

Lasiodiplodia theobromae es un hongo cosmopolita y con una gama amplia de hospedantes. Puede presentarse como saprófito, parásito y endófito, en esta última situación se encuentra latente dentro de su hospedero, después cambia a patógeno y ocasiona síntomas de la enfermedad cuando las plantas se encuentran en condiciones desfavorables (Slippers y Wingfield, 2007; Netto *et al.*, 2014; Paoletti-Alfonso *et al.*, 2016; Coutinho *et al.*, 2017; Noriega-Cantú, 2017; Sathya *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). En México, *L. theobromae* se ha reportado afectando diversos cultivos maderables y frutícolas como son pinos, aguacate, anonáceas, cacao, cítricos, jamaica, mamey, mango, marañón, nogal pecanero, papayo, rambután y vid (Picos-Muñoz *et al.*, 2015). En Colima además de los efectos negativos del HLB en limón Mexicano, así como en otros cítricos como limón Persa (*Citrus latifolia*), cultivo de menor superficie establecida en el estado, se ha observado en huertos mayores de cuatro años un problema de muerte de ramas (Figura 1), sugiriendo una notoria asociación entre ésta y el HLB.

Esta muerte de ramas (MR) antes de la presencia del HLB en Colima sucedía con una incidencia relativamente baja y solo en huertos de limón Mexicano donde los árboles tenían poco vigor por estar en condiciones desfavorables como la sequía, nutrición deficiente y suelos degradados o compactos, entre otras. Pero, desde el 2012 se han registrado incidencias hasta del 60% en árboles afectados con HLB y en ataques severos es capaz de matar hasta el 50% o más de la copa de los árboles. En las ramas, el problema aparece como manchas de aspecto aceitoso, en las cuales se presenta exudación de goma café claro. Después las lesiones se vuelven oscuras y las ramas afectadas se colapsan. Las hojas se “abarquillan” con apariencia de déficit de agua, se vuelven cloróticas, se secan y luego se desprenden del árbol (Orozco-Santos *et al.*, 2014).



Figura 1. Árbol de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) con síntomas de muerte de ramas y HLB (A). Árbol con HLB, muerte de ramas y defoliación (B).

A pesar del incremento de daños observados en árboles de limón Mexicano y limón Persa por el complejo HLB-MR, recientemente no se han reportado estudios de patogenicidad para validar la identidad del agente causal de MR. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la patogenicidad del agente causal de la enfermedad de muerte de ramas y si ésta es favorecida por la infección previa de CLas en plantas de *C. aurantifolia* y *C. latifolia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este trabajo se realizaron dos experimentos en condiciones de invernadero en el Campo Experi-

mental (C.E.) Tecomán del INIFAP de Colima; uno con plantas infectadas con CLas y otro con plantas sanas, en ambos casos las plantas fueron utilizadas para pruebas de patogenicidad con aislamientos de *Lasiodiplodia* sp.

Obtención e identificación morfológica de aislamientos fúngos. Esta fase se realizó en el laboratorio de Biotecnología del C.E. Tecomán. En campo se obtuvieron muestras vegetativas de limón Mexicano y limón Persa con síntomas iniciales de MR (Cuadro 1), entre el área de avance de la lesión y el tejido sano se cortaron segmentos de aproximadamente 10 mm de longitud, los cuales fueron tratados con una solución de hipoclorito de sodio al 0.5%, después se lavaron dos veces en

Cuadro 1. Hospederos cítricos y localización en Colima donde se obtuvieron los aislados fúngos de *Lasiodiplodia* spp. empleados en las pruebas de patogenicidad.

Aislado	Hospedero	Municipio	Coordenadas
A1T	Limón Mexicano	Tecomán	Lat-18°57'53.98" N; Long. 103°50'32.26" O
A2A	Limón Mexicano	Armería	Lat- 18°56'02.57" N; Long. 103°58'52.75" O
A3F	Limón Mexicano	Tecomán	Lat- 18°57'53.98" N; Long. 103°50'32.26" O
A4P	Limón Persa	Tecomán	Lat- 18°56'12.46" N; Long. 103°54'01.70" O

agua destilada estéril y se procedió a sembrarlos en placas de papa-dextrosa-agar (PDA) a temperatura ambiente. Posteriormente, los aislamientos fueron subcultivados en PDA con el propósito de permitir la formación de estructuras reproductivas y proceder a su identificación considerando sus características morfológicas.

