



Original Article/Artículo Original

## Species of *Lasiodiplodia* in lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) in Morelos, México

## Especies de *Lasiodiplodia* en lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) en Morelos, México

Valle-de la Paz, M.<sup>1</sup>, Guillén-Sánchez, D.<sup>2\*</sup>, Gijón-Hernández, A. R.<sup>3</sup>, Alía-Tejacal, I.<sup>1</sup>, López-Martínez, V.<sup>1</sup>, Juárez-López, P.<sup>1</sup>, Martínez-Fernández, E.<sup>4</sup>, Hernández-Arenas, M.<sup>5</sup>, Ariza-Flores, R.<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209.

<sup>2</sup>Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Av. Nicolás Bravo S/N, Parque Industrial Cuautla, Xalostoc, Ayala, Morelos, México. C.P. 62717.

<sup>3</sup>Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales-INIFAP, Coyoacán. México, D. F.

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Av. Universidad No. 1001, Col Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México. C.P. 62209.

<sup>5</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Zacatepec, Carretera Zacatepec-Galeana Km. 0.5, Zacatepec, Morelos, México.

<sup>6</sup>INIFAP-Campo Experimental Iguala. Carretera Iguala - Tuxpan Km. 2.5, Tuxpan, Iguala de la Independencia, Guerrero, México. C.P. 40000.

**Cite this paper/Como citar este artículo:** Valle-de la Paz, M., Guillén-Sánchez, D., Gijón-Hernández, A. R., Alía-Tejacal, 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. doi: <https://doi.org/10.15741/REVBIO.06.e595>



### ABSTRACT

Samples of 'Persian' lime trees, from 5 to 8 years old, with symptoms of gummosis, cankers and dieback of branches were collected in orchards in the municipalities of Tlaltizapan, Ayala, Coatlan del Rio and Amayuca in the state of Morelos, Mexico, during August 2015. The samples were processed by routine procedures and sown in potato dextrose-agar and purified by means of hypha tips. The isolated pathogens were inoculated in healthy plants in order to evaluate their pathogenicity. Morphological and molecular identification was carried out and a Bayesian phylogenetic tree was constructed with clades grouping.

#### Article Info/Información del artículo

Received/Recibido: October 26<sup>th</sup> 2018.

Accepted/Aceptado: June 27<sup>th</sup> 2019.

Available on line/Publicado: July 1<sup>st</sup> 2019.

### RESUMEN

Muestras de árboles de lima 'Persa', de 5 a 8 años de edad, con síntomas de gomosis, canceres y muerte descendente de ramas fueron colectadas en huertos de los municipios de Tlaltizapán, Ayala, Coatlán del Río y Amayuca en el estado de Morelos, México, durante agosto del 2015. Las muestras fueron procesadas mediante procedimientos de rutina, sembradas en papa-dextrosa-agar y purificadas mediante puntas de hifa. Los patógenos aislados fueron inoculados en plantas sanas para evaluar su patogenicidad. Se realizó la identificación morfológica y molecular y se construyó un árbol filogenético bayesiano con agrupamiento de clados. Con base a caracteres morfológicos se identificó a *Lasiodiplodia* sp. El análisis molecular determinó 16 aislados, que se agruparon en 4 clados y tres especies, *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*, las cuales son consideradas como nuevos reportes causando enfermedad en lima 'Persa' para el Estado de Morelos, México.

#### \*Corresponding Author:

Dagoberto Guillén-Sánchez. Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Av. Nicolás Bravo S/N, Parque Industrial Cuautla, Xalostoc, Ayala, Morelos, México. C.P. 62717. E- mail: [mairelv@gmail.com](mailto:mairelv@gmail.com); [dagoquillen@yahoo.com](mailto:dagoquillen@yahoo.com)

Based on morphological characters, *Lasiodiplodia* sp. was identified. The molecular analysis allows to determine 16 isolates, which were grouped into 4 clades and three species, *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*, which are considered as new reports, causing disease in 'Persian' lime for the State of Morelos, Mexico.

---

## KEY WORDS

---

Molecular identification; *Lasiodiplodia theobromae*; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; *Lasiodiplodia citricola*.

---

## Introduction

The production of citrus in Mexico, especially 'Persian' lime (*Citrus latifolia* Tanaka) focused on fresh consumption and it is leading worldwide exports of fruits (Schwentesi *et al.*, 2005).

The national production in Mexico in 2016 was of 5.75 million tons with a value of \$16,781 million Mexican pesos, for this year the planted surface area of different citrus was 533,749 ha, of which 180,252 ha were for Mexican lemon (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swing), 178,877 ha for grapefruit, (*Citrus paradisi* Macf.) and 335,610 ha for 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (SIAP, 2017).

In the state of Morelos, Mexico, in 2010 there were orchards of citrus established in 28 of the 33 municipalities, with a surface planted of 1000 ha, with high production and quality of exportation. Nowadays, there is an established surface of 612 ha, in 17 municipalities, where lemon and orange 'Valencia' stand out, with 32 and 66 % of the total surface respectively, and a yield of 12.11 and 7.76 t ha<sup>-1</sup> respectively, both species being of uttermost economic importance in the state of Morelos, the rest of the surface is composed by other citruses (SIAP, 2017, CESVMOR, 2018). The generalized presence of 'Persian' lime trees with symptoms of gummosis, canker, dieback of branches and death of trees has caused reduction in productivity of the orchards and the increasing production costs. The technical recommendations in the state are centered on the use of specific fungicides for the control of several species of *Phytophthora*, causal agent of gummosis in citruses in other states of Mexico (Acosta-Pérez *et al.*, 2012). However, the results are not satisfactory. The symptoms observed in 'Persian' lime

---

## PALABRAS CLAVE

---

Identificación molecular; *Lasiodiplodia theobromae*; *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; *Lasiodiplodia citricola*.