Identificación molecular de aislamientos de hongos. La extracción de ADN se realizó a partir de 1 g de micelio utilizando el kit DNeasy® Plant Mini (QIAGEN) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. La pureza y cuantificación de los ácidos nucleicos se efectuó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para el PCR se usó el kit Taq PCR Master mix (QIAGEN), siguiendo las indicaciones del fabricante para un volumen de 25 µL. Se emplearon los oligonucleótidos ITS1/ITS4 descritos previamente por White

et al. (1990) y la PCR se llevó a cabo con las condiciones reportadas por Manter y Vivanco (2007). Los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE 1X, se visualizaron con bromuro de etidio, y se secuenciaron las dos hebras (forward y reverse) por el método de Sanger. La edición de las secuencias, así como el análisis BLAST en la base de datos de NCBI se realizaron con el software CLC Main Workbench versión 8.1 de QIAGEN.

Infección de plantas de limón Mexicano con CLAs. Para el experimento 1, plantas sanas de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) var. Colimex (adquiridas en un vivero certificado) fueron inoculadas individualmente con CLAs, injertándoles dos varetas de 5 cm de longitud encima del portainjerto (Figura 2 A y B). Las plantas se mantuvieron en el invernadero y en observación hasta la aparición de



Figura 2. Transmisión de CLAs a plantas de limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*) mediante injerto de dos varetas infectadas (A y B). Síntomas de HLB en planta inoculada por injerto (C).

síntomas. A las 4 y 8 semanas después se confirmó la infección por CLas mediante qPCR en el laboratorio de Biotecnología del CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa. Para ello la extracción de ADN se hizo empleando 200 mg de tejido de nervadura central mediante el método del CTAB con algunas modificaciones (Zhang *et al.*, 1998; Arratia-Castro *et al.*, 2014), una vez obtenido el ADN se verificó su calidad como se mencionó anteriormente. Las reacciones de qPCR se realizaron con el kit SsoFast EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La qPCR se llevó a cabo en el equipo CFX96TM (Bio-Rad) con los oligonucleótidos y condiciones de amplificación descritos por Li *et al.* (2006) para la identificación de CLas.

Experimento 1 con plantas infectadas con CLas.

Tres aislamientos de hongo obtenidos de limón Mexicano (A1T, A2A y A3F), uno de limón Persa (A4P) y otro de mango (*Mangifera indica*) (A5M) que ya se tenía en el laboratorio, procedente del municipio de Cihuatlán, Jalisco (Lat. 19°14'53.57" N; Long. 104°40'05.92" O). Se inocularon cada uno en cinco plantas de limón Mexicano injertadas en Macrofila (*Citrus Macrophylla*) que tenían 8.5 meses de infectadas con CLas, además se incluyó un testigo, el cual consistió en cinco plantas de la misma especie y variedad con HLB que se inocularon con medio de cultivo PDA sin micelio fungoso. La inoculación del hongo se efectuó en dos ramas de cada planta haciendo un corte paralelo para permitir levantar la corteza y colocar debajo de la misma 1 cm² de PDA con crecimiento micelial de cada aislado. Los sitios de inoculación se sellaron envolviendo con un trozo de algodón que se conservaron húmedos con agua estéril durante tres días. Las plantas se mantuvieron en observación para la detección de síntomas de muerte de ramas, los cuales aparecieron a los 14 días posteriores a la

inoculación del hongo (DPIH). También a partir de ahí se midió durante 10 días el avance de la lesión desde el sitio de inoculación. Finalmente, a los 180 DPIH se registró la severidad de la enfermedad utilizando una escala convencional del 1 al 5 (donde 1 era sano; 2, 3, 4 y 5 representaron 25, 50, 75 y 100% de daño en la copa de la planta, respectivamente). De las plantas que resultaron afectadas, en el laboratorio de Biotecnología del C.E. Tecomán se re-aisló el hongo inoculado verificando sus características morfológicas.

Experimento 2 con plantas sanas. En la segunda prueba de patogenicidad de la forma ya descrita los aislados A1T, A2A y A3F individualmente se inocularon en tres plantas sanas de limón Mexicano var. Colimex certificadas injertadas en Macrofila; en tanto que los aislados A3F, A4P y A5M se inocularon cada uno en tres plantas sanas de limón Persa certificadas injertadas en Macrofila; se agregó para cada caso un testigo con igual número de repeticiones que se inocularon únicamente con medio de cultivo PDA. Las plantas se mantuvieron en observación con el fin de precisar la manifestación de síntomas de muerte de ramas y, a partir de ahí registrar el avance de la enfermedad y la severidad de la misma a los 180 DPIH mediante la escala ya indicada. De las plantas que presentaron síntomas se re-aisló el hongo previamente inoculado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención e identificación morfológica de aislamientos fungosos. Los aislados (de limón Mexicano, limón Persa y mango) que se inocularon en las dos especies de cítricos y, que además se reaislaron, mostraron muerte de ramas y se observó las características reportadas para *Lasiodiplodia* sp., las cuales fueron crecimiento en el medio de cultivo

PDA con formación de micelio inicialmente blanco, volviéndose gris y oscureciendo al transcurrir el tiempo (Figura 3 A). Los conidios al principio fueron de forma ovalada o elipsoidal, hialinos, unicelulares y granulares, y cuando maduraron se observaron oscuros y septados (Orozco-Santos, 2014; Polanco *et al.*, 2019).