---

## Introducción

La producción de cítricos en México, en especial de lima 'Persa' (*Citrus latifolia* Tanaka) se ha orientado al consumo fresco y es líder en exportación de frutos a escala mundial (Schwentesi *et al.*, 2005).

La producción nacional en México en el 2016, fue de 5.75 millones de toneladas con un valor de \$16,781 millones de pesos, para ese año la superficie plantada de cítricos fue de 533,749 ha, de las cuales 180,252 ha fueron de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swing), 178,877 ha de toronja (*Citrus paradisi* Macf.) y 335,610 ha de naranja 'Valencia' (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (SIAP, 2017).

En el estado de Morelos, México en el 2010 se tenían huertas de cítricos establecidas en 28 de los 33 municipios, con 1000 ha de superficie plantada, con alta producción y calidad de exportación. Actualmente se cuenta con una superficie establecida de 612 ha, en 17 municipios, donde se destaca el limón y la naranja 'Valencia', con 32 y 66 % de la superficie total respectivamente, y un rendimiento de 12.11 y 7.76 t ha<sup>-1</sup> respectivamente, siendo ambas especies las de mayor importancia económica en el estado de Morelos, el resto de la superficie está compuesta por otros cítricos (SIAP, 2017; CESVMOR, 2018). La presencia generalizada de árboles de lima 'Persa' con síntomas de gomosis, cáncer, muerte regresiva de ramas y muerte de árboles ha provocado una reducción en la productividad de los huertos y el aumento de los costos de producción. Las recomendaciones técnicas en el Estado se centran en el uso de fungicidas específicos para el control de varias especies de *Phytophthora*, agente causal de la gomosis de cítricos en otros estados de la República Mexicana (Acosta-Pérez *et al.*, 2012), sin embargo, los resultados no son satisfactorios. Los síntomas observados en árboles de lima 'Persa' coinciden con los causados por *Lasiodiplodia* spp en varias especies de árboles (Abdollahzadeh *et al.*, 2010). El primer reporte de este fitopatógeno fue realizado por Álvarez (1976) en el

trees coincide with those caused by *Lasiodiplodia* spp in various species of trees (Abdollahzadeh et al., 2010). The first report of the phytopathogen was made by Álvarez (1976) in cacao crop (*Theobroma cacao*). Recent reports indicate that this pathogen has been isolated from diverse citrus species, in California, USA, such as the 'Eureka' lemon, 'Valencia' orange, 'Washington Navel' orange, navel 'Fukomoto' orange, grapefruit, 'Satsuma' tangerine and 'Meyer' lemon (Adesemoye et al., 2014). It has also been reported that species of *Lasiodiplodia* are common in the tropics, causing diseases in plants, in pre and post-harvest and that their cellulolytic activity allows for penetration and colonization of the plant in a similar way to those of a soft rot causing-fungus, using the starch and other saccharides present in the initial substrate of the wood (Muñoz et al., 2015). The imports of other fruit hosts of this pathogen from other countries such as the nut and the English walnut (Li et al., 1995), grape (Linaldeddu et al., 2015; Rodríguez et al., 2015), sweet orange, oak, retama: Fabaceae (Linaldeddu et al., 2015), bitter orange (Alves et al., 2008), coconut (Dugan et al., 2015), mango (Johnson et al., 1992; Marques et al., 2013), papaya (Netto et al., 2014), poplar, willow (Hashemi & Mohammadi, 2016) Brazilian firetree (*Schizolobium parahyba* var. *Amazonicum*) (Mehl et al., 2014), eggplant (*Solanum melongena*) (Woodward et al., 2005), loquat (*Eriobotrya japonica*) (González et al., 2017), jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) (Ni et al., 2008), golden cane palm (*Dyopsis lutescens*) (Pereira et al., 2015), kenaf (Norhayati et al., 2016), *Jatropha* (Machado et al., 2014) and various introduced species of forest trees from other countries have eased the dispersion of this pathogen (Segura-Contreras et al., 2015).

Presently, there are reports in Mexico of a great variety of crops throughout the country such as: hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) in Guerrero (Aparicio et al., 2016), papaya (*Carica papaya* L.) in the central coast of the state of Veracruz (Becerra et al., 2014), heliconia in Tabasco (Ortiz et al., 2014), seeds of *Jatropha curcas* from collections of Puebla, Veracruz and Chiapas (Nolasco-Guzmán et al., 2014), *Aloe vera* in Tamaulipas (Zúñiga-Estrada & Yáñez, 2016), avocado (*Persea americana*), mango (*Mangifera indica*), coconut (*Cocos nucifera*), cassava (*Manihot esculenta*), sugarcane (*Sacharum officinarum*), citruses (*Citrus* spp.), Arabian coffee (*Coffea arabica*), purple yam (*Dioscorea alata*), sweet potato (*Ipomea batata*), maize (*Zea mays*), plum (*Prunus domestica*), sisal (*Agave sisalana*), Caribbean pine (*Pinus caribaeae*) of the main producing zones (Agroecología, 2018; Picos-Muñoz et al., 2015).

The impact of the fungal species of the family Botryosphaeriaceae on citrus has not been widely

cultivo de cacao (*Theobroma cacao*). Reportes recientes indican que este patógeno se ha aislado de diversas especies de cítricos, en California, USA, se aisló de limón 'Eureka', naranja 'Valencia', naranja 'Washington Navel', naranja navel 'Fukomoto', toronja, mandarina 'Satsuma' y limón 'Meyer' (Adesemoye et al., 2014). También se ha reportado que especies de *Lasiodiplodia* son comunes en los trópicos, causando enfermedades en plantas, en pre y postcosecha y que su actividad celulolítica permite la penetración y colonización de la planta de manera similar a la de un hongo que causa pudrición blanda, utilizando el almidón y otros sacáridos presentes en el sustrato inicial de la madera (Muñoz et al., 2015). Las importaciones de otros frutales hospederos de este patógeno de otros países tales como la nuez y el nogal inglés (Li et al., 1995), uva (Linaldeddu et al., 2015; Rodríguez et al., 2015), naranja dulce, encino, retama: Fabaceae (Linaldeddu et al., 2015), naranjo agrio (Alves et al., 2008), coco (Dugan et al., 2015), mango (Johnson et al., 1992; Marques et al., 2013), papayo (Netto et al., 2014), álamo, sauce (Hashemi & Mohammadi, 2016) guapuruvú (*Schizolobium parahyba* var. *Amazonicum*) (Mehl et al., 2014), berenjena (*Solanum melongena*) (Woodward et al., 2005), nispero (*Eriobotrya japonica*) (González et al., 2017), yuca (*Artocarpus heterophyllus*) (Ni et al., 2008), palma (*Dyopsis lutescens*) (Pereira et al., 2015), kenaf (Norhayati et al., 2016), *Jatropha* (Machado et al., 2014) y varias especies introducidas de árboles forestales, de otros países han facilitado la dispersión de este patógeno (Segura-Contreras et al., 2015).

Actualmente se tienen reportes en México en una gran diversidad de cultivos por toda la República Mexicana tales como: Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Guerrero (Aparicio-Apolinar et al., 2016), papaya (*Carica papaya* L.) en la costa central del Estado de Veracruz (Becerra-Leor et al., 2014), Heliconias en Tabasco (Ortiz-García et al., 2014), semillas de *Jatropha curcas* de colecciones de Puebla, Veracruz y Chiapas (Nolasco-Guzmán et al., 2014), sábila *Aloe vera* en Tamaulipas (Zúñiga-Estrada & Yáñez, 2016), aguacate (*Persea americana*), mango (*Mangifera indica*), coco (*Cocos nucifera*), yuca (*Manihot esculenta*), caña de azúcar (*Sacharum officinarum*), cítricos (*Citrus* spp.), café (*Coffea arabica*), ñame (*Dioscorea alata*), camote (*Ipomea batata*), maíz (*Zea mays*), ciruela (*Prunus domestica*), agave (*Agave sisalana*), pinos (*Pinus caribaeae*) de las principales zonas productoras (Agroecología, 2018; Picos-Muñoz et al., 2015).

explored, since it is probable that the diversity of fungi of this family in citrus is not well known and besides, is causing more damage than it was previously thought (Adesemoye *et al.*, 2014).

The majority of the descriptions of this phytopathogen have been based on their morphological characters and since the last decade, the identification has been complemented with molecular biology techniques (Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

According to studies performed by Phillips *et al.* (2013), due to the cosmopolitan presence, the wide number of hosts and the morphological variability of this pathogen, there are various cryptic species affecting citrus plantations in Mexico, which are generally separated by size and shape of the conidium. In this sense, the objective of this work was to isolate, identify and molecularly diagnose, the causal agent of dieback on branches and gummosis on plantations of 'Persian' lime in the state of Morelos, Mexico.

## Material and Methods

### Study location

The study was carried out in August 2015, in the state of Morelos, Mexico, geographically located at 22°51'43" NL and 102°36'38" WL and at 2,309 m.a.m.s.l., in commercial orchards of 'Persian' lime.

The evaluated plantations were located in the municipalities of Tlaltizapan, Ayala, Coatlan del Rio and Amayuca and were selected from the list of producers of 'Persian' lime of the Morelos State Plant Health Committee.

### Biological material sampling

Plantation sampling was performed according to what Acosta-Pérez *et al.*, (2012) proposed, forty-six samples were collected, from primary and secondary branches, and trunks from trees of five to eight years old, having symptoms of exuding of gum, cankers and dieback on branches, which were transported in polyethylene bags and conserved at 6 °C, until they were processing at the laboratory of Phytopathology of the Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc of the UAEM, Xalostoc, Morelos, Mexico (EESuX-UAEM).

### Fungus isolation

Samples were selected in fractions of 0.5 cm<sup>2</sup>, including the area of disease progression. The

El impacto de las especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae sobre los cítricos no se ha explorado ampliamente, por lo que, es probable que la diversidad de hongos, de esta familia en cítricos no se conoce bien y, además esté causando más daño de lo que se pensaba anteriormente (Adesemoye *et al.*, 2014).

La mayoría de las descripciones de este fitopatógeno se han basado en sus caracteres morfológicos, y es a partir de la década pasada que se ha complementado la identificación con técnicas de biología moleculares (Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

Según estudios realizados por Phillips *et al.* (2013), debido a la presencia cosmopolita, el amplio número de hospederos y la variabilidad morfológica de este patógeno, existen varias especies crípticas, que afectan las plantaciones cítricas en México, las cuales están separadas generalmente por el tamaño y forma del conidio. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue aislar, identificar y diagnosticar molecularmente, el agente causal de la muerte descendente de ramas y gomosis en las plantaciones de lima 'Persa' en el Estado de Morelos, México.

## Material y Métodos

### Lugar del estudio

El estudio se realizó en el mes de agosto del 2015, en el estado de Morelos, México, ubicado geográficamente a los 22°51'43" NL, 102°36'38" WL y 2,309 m.a.m.s.l., en huertos comerciales de lima 'Persa'.

Las plantaciones evaluadas se ubican en los municipios de Tlaltizapán, Ayala, Coatlán del Río y Amayuca, las cuales fueron seleccionadas a partir del padrón de productores de lima 'Persa' del Comité Estatal de Sanidad Vegetal.

### Colecta del material biológico

El muestreo en las plantaciones se realizó acorde con la propuesta de Acosta-Pérez *et al.* (2012), se colectaron 46 muestras, procedentes de ramas primarias, secundarias y troncos de árboles de cinco a ocho años de edad, con exudados de goma, canceres y muerte descendente de ramas, las que fueron transportadas en bolsas de polietileno y conservadas a 6 °C, hasta su procesamiento en el laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Estudios Superiores de Xalostoc de la UAEM, Xalostoc, Morelos, México (EESuX-UAEM).