Identificación molecular de aislamientos del hongo. El análisis BLAST en la base de datos de

NCBI reveló que las secuencias de las regiones ITS tuvieron 100% de identidad (secuencias homólogas) con otras reportadas en la base de datos. Estas secuencias homólogas y de acuerdo con otros aislamientos de *Lasiodiplodia* spp. procedentes de diversos cultivos en México fueron tomados en cuenta para determinar el origen de cada aislamiento (Cuadro 2). El único aislamiento que se logró determinar plenamente fue el A1T (obtenido de limón Mexicano) como *L. iraniensis*, que

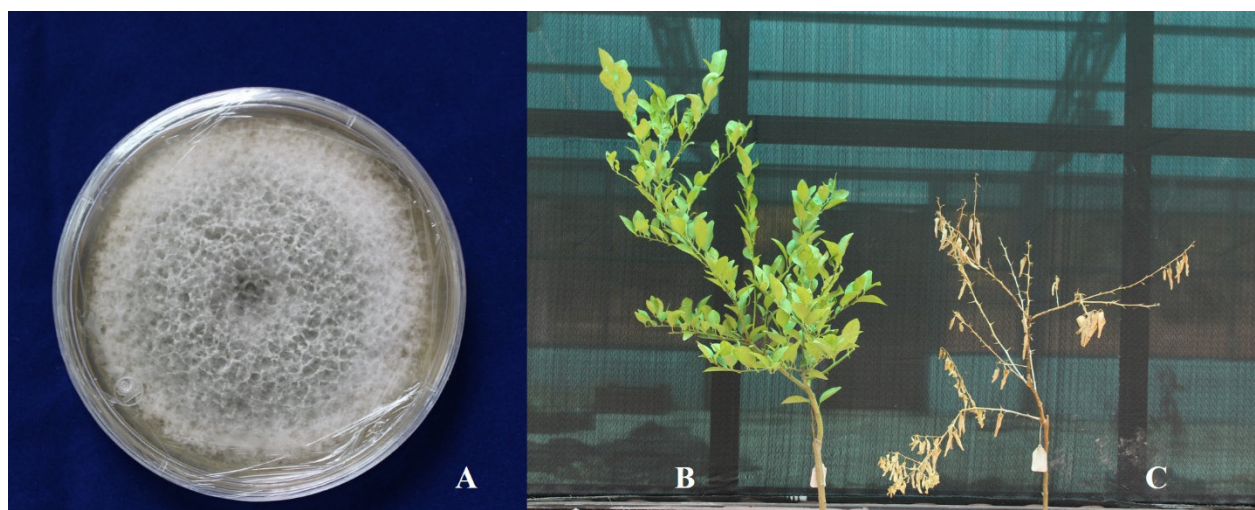


Figura 3. Colonia de *Lasiodiplodia* spp. (A). Plantas de limón Mexicano: testigo (B) e inoculada con *Lasiodiplodia* spp. con síntomas de muerte en ramas (C)

Cuadro 2. Identificación morfológica y molecular de los aislados de *Lasiodiplodia* spp.

Aislado	Agente causal (Morfología)	Probables agentes causales y porcentaje de identidad (secuenciación)	Hospedero
A4P	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. theobromae</i> (100%) <i>L. pseudotheobromae</i> (100%) <i>L. iraniensis</i> (100%)	Limón Mexicano
A3F	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. theobromae</i> (100%) <i>L. brasiliense</i> (100%) <i>L. theobromae</i> (100%)	Limón Persa
A2A	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. pseudotheobromae</i> (100%) <i>L. iraniensis</i> (100%) <i>L. theobromae</i> (100%)	Limón Mexicano
A5M	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. pseudotheobromae</i> (100%) <i>L. iraniensis</i> (100%)	Mango
A1T	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	<i>L. iraniensis</i> (99.82%)	Limón Mexicano

tuvo los mayores valores de porcentaje de identidad (99.82%) y una cobertura del 541/542 nucleótidos. El resto de los aislamientos registraron 100% de identidad con 2 a 3 probables agentes causales, entre *L. theobromae*, *L. pseudotheobromae*, *L. iraniensis* y *L. brasiliense* (Cuadro 2).