### Aislamiento del hongo

Las muestras fueron seccionadas en fracciones de 0.5 cm<sup>2</sup>, incluyendo la zona de avance de la enfermedad.

fragments were disinfested by immersion in a solution of sodium hypochlorite (NaClO) at 2 % for 2 min and three washings with sterile distilled water for 2 min each; then, they were dried in sterile absorbent paper to eliminate the excess of water.

Subsequently, four fragments of tissue per Petri dish, containing potato dextrose agar (PDA) culture medium were incubated under white light at 24 °C ± for three days. Once the growth of the fungus occurred, the colonies were purified by means of the technique of hypha tip, in PDA culture medium to increase the colony.

The monosporic isolates were re-sown in vegetable juice V8 juice agar culture medium (Ortiz, 1996), then, the isolates were stored in test tubes with culture medium PDA covered in oil (Crous *et al.*, 2006).

#### **Morphological identification and characterization of the isolates**

The identification of the isolated was performed using taxonomic keys and descriptions by Phillips *et al.*, (2013), based on the morphological characters of the ascospores, conidial states, pigmentation, thickness of the wall and shape of the conidia, dimensions, septation, presence of paraphyse in the pycnidia and striations. The observation was carried out with a light field stereoscope Olympus®.

#### **Pathogenicity tests**

In order to verify the pathogenicity of the fungus, Koch's postulates and the technique described by Agrios (2005) were performed.

Certified one-year-old 'Persian' lime were inoculated, at a height of 15 cm from the ground, the stems were disinfested with sodium hypochlorite (NaClO) at 1.5 %. Then, an incision was made on the bark of the stem with a scalpel, of approximately 7 mm. Later on, discs of 0.5 cm of the isolate of the fungus were inoculated. The inoculation was performed by means of placement of the mycelium with culture medium in the openings of the stems, the control only received culture medium without the plant pathogen. In order to favor the infection, the inoculated area was covered with humidified cotton with sterile distilled water and covered with Parafilm®. The plants were kept individually under open field conditions. Visual evaluations were performed ever 15 d for three

Los fragmentos se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 2 % por 2 min y tres lavados con agua destilada estéril por 2 min cada uno, se secaron en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de agua.

Posteriormente, se incubaron cuatro fragmentos de tejido por placa de Petri, que contenían medio de cultivo de agar de dextrosa de patata (PDA) bajo luz blanca a 24 °C ± durante tres días. Una vez que se produjo el crecimiento del hongo, las colonias se purificaron mediante la técnica de punta hifa, en medio de cultivo PDA para aumentar la colonia.

Los aislados monospóricos, fueron resembrados en medio de cultivo jugo de vegetales V8-Agar (Ortiz, 1996), posteriormente se almacenaron en tubos de ensayo con medio PDA cubiertos con aceite (Crous *et al.*, 2006).

#### **Identificación y caracterización morfológica de los aislados**

La identificación de los aislados se realizó con la ayuda de las claves y descripciones taxonómicas de Phillips *et al.* (2013), basado en los caracteres morfológicos de las ascosporas, estados conidiales, pigmentación, grosor de la pared y forma de los conidios, dimensiones, septación, presencia de parafisos en los picnidios y estriaciones. La observación se llevó a cabo con un estereoscopio de campo claro, modelo Olympus®.

#### **Pruebas de patogenicidad**

Para comprobar la patogenicidad del hongo se realizaron los postulados de Koch y la técnica descrita por Agrios (2005).

Se inocularon tallos de plantas certificadas de lima 'Persa' de un año de edad, a una altura de 15 cm del suelo, los tallos se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1.5 %. Luego, con un bisturí se realizó una incisión a la corteza del tallo, de aproximadamente 7 mm. Posteriormente se inocularon con discos de 0.5 cm de aislado del hongo. La inoculación se realizó mediante la colocación de micelio con medio de cultivo en las aberturas de los tallos, el testigo solo recibió medio de cultivo sin él patógeno. Para favorecer la infección, el área inoculada se cubrió con algodón humedecido con agua destilada estéril y se resguardó con Parafilm®. Las plantas fueron mantenidas individualmente bajo condiciones a campo abierto. Se realizaron evaluaciones visuales cada 15 d por

months, recording the evolution of the symptoms of the disease on the inoculated plants.

When detecting the symptoms of the disease, the next step was re-isolation, with the purpose of verifying that the inoculated fungus corresponds originally to the isolated one. The morphological characteristics of the inoculated fungus were compared, in addition to the symptoms that the inoculated plants presented, according to the incubation period and damage of the tissue.

#### **Molecular identification**

The molecular identification was conducted at the laboratory of Phytopathology of the Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales, (INIFAP) Coyoacán, Mexico City, Mexico.

The extraction of genomic DNA (gDNA) was carried out using the AP method described by Sambrook & Russell (2012), using the mycelium of the monospore culture of the obtained isolates. The quality was assessed by horizontal electrophoresis in agarose gel at 1 % (Ultrapure, Gibco, USA) and the bands were visualized in a transilluminator (Gel Doc 2000, BIO RAD®, USA). The concentration of DNA was quantified with a spectrophotometer NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).

The primers used for the molecular identification of the fungi were ITS5 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS4 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') of the ribosomal gens (rDNA).

The analysis of the samples was corroborated by means of PCR according to the protocol described by Ahrens and Seemüller (1992), with modifications on the components such as: sterile ultrapure water (16.25 µL), TBE IX buffer solution (2.5 µL), MgCl<sub>2</sub> at 2.5 mM (1.25 µL), dNTPs at 0.2 mM (0.5 µL), ITS5 and ITS4 universal initiators at 20 mol (1 µL of each), DNA polymerase (Promega®) at 1U (0.5 µL) and 80 ng (2 µL) of gDNA previously extracted according to Sambrook and Russell (2012).