Con base en el análisis BLAST realizado no fue posible definir con certeza las especies del género *Lasiodiplodia* en árboles de limón Mexicano y de limón Persa procedentes de Colima. La región ITS que se utilizó en este estudio tiene una longitud más corta (454 caracteres) que la reportada por otros autores, esto es debido al juego de oligonucleótidos utilizado: ITS1/ITS4 en este estudio y, por otra parte, ITS5/ITS4 en otros reportes, genera mayor cantidad de caracteres para el análisis filogenético, 531 en el caso de Bautista-Cruz *et al.* (2019). El alineamiento múltiple de secuencias (datos no mostrados) evidenció que para especies de *Lasiodiplodia* spp. la región ITS tiene muy poca variabilidad genética, por lo que es una región poco informativa y por tal razón los resultados del análisis BLAST en la base de datos de NCBI tienen homología con varias especies de *Lasiodiplodia*. Por tal motivo, resulta necesario realizar un análisis filogenético tomando en cuenta otras regiones de otros genes que se han reportado para este tipo de análisis en *Lasiodiplodia*: el factor de elongación de la traducción-1 α (*tefl*) y el gen parcial de la β -tubulina (*tub2*) (Coutinho *et al.* 2017; Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2019).

Infección de plantas de limón Mexicano con CLas. En el caso de las plantas del primer experimento, los resultados del análisis por qPCR corroboraron la infección por CLas, bacteria asociada al HLB, en las plantas de limón Mexicano inoculadas por injerto inicialmente. Estas plantas a los tres meses también empezaron a mostrar el síntoma de moteado asimétrico (Figura 2 C) en las hojas,

característico del HLB (Bové, 2006; Robles-González *et al.*, 2014).

Experimento 1 con plantas infectadas con CLas.

En la primera prueba de patogenicidad, luego de que las plantas fueron inoculadas con los aislamientos fungosos, la manifestación de los síntomas fueron marchitez de hojas a los 14 días posteriores a la inoculación del hongo (DPIH), observándose el avance descendente de la muerte de ramas desde el sitio de inoculación a los 16 DPIH y a los 19 DPIH las plantas ya presentaron caída de hojas. El avance promedio de la muerte del tallo de ramas varió de 2.5 a 16.3 cm a los 23 DPIH. En tanto que las plantas testigo se mantuvieron sanas (Figura 3 B). La muerte total o parcial ocurrió (Figura 3 C) en el limón Mexicano (copa) pero no en el portainjerto Macrofila, el cual llegó a emitir brotes en la base al no ser afectado y mantenerse vivo. La incidencia de muerte de ramas ocasionada por los cinco aislamientos del hongo en limón Mexicano positivo a CLas varió de 40 a 100% (Cuadro 3); en tanto que la severidad tuvo valores de 2.2 a 5.0 (Cuadro 4), siendo el máximo valor para el aislamiento A5M (obtenido de mango), el cual causó el 100% de muerte de plantas (Cuadro 3) considerado como el más agresivo. *Lasiodiplodia* en México es reportado afectando mango (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2013; Noriega-Cantú *et al.*, 2017) y cítricos (Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Polanco *et al.*, 2019; Valle-de la Paz *et al.*, 2019).

Experimento 2 con plantas sanas. En la segunda prueba de patogenicidad con plantas sanas de limón Mexicano y limón Persa inoculadas con tres aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., únicamente los aislados A2A y A5M ocasionaron muerte de ramas en un 33% de ellas (Cuadro 3) con una severidad de 2.3 y 1.6, respectivamente. Estos valores fueron menores a los observados en plantas de limón

Cuadro 3. Incidencia de muerte de ramas a los 180 días posteriores a la inoculación de aislados de *Lasiodiplodia* en plantas de limón Mexicano sanas o inoculadas previamente con CLas.

Especie	Testigo	Aislados de <i>Lasiodiplodia</i>				
		A1T (L. Mexicano)	A2A (L. Mexicano)	A3F (L. Mexicano)	A4P (L. Persa)	A5M (Fruto mango)
L. Mexicano HLB (+)	0%	40%	40%	40%	80%	100%
L. Mexicano HLB (-)	0%	0%	33%	0%	-----	-----
L. Persa HLB (-)	0%	-----	-----	0%	0%	33%

Cuadro 4. Severidad promedio de muerte de ramas a los 180 días posteriores a la inoculación de aislados de *Lasiodiplodia* en plantas de limón Mexicano sanas o inoculadas previamente con CLas.