#### **Phylogenetic analysis**

DNA fragments amplified by PCR were purified using the Wizard kit (Promega®, USA), following the protocol recommended by the manufacturer. PCR purified product was sequenced by Macrogen Inc. (Seoul, South Korea).

3 meses, registrando la evolución de los síntomas de la enfermedad en las plantas inoculadas.

Al detectar los síntomas de la enfermedad, se procedió a hacer el reaislamiento, con el fin de verificar el hongo inoculado corresponde al hongo aislado originalmente.

#### **Identificación molecular**

La identificación molecular se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales Coyoacán, Ciudad de México, México.

La extracción del DNA genómico (DNAg), se llevó a cabo empleando el método AP descrito por Sambrook & Russell (2012), utilizando el micelio del cultivo monospórico de los aislamientos obtenidos. La calidad del mismo 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 DNA se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific®).

Los cebadores empleados para la identificación molecular de los hongos fueron ITS5 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') e ITS4 (5'-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G-3') de los genes ribosomales (rDNA).

El análisis de las muestras fue corroborado mediante PCR según el protocolo descrito por Ahrens & Seemüller (1992), con modificaciones en los componentes: agua ultrapura estéril (16.25 µL), solución amortiguadora TBE IX (2.5 µL), MgCl<sub>2</sub> a 2.5 mM (1.25 µL), dNTPs a 0.2 mM (0.5 µL), iniciadores universales ITS5 e ITS4 a 20 mol (1 µL de cada uno), DNA polimerasa (Promega®) a 1U (0.5 µL) y 80 ng (2 µL) de DNA g extraído previamente según Sambrook & Russell (2012).

#### **Análisis filogenético**

Los fragmentos de DNA amplificados por PCR fueron purificados empleando el kit Wizard (Promega®, USA), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El producto de PCR purificado fue secuenciado 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 (Hall, 1999). Las secuencias de hongos

The sequences were assembled, and edited with the CAP option (Contig Assembly Program) of the BioEdit v7.0.9.1 Software (Hall, 1999). The sequences of fungi were compared and deposited in GenBank database (NCBI, 2016).

The phylogenetic trees were constructed with the data from ITS5 and ITS4 terminations; additionally they were analyzed with the MEGA software (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) version 7.0.14 (Swofford, 2003; Tamura et al., 2007), aligned with ClustalW (Thomson et al., 1994) and compared with the sequences of homologous genes deposited on NCBI database (National Center for Biotechnology Information, NCBI, 2016).

After analyzing the congruence among data sets, a maximum parsimony (MP) analysis, the phylogenetic analyses were performed with PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) version 4.0b10 (Swofford, 2002). Phylogenetic trees were obtained with the heuristic search function with 1,000 repetitions of randomized addition, tree bisection and reconstruction (TBR) as algorithm of exchange of branches and the spaces or missing data were considered as complete deletions. The levels of significance of the tree ramification points were determined by means of bootstrapping with 1,000 repetitions (Kimura, 1980; Felsenstein, 1985; Hillis & Bull, 1993). The HG231345 sequence of *Phoma tracheiphila* from GenBank was used as the taxon out of group.

## Results and Discussion

### Morphological identification and characterization of the isolates

From the 46 sampled trees of 'Persian' lime, 16 isolates were obtained, presenting symptoms in primary and secondary branches with dieback and gummatous exudates. Only three of them were morphologically identified according to the taxonomic keys reported by Phillips et al., (2013).

In the observation by stereoscopic microscope, colonies with growth of smoked gray mycelium were identified, having from olive gray to greenish gray to dark blue slate and the presence of pycnidias 30 d after incubation. Just like conidia produced and formed by one single cell, oval-shaped, hyaline and double-wall with 17- 26 X 12 µm in size in immature colonies. In mature colonies, the conidia showed

fueron comparadas y depositadas en la base de datos del GenBank (NCBI, 2016).

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 (Swofford, 2003; 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 (NCBI, 2016).

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, 2002). 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. Los niveles de confianza de los puntos de ramificación de árboles fueron determinados mediante el análisis de bootstrapping con 1,000 repeticiones (Kimura, 1980; Felsenstein, 1985; Hillis & Bull, 1993). La secuencia HQ231345 de *Phoma tracheiphila* de GenBank se utilizó como el taxón fuera de grupo.

## Resultados y Discusión

### Identificación y caracterización morfológica de los aislados

De los 46 árboles muestreados de lima 'Persa', se obtuvieron 16 aislados con síntomas en ramas primarias y secundarias con muerte descendente y exudados gomosos. Solo tres de ellos fueron identificados morfológicamente según las claves taxonómicas reportadas por Phillips et al. (2013).

En la observación al microscopio estereoscópico, se identificaron colonias con crecimiento de micelio gris ahumado, luego gris olivo a gris verdoso a azul pizarra oscuro y la presencia de picnidios a los 30 d de incubación. Así como conidios producidos y formados por una sola célula, de forma ovalada, hialinos y de doble pared con 17- 26 X 12 µm de tamaño en colonias inmaduras. En colonias maduras, los conidios mostraron una coloración marrón oscura, dos células y estriaciones y 18-28 X 11-16 µm de tamaño, siendo similar con estructuras reproductivas

a dark brown coloration, two cells and striations and 18-28 X 11-16  $\mu\text{M}$  in size, been similar with asexual reproductive structures of the genus *Lasiodiplodia*, verruculous wall <2  $\mu\text{M}$ , 1-septum with longitudinal striations, which agrees with that reported by Phillips *et al.*, (2013).

Similar results were obtained by Slippers *et al.* (2004) and Alves *et al.* (2008), achieving moderately dense colonies in culture medium, with aerial mycelium that was initially white and the turning olive-gray 7 d later, and finally obtaining a dark blue slate.

Damm *et al.* (2007) and Netto *et al.* (2014) confirmed that the main characteristic distinguishing *Lasiodiplodia* genus from other closely related genera is the presence of pycnidia, paraphyses and longitudinal striations in mature conidia, which coincides with what was observed in this study.

The dimensions of the conidia and the paraphyses, agree with what was established by Pitt & Hocking (2009), Phillips *et al.* (2013) and Muñoz *et al.* (2015) for this genus.

Varela *et al.* (2013) described them as the causal agent of death of bitter orange plants engrafted with different species of citrus in nurseries, as well as the death of branches in Mexican lemon trees and of rot of the peduncle in orange fruits.

The confusion on the diagnostic of the pathogen agent is because it produces very similar symptoms as those by *Phytophthora parasitica*, like the formation of gummosis, leaf spots, fruit rotting, dieback, perennial cankers and death of trees, all of these are associated with several species of fungi of Botryosphaeriaceae (Muñoz *et al.*, 2015).

It has to be pointed out that up to now, this disease had not been reported for the state of Morelos on 'Persian' lime, reasons that would justify the inefficiency of its management in the field.

Three species of the *Lasiodiplodia* genus were morphologically identified and characterized. The first one showed colonies with absent conidiophores, holoblastic conidiogenic cells are discreet, hyaline, flat, of thin-wall, cylindrical, proliferating with 1-2 rings, 11-16 X 3-5  $\mu\text{M}$ . Conidium initially hyaline, aseptate, ellipsoid to ovoid, with granular content, both ends widely rounded, wall <2  $\mu\text{M}$ , pigmented, verruculous, ovoid, 1-septate with longitudinal striations, corresponding to *L. citricola* species (Figure 1).

asexuales del género *Lasiodiplodia*, pared verruculosa <2  $\mu\text{M}$ , 1-septo con estriaciones longitudinales, lo que concuerda con lo reportado por Phillips *et al.* (2013).

Resultados similares fueron obtenidos por Slippers *et al.* (2004) y Alves *et al.* (2008), logrando colonias en medio de cultivo moderadamente densas, con micelio aéreo que inicialmente fueron blancas tornándose gris-olivo a los 7 d hasta llegar a un color azul pizarra oscuro.

Damm *et al.* (2007) y Netto *et al.* (2014) confirmaron que la principal característica que distingue al género *Lasiodiplodia* de otros géneros cercanamente relacionados es la presencia de picnidios, parafisos y estriaciones longitudinales en conidios maduros, lo cual coincide con lo observado en este estudio.

Las dimensiones de los conidios y los parafisos, concuerdan con las planteadas por Pitt & Hocking (2009), Phillips *et al.* (2013) y Muñoz *et al.* (2015) para este género.

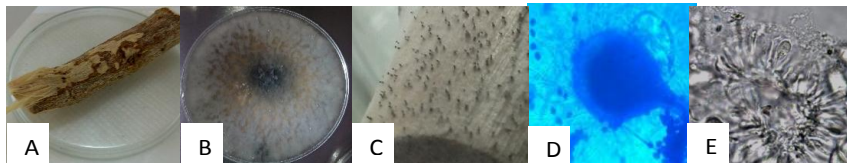
Varela *et al.* (2013) lo describen como el agente causal de la muerte de plantas de naranjo agrio injertadas con diferentes especies de cítricos en viveros, así como la muerte de ramas en árboles de limón mexicano y de la pudrición del pedúnculo en frutos de naranja.

La confusión en el diagnóstico del agente patógeno se debe a que produce síntomas muy similares a los que provoca *Phytophthora parasitica*, como la formación de gomosis, manchas foliares, pudriciones de frutas, muerte regresiva, canceres perennes y la muerte de árboles, todos estos asociados a diversas especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae (Muñoz *et al.*, 2015).

Debe señalarse que hasta la fecha no había sido informada esta enfermedad para el estado de Morelos sobre lima 'Persa', razones que justificarían la ineffectividad de su manejo en campo.

Se identificaron y caracterizaron morfológicamente tres especies dentro del género *Lasiodiplodia*. La primera mostró colonias con conidióforos ausentes, células conidiógenas holoblásticas, discretas, hialinas, lisas, de pared delgada, cilíndricas, proliferando recurrentemente con 1-2 anillos, 11-16 X 3-5  $\mu\text{M}$ . Conidio inicialmente hialino, aseptado, elipsoide a ovoide, con contenido granular, ambos extremos redondeados ampliamente, pared <2  $\mu\text{M}$ , pigmentada, verruculosa, ovoide, 1-septado





**Figure 1.** Branch in humid chamber (A), isolated strain (5 d) (B), formation of pycnidia after 7 days in humid chamber (C), body of the picnid and conidio of *L. citricola*, (D) picnidio cut where paraphyses, growing and immature conidia are observed (E).

**Figura 1.** Rama enferma en cámara húmeda (A), cepa aislada de cinco días de edad (B), formación de picnidios después de 7 días en rama bajo cámara húmeda (C), picnidio y conidios de *L. citricola* bajo microscopio compuesto a 10X y (D) corte de picnidio donde se observan parafisos, conidio en crecimiento e inmaduro (E).

Another species identified and characterized was *L. pseudotheobromae*, with ellipsoidal conidia, rounded apexes and bases, wider in its center at two superior thirds, of thick walls, hyaline, and with no septa.

The third species corresponded to *L. theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl., presenting hyaline conidiogenic cells, whit thin wall, flat, cylindrical to sub-pear-shaped, holoblastic, discreet, determined or undetermined and proliferating by one or two distinct rings, or proliferating at the same level, making room for periclinal thickening, the conidium is sub-ovoid to ovoid ellipsoid, widely rounded apex, sharpening at the truncated base, wider in the medium third to superior third, thick walls, granular content, initially hyaline and accepted, staying hyaline, coming to be dark brown and only 1-septate. Then, it produces the unloading of conidioms, with melanin deposits on the interior surface of the longitudinally disposed wall, giving a striated appearance to the conidia.