Especie	Testigo	Aislados de <i>Lasiodiplodia</i>				
		A1T (L. Mexicano)	A2A (L. Mexicano)	A3F (L. Mexicano)	AP4 (L. Persa)	A5M (Fruto mango)
L. Mexicano HLB (+)	1.0	2.2	2.2	2.2	4.2	5.0
L. Mexicano HLB (-)	1.0	1.0	2.3	1.0	-----	-----
L. Persa HLB (-)	1.0	-----	-----	1.0	1.0	1.6

Escala Severidad: 1.0 = sano; 2.0 = 25% de daño, 3.0 = 50% de daño, 4.0 = 75% de daño y 5 = 100% de daño en copa por muerte de ramas.

Mexicano positivas a CLas (Cuadro 4). También de estas plantas afectadas se re-aisló al mismo hongo inoculado.

El número de plantas positivas o negativas a CLas que se infectaron con cada aislado de *Lasiodiplodia* varió, así como la longitud, avance de la infección, en la etapa inicial y la severidad de la enfermedad a los 180 DPIH. Todo esto puede indicar diferencias en la agresividad entre los aislados del hongo evaluados en este estudio. La diferencia en agresividad entre aislados y especies de *Lasiodiplodia* fue detectada también en mango (Rodríguez-Gálvez *et al.*, 2017).

De las dos pruebas de patogenicidad realizadas con los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp. en este estudio, se obtuvo una mayor incidencia y severidad de muerte de ramas en plantas de limón Mexicano infectadas con CLas, lo cual puede ser un indicativo a que el HLB favorece a *Lasiodiplodia* spp. para que actúe como patógeno y por ello, se tienen en la actualidad reportes de problemas de muerte de ramas en cítricos en México (Bautista-Cruz *et al.*, 2019; Polanco *et al.*, 2019; Valle-de la Paz *et al.*, 2019). Aunque no se indica en estos reportes de alguna relación con el HLB, esta enfermedad está presente en México desde el año 2009 y

se encuentra ampliamente distribuida en las zonas cítricas del país. Así como en naranja se reporta una mayor caída de frutos con síntomas de HLB e infectados con *L. theobromae* (Zhao *et al.*, 2015). Se puede esperar que en Colima la muerte de ramas en limón Mexicano y limón Persa no sean un problema separado si no que está influido por la infección de CLas y, que en las plantas sea un complejo de los dos patógenos y por ello se registró un mayor daño por muerte de ramas después de la presencia de CLas en Colima (Orozco *et al.*, 2014).

Lasiodiplodia es miembro de la familia Botryosphaeriaceae, que incluye hongos saprófitos, patógenos y endófitos, en la cual se ha observado la asociación entre patogénesis y el estrés del hospedante (Slippers y Wingfield, 2007; Mondragón-Flores *et al.*, 2021). El estrés induce cambios físicos, fisiológicos y bioquímicos reduciendo la energía (azúcares) disponible para la defensa de las plantas, las cuales proveen de energía a los patógenos volviéndolas más susceptibles al ataque de éstos que pueden ser secundarios en la secuencia de eventos (Wargo, 1996). En este estudio, la mayor incidencia de muerte de ramas ocurrió en plantas primeramente infectadas con CLas, por lo que el ataque de *Lasiodiplodia* spp. se puede considerar secundario que afectó plantas debilitadas o estresadas por efecto del HLB. Tal como podría estar sucediendo con la pudrición del pedúnculo por *L. theobromae* en frutos de naranja con síntomas de HLB, mostrando consistentemente una correlación positiva entre la infección del hongo y la caída de frutos, de forma tal que la infección secundaria por el hongo en el cáliz incrementa la abscisión de frutos (Zhao *et al.*, 2015; 2016; 2019). En limón Mexicano y limón Persa se puede presentar una relación similar a la correlación anterior, dado que se trata del mismo género botánico, *Citrus*, de plantas.