*L. theobromae*, is cosmopolitan and has a wide range of hosts (approximately 500), including monocotyledons, dicotyledons, and gymnosperms, is a pleomorphic and ubiquitous fungus, which has produced more than one synonym (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011, cited by Picos *et al.*, 2015). Although it has a wide geographical distribution, it is common in the tropics and subtropics This non-specialized plant pathogen has been reported causing numerous diseases, including dieback, root rot, fruit rot, leaf spots and “witch’s broom”, among many others. It can also be an endophyte (Mohali *et al.*, 2005). Given that its

con estriaciones longitudinales, correspondientes a la especie *L. citricola* (Figura 1).

Otra de las especies identificada y caracterizada fue *L. pseudotheobromae*, observándose conidios elipsoidales, ápices y bases redondeadas, más anchas en su medio a dos tercios superiores, de paredes gruesas, hialinas y sin septos.

La tercera especie correspondió a *L. theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl., observándose células conidiógenas hialinas, de pared delgada, lisas, cilíndricas a sub-obpiriformes, holoblásticas, discretas, determinadas o indeterminadas y proliferantes por una o dos anillos distintos, o proliferando al mismo nivel, dando lugar a espesamientos periclinales, el conidia es subovoide a elipsoide ovoide, ápice redondeado ampliamente, afilando a la base truncada, más ancho en el tercio medio a tercero superior, paredes gruesas, contenido granular, inicialmente hialino y aceptado, permaneciendo hialina, llegando a ser marrón oscuro y 1-septado solamente. Luego produce la descarga de los conidiomas, con depósitos de melanina en la superficie interior de la pared dispuesta longitudinalmente dando una apariencia estriada a los conidios.

*L. theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl., es cosmopolita y tiene un amplio rango de hospederos (aproximadamente 500), incluidos monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, es un hongo pleomórfico y ubicuo, el cual ha tenido más de un sinónimo (Abdollahzadeh *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011, citados por Picos-Muñoz *et al.*, 2015). Aunque tiene una amplia distribución geográfica, es común en los trópicos y subtropicos. Este patógeno de plantas no especializado ha sido reportado causando numerosas enfermedades, incluida la muerte regresiva, pudrición de raíz, pudrición de frutos, mancha foliar y escoba de bruja entre muchos otros. También llega a ser un endófito (Mohali *et al.*, 2005). En vista

occurrence is generalized, their great quantity of hosts and their known morphology and variability, it is possible that *L. theobromae* is composed of a quantity of cryptic species (Punithalingam, 1980).

*Lasiodiplodia pseudotheobromae* is a species related to *L. theobromae* and has been recently described in *Acacia*, *Citrus aurantium*, *Coffea*, *Gmelina* and *Rosa* (Alves *et al.*, 2008). It has been reported in different species of *Citrus*, but up to now it had not been reported in 'Persian' lime. Slippers & Wingfield (2007), reported these phytopathogens as endophyte species in commercial orchards of citrus in Mexico.

#### Pathogenicity tests

The pathogenicity tests performed on certified 'Persian' lime plants, revealed that the isolated fungi in this study were pathogens for this culture, observing the first symptoms at 22 DAI (days after inoculation), thus confirming that the identified species of the *Lasiodiplodia* genus were associated with this disease and were able to cause chlorosis on leaves, dieback on primary and secondary branches, formation of canker and gummatous exudates.

The leaves of sick trees turned chlorotic, compared to the control's leaves. This symptomatology became more notorious on some plants, in addition the stems showed brownish wounds. In inoculated plants, damages characteristic on stems were not observed.

At 29 DAI, the plants showed leaves with marked chlorosis in the central nerve, while healthy plants did not show damage on their stems and leaves.

At 36 DAI, a marked chlorosis with respect to the other observations was noted, finding yellow leaves, but a little rolled, and formation of a wound in the base of the stem (rot) of some plants.

At 42 DAI, some trees showed the formation of a well-defined canker at the base of the stem. The control trees (not inoculated), did not show symptoms of any disease and kept on being healthy until the end of the evaluations. Moriwaki *et al.*, (2003) reported that the pathogenicity tests and morphological characters

de su ocurrencia generalizada, gran cantidad de hospederos y su conocida morfología y variabilidad, es posible que *L. theobromae* se componga de una cantidad de especies crípticas (Punithalingam, 1980).

*Lasiodiplodia pseudotheobromae* es una especie emparentada con *L. theobromae* y se ha descrito recientemente en cultivares de *Acacia*, *Citrus aurantium*, *Coffea*, *Gmelina* y *Rosa* (Alves *et al.*, 2008). Se ha reportado en diferentes especies del género *Citrus*, pero hasta el momento no se había reportado en lima 'Persa'. Slippers & Wingfield (2007), reportaron a estos fitopatógenos como especies endófitas de huertos comerciales de cítricos en México.

#### Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad realizadas en las plantas certificadas de lima 'Persa', revelaron que los hongos aislados en este estudio son patógenos para este cultivo, observándose los primeros síntomas a los 22 días después de la inoculación (DAI), confirmándose que las especies del género *Lasiodiplodia* identificadas están asociadas a esta enfermedad y que son capaces de ocasionar clorosis en hojas, muerte descendente de ramas primarias y secundarias, la formación de cánceres y exudados gomosos.

Las hojas de las plantas enfermas se tornaron cloróticas, a diferencia de las del testigo. Esta sintomatología se hizo más notoria en algunas plantas, además los tallos mostraron heridas de color café. En las plantas inoculadas, no se observaron daños característicos en tallos.

A los 29 DAI, las plantas mostraron hojas con clorosis marcada en el nervio central, mientras que en las plantas sanas los tallos y hojas no mostraron daño.