CLas despliega proteínas efectoras en los organelos de las células vegetales, mitocondrias cloroplastos, que manipulan la resistencia basal o

inmunidad y la fisiología de la planta (Pitino *et al.*, 2017). Es de esperar que el CLas induzca cambios que alteren la fisiología de las plantas y puedan quedar susceptibles al ataque de otros patógenos. Después de la infección en dos cultivares relacionados de toronja, uno tolerante y otro susceptible, se determinó que se expresaron diferencialmente 686 genes, de los cuales se sobre-expresaron y sub-expresaron el 36 y 64%, respectivamente, en los árboles tolerantes, suprimiéndose o activando rutas que conducen a la activación de la resistencia basal (Wang *et al.*, 2016). De esta forma se ha señalado que entre los efectos potenciales del HLB está una mayor susceptibilidad a otros problemas fitosanitarios como el ataque individual del cerambícido de antenas largas de los cítricos (*A. chinensis*) o junto con *Phytophthora*, la infección de *L. theobromae* en la zona de abscisión del cáliz y el incremento de la infección de la raíz por *P. nicotianae* (Halbert y Manjunath, 2004; Batool *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2017).

En el presente estudio se utilizaron plantas sanas, y en donde se observó mayor número de plantas afectadas por *Lasiodiplodia* spp. fue cuando se inoculó el hongo en plantas previamente infectadas con CLas ocasionando la infección primaria que favoreció a *Lasiodiplodia* como un patógeno secundario.

En áreas cítricas donde los programas de certificación no están correctamente establecidos o no existen, es probable que las infecciones mixtas sean comunes, como en el Centro-Norte de Veracruz, México, donde las plantas de cítricos pueden presentar psorosis (*Citrus psorosis virus*-CPsV), exocortis (*Citrus exocortis viroid*-CEVd), caquexia (*Citrus viroid* III-CVd-II) y HLB (CLas), con presencia de enfermedades adicionales causadas por patógenos como *Phytophthora*, *Lasiodiplodia* y *Colletotrichum* (Contreras-Maya *et al.*, 2022). Por lo que es importante realizar futuros estudios que relacionen la asociación de CLas con otros fitopatógenos.

CONCLUSIONES

De las muestras procedentes de árboles de limón Mexicano y limón Persa afectados por muerte de ramas se aisló al hongo *Lasiodiplodia* spp., identificando molecularmente como *L. iraniensis* uno de cinco aislamientos evaluados. En pruebas de patogenicidad, la mayor incidencia (40-100%) y severidad (2.2-5.0) de muerte de ramas ocurrió en plantas (limón Mexicano y de limón Persa) infectadas por CLas. *Lasiodiplodia* spp. resultó un patógeno secundario, cuya infección al parecer es favorecida por la infección previa con CLas. En las plantas negativas a CLas, la muerte de ramas tuvo una menor incidencia (33%) y menor severidad (1.6-2.3) lo cual puede ser un indicativo a que el HLB puede favorecer a *Lasiodiplodia* spp. para aumentar su agresividad y por ello se tienen en la actualidad reportes de problemas de muerte de ramas en cítricos en México.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por el financiamiento del proyecto de investigación: Generación de un paquete tecnológico de limón Mexicano variedad Lise bajo un escenario de Huanglongbing.

LITERATURA CITADA

- Arratia-Castro AA, Santos-Cervantes ME, Fernández-Herrera E, Chávez-Medina JA, Flores-Zamora GL, Camacho-Beltrán E, Méndez-Lozano J and Leyva-López NE. 2014. Occurrence of "*Candidatus Phytoplasma asteris*" in citrus showing Huanglongbing symptoms in Mexico. *Crop Protection* 62: 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2014.04.020>
- Batool A, Iftikhar Y, Mughal MS, Khan MM, Jaskani JM, Abbas M and Khan AI. 2007. Citrus greening disease – A major cause of citrus decline in the world: A review. *Horticultural Science* 34: 159-166. <https://doi.org/10.17221/1897-HORTSCI>
- Bautista-Cruz MA, Almaguer-Vargas G, Leyva-Mir SG, Colinas-León MT, Correia KC, Camacho-Tapia M, Robles-Yerena L, Michereff SJ and Tovar-Pedroza JM. 2019. Phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of Persian lime in Mexico. *Plant Disease* 103 (6): 1156-1165. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-18-1036-RE>
- Bové JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology* 88 (1): 7-37. <https://www.jstor.org/stable/41998278> <http://dx.doi.org/10.4454/jpp.v88i1.828>
- Contreras-Maya R, Villegas-Monter A, Santacruz-Varela A, Cruz-Huerta N, Ortega-Arenas LD, and Ochoa-Martínez D. 2022. Prevalence of Mild T30, T3, and Severe VT Strains of *Citrus Tristeza Virus* in Central-Northern Veracruz, Mexico. *American Journal of Plant Sciences* 13: 494-505. <https://doi.org/10.4236/ajps.2022.134032>
- Coutinho IBL, Freire FCO, Lima CS, Lima JS, Goncalves FJT, Machado AR, Silva AMS and Cardoso JE. 2017. Diversity of genus *Lasiodiplodia* associated with perennial tropical fruit plants in northeastern Brazil. *Plant Pathology* 66: 90-104. <https://doi.org/10.1111/ppa.12565>
- Dala-Pala BM, Plotto A, Bai J, Manthey JA, Baldwin EA, Ferrarezi RS and Gloria MBA. 2019. Effect of Huanglongbing or Greening Disease on Orange Juice Quality, a Review. *Frontiers in Plant Science* 9:1976. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01976>
- Halbert SE and Manjunath KL. 2004. Asian citrus psyllids (*Sternorrhyncha: Psyllidae*) and greening disease of citrus: A literature review and assessment of risk in Florida. *Florida Entomologist* 87(3):330-353. [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2004\)087\[0330:ACPSPA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2004)087[0330:ACPSPA]2.0.CO;2)
- Li W, Hartung JS and Levy L. 2006. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing. *Journal of Microbiological Methods* 66: 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2005.10.018>
- Manter DK and Vivanco JM. 2007. Use of the ITS primers, ITS₁F and ITS₄, to characterize fungal abundance and diversity in mixed-template samples by qPCR and length heterogeneity analysis. *Journal of Microbiological Methods* 71(1): 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.06.016>
- Mondragón-Flores A, Rodríguez-Alvarado G, Gómez-Dorantes N, Guerra-Santos JJ y Fernández-Pavía SP. 2021. Botryosphaeriaceae: una familia de hongos, compleja, diversa y cosmopolita. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 12(4): 643-654. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2620>
- Netto MSB, Assunção IP, Lima GSA, Marques MW, Lima WG, Monteiro JHA, Balbino VQ, Michereff SJ, Phillips AJL and Câmara MPS. 2014. Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity* 67:127-141. <https://doi.org/10.1017/s13225-014-0279-4>
- Noriega-Cantú DH, Pereyda-Hernández J and Garrido-Ramírez ER. 2017. Effects climatological factors on fluctuation of spores at mango trees cv. Ataulfo in Guerrero, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35:227-241. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1610-1>

- Orozco-Santos M, Velázquez-Monreal JJ, Hernández-Fuentes LM, Nieto-Ángel D, Bermúdez-Guzmán MJ, Carrillo-Medrano SH y Manzo-Sánchez G. 2014. Enfermedades y su manejo integrado. Pp. 195-230. In: Orozco-Santos M, Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ y Manzanilla-Ramírez MÁ. (eds). El limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 475p.
- Orozco SM, Robles GMM, Velázquez MJJ, Manzanilla RMA, Carrillo MSH, Bermúdez GMJ, García KP y García PJC. 2016. Situación actual y perspectivas de la investigación en limón Mexicano. Memoria Técnica-Científica del XII Simposio Internacional Citrícola 2016. CONASIPROLIM. INIFAP. Tecomán, Colima, México. p. 111-124.
- Picos-Muñoz PA, García-Estrada RS, León-Félix J, Sañudo-Barajas A y Allende-Molar MR. 2015. *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. Revista Mexicana de Fitopatología 33(1):54-74. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054
- Pitino M, Armstrong CM and Duan Y. 2017. Molecular mechanisms behind the accumulation of ATP and H₂O₂ in citrus plants to 'Candidatus Liberibacter asiaticus' infection. Horticulture Research 4:170040. <https://doi.org/10.1038/hortres.2017.40>
- Polanco FLG, Alvarado GOG, Pérez GO, González GR y Olivares SE. 2019. Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas 10 (4): 757-764. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>
- Paolinelli-Alfonso M, Villalobos-Escobedo JM, Rolshausen PE, Herrera-Estrella A, Galindo SC, López-Hernández JF and Hernandez MR. 2016. Global transcriptional analysis suggests *Lasiodiplodia theobromae* pathogenicity factors involved in modulation of grapevine defensive response. BMG Genomics. 17: 615. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2952-3>
- Robles GMM, Orozco SM, Manzanilla RMA, Velázquez MJJ, Medina UVM and Sanches SE. 2018. Experiencias con Huanglongbing en limón Mexicano en el estado de Colima, México. Citrus Research & Technology 39: 2-12. <https://doi.org/10.4322/crt.16518>
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez Á, Velázquez-Monreal JJ y Carrillo-Medrano SH. 2017. Efecto del HLB sobre el rendimiento de limón Mexicano en Colima, México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 8(5): 1101-1111 <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i5.111>
- Robles-González MM, Orozco-Santos M, Manzanilla-Ramírez MÁ y Velázquez-Monreal JJ. 2014. Huanglongbing (HLB). Pp. 231-268. In: Orozco-Santos M, Robles-González MM, Velázquez-Monreal JJ y Manzanilla-Ramírez MÁ. (eds). El limón Mexicano (*Citrus aurantifolia*). Libro Técnico Núm. 1. SAGARPA, INIFAP, CIRPAC, Campo Experimental Tecomán. Tecomán, Colima, México. 475p.
- Rodríguez-Gálvez E, Guerrero P, Barradas C, Crous PW and Alves A. 2017. Phylogeny and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with dieback mango in Peru. Fungal Biology 121: 452-465. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.06.004>
- Sandoval-Sánchez M, Nieto-Ángel D, Sandoval-Islas IS, Téliz-Ortiz D, Orozco-Santos M y Silva-Rojas HV. 2013. Hongos asociados a pudrición del pedúnculo y muerte descendente del mango (*Mangifera indica* L.). Agrociencia 47: 61-73. <https://www.researchgate.net/publications/237075460>
- Sathya K, Parthasarathy S, Thiribhuvanamala G and Prabhakar K. 2017. Morphological and molecular variability of *Lasiodiplodia theobromae* causing stem end rot of mango in Tamil Nadu, India. International Journal of Pure & Applied Bioscience 5(6):1024-1031. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.5892>
- SIAP 2022. Anuario estadístico de la producción agrícola. Gobierno de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreaagricola/> (consulta, junio 2022)
- Silva NI, Phillips AJL, Liu JK, Lumyong S and Hyde KD. 2019. Phylogeny and morphology of *Lasiodiplodia* species associated with *Magnolia* forest plants. Scientific Reports 9: 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50804-x>
- Slippers B and Wingfield MJ. 2007. *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogen of woody plants: Diversity, ecology and impact. Fungal Biology Reviews 21: 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Valle-de la Paz M, Guillén-Sánchez D, Gijón-Hernández AR, Alía-Tejagal I, López-Martínez V, Juárez-López P, Martínez-Fernández E, Hernández-Arenas M and Ariza-Flores R. 2019. Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México. Revista Bio Ciencias 6, e595. <https://doi.org/10.15741/REVBIO.06.e595>
- Wang Y, Zhou L, Yu X, Stover E, Luo F and Duan Y. 2016. Transcriptome Profiling of Huanglongbing (HLB) Tolerant and Susceptible Citrus Plants Reveals the Role of Basal Resistance in HLB Tolerance. Frontiers in Plant Science 7:933. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00933>
- Wargo PM. 1996. Consequences of environmental stress on oak: Predisposition to pathogens. Annals of Forest Science 53(2-3): 359-368. <https://doi.org/10.1051/forest:19960218>
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp 315-322. In book: PCR- Protocols and Applications: A Laboratory Manual. Publisher Academic Press, Inc. www.researchgate.net/publication/223397588 (consulta, septiembre 2022)
- Wu J, Johnson EG, Bright DB, Gerberich KM and Graham JH. 2017. Interaction between *Phytophthora nicotianae* and *Candidatus Liberibacter asiaticus* damage to citrus fibrous roots. Journal of Citrus Pathology:1-7. <https://doi.org/10.5070/C441035789>
- Zhang W, Yan J, Li X, Xing Q, Chethana KWT and Zhao W. 2019. Transcriptional response of grapevine to infection with the fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*

- mae*. Scientific Reports 9: 5387. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41796-9>.
- Zhang Y, Uyemoto JK and Kirkpatrick BC. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 71: 45–50. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(97\)00190-0](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(97)00190-0)
- Zhao W, Bai J, McCollum G and Baldwin E. 2015. High incidence of preharvest colonization of huanglongbing-symptomatic *Citrus sinensis* fruit by *Lasiodiplodia theobromae* (*Diplodia natalensis*) and exacerbation of postharvest fruit decay by that fungus. *Applied and Environmental Microbiology* 81:364 –372. <https://doi.org/10.1128/AEM.02972-14>
- Zhao W, Baldwin EA, Baid J, Plotto A and Irely. 2019. Comparative analysis of the transcriptomes of the calyx abscission zone of sweet orange insights into the huanglongbing-associated fruit abscission. *Horticulture Research* 6:71. <https://doi.org/10.1038/s41438-019-052-4>
- Zhao W, Gottwald T, Bai J, McCollum G, Irely M, Plotto A and Baldwin E. 2016. Correlation of *Diplodia* (*Lasiodiplodia theobromae*) infection, huanglongbing, ethylene production, fruit removal force and pre-harvest fruit drop. *Scientia Horticulturae* 212: 162-170. <https://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.032>