A los 36 DAI se apreció una clorosis marcada con respecto a las demás observaciones, encontrándose hojas amarillentas, pero poco enrolladas, y la formación de una herida en la base del tallo (pudrición) de algunas plantas.

A los 42 DAI, algunos árboles mostraron la formación de un cáncer bien definido en la base del tallo. Los árboles testigo (sin inocular), no evidenciaron síntomas de ninguna enfermedad y se mantuvieron sanos hasta el final de las evaluaciones. Moriwaki *et al.* (2003) reportaron que las pruebas de patogenicidad y caracteres morfológicos permiten separar taxonómicamente las especies del género *Lasiodiplodia*. Estos resultados demuestran la importancia

allow to taxonomically separate the species of the *Lasiodiplodia* genus. These results demonstrate the importance and current validity of the traditional tools for separating the species in the taxonomy of fungi. Also, very important for producers of 'Persian' lime, who export a large part this fruit. The molecular and morphological characters showed the same species of inoculated *Lasiodiplodia*.

#### Molecular identification

Studies performed by PCR using ITS5/ITS4 primers showed the amplification of DNA fragments of 500 pb starting from the fungal mycelium of the samples for all the isolates.

The sequence analysis showed that the fungi correspond to *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*. However, 13 of the obtained isolates, could not be aligned to any species of the *Lasiodiplodia* genus.

These results suggest that these pathogen species prevailing in the orchards of citrus constitute a threat to plantations health (Timmer *et al.*, 2002), then adequate control treatments have to be implemented, since this disease is going to be an important economic problem in the region, due to the high susceptibility of 'Persian' lime to this disease.

Bautista-Cruz *et al.* (2018) studied on the phylogeny, distribution and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated to cankers and symptoms of dieback in 'Persian' lime in the states of Veracruz and Puebla, Mexico, where *Lasiodiplodia pseudotheobromae* and *L. theobromae* were isolated, which are similar with the present study, suggesting that both species are spreading throughout the citrus plantations in Mexico, constituting a threat for national production.

Guajardo *et al.* (2018). reported *L. theobromae* for the first time in Chile causing gummosis in lemon. Then, it is why constant monitoring of this pathogen is important so that it does not extend its dissemination in the main commercial orchards or citrus in Mexico.

Adesemoye *et al.* (2014) reported other species of Botryosphaeriaceae in 'Persian' lime in California, United States of America, such as *Diplodia seriata* and *Dothiorella viticola*.

y actual vigencia de las herramientas tradicionales en la separación de especies en la taxonomía de hongos. Siendo importante para los productores de lima 'Persa', que exportan en gran parte esta fruta. Los caracteres morfológicos y moleculares mostraron a las mismas especies de *Lasiodiplodia* inoculadas.

#### Identificación molecular

Los estudios realizados por PCR empleando los cebadores ITS5/ITS4 mostraron la amplificación de fragmentos de DNA de 500 pb a partir de micelio fúngico de las muestras para todos los aislados.

El análisis de secuencia mostró que los hongos corresponden a las especies *Lasiodiplodia citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*. Sin embargo, 13 de los aislamientos obtenidos, no se lograron alinear a ninguna especie del género *Lasiodiplodia*.

Estos resultados sugieren que estas especies que prevalecen en las huertas de cítricos constituyen una amenaza a la sanidad de las plantaciones (Timmer *et al.*, 2002), por lo que se deben implementar tratamientos de control adecuados, ya que está siendo un problema de importancia económica en la región, debido a la alta susceptibilidad de la lima 'Persa' a esta enfermedad.

Bautista-Cruz *et al.* (2018) reportaron estudios sobre la filogenia, distribución y patogenicidad de especies de *Lasiodiplodia* asociadas con canchales y síntomas de muerte regresiva de lima 'Persa' en los estados de Veracruz y Puebla, México, donde aislaron especies de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, y *L. theobromae*, lo cual coincide con los resultados obtenidos, lo que sugiere que ambas especies se están propagando en las plantaciones cítricas del México, lo que constituye una amenaza para la producción a nivel nacional.

Guajardo *et al.* (2018) reportan a *L. theobromae* por primera vez en Chile causando gomosis en limón. El monitoreo constante de este patógeno es importante para que no se extienda su disseminación en los principales huertos comerciales de cítricos en México. Adesemoye *et al.* (2014) reportaron otras especies de la familia Botryosphaeriaceae en lima 'Persa' en California, Estados Unidos, tales como *Diplodia seriata* y *Dothiorella viticola*.

Otros estudios de diversidad genética afirman que las dos especies crípticas de *Lasiodiplodia* (*L. theobromae* y *L.*

Other studies on genetic diversity affirm that the two cryptic species of *Lasiodiplodia* (*L. theobromae* and *L. pseudotheobromae*) have not been found in the same host, suggesting that a possible hybridization between them have been found yet (Begoude *et al.*, 2010). On the other hand, Al-Sadi *et al.* (2013) found a moderate level of genetic diversity in populations of three species of *Lasiodiplodia* from different hosts and geographic origins, and a high number of not-specified genotypes.

The molecular markers have recently been used for examining gens and genotypes, modes of reproduction and speciation of a number of fungi, including *Botryosphaeria* spp. and their anaphorms (Burgess *et al.*, 2006).

The 15 obtained sequences were deposited in Genbank with access numbers for: *Lasiodiplodia citricola* (KY271187), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (KY284596), *Lasiodiplodia theobromae* (KY284589, KY284587) and *Lasiodiplodia* spp. (KY284584, KY284595, KY284594, KY290890, KY284592, KY284593, KY284588, KY284591, KY284586, KY284585 and KY284590), respectively.

#### Phylogenetic analysis

The phylogenetic tree obtained from the DNA analysis of the 16 isolations of *Lasiodiplodia* is shown in Figure 2.

Species groups did not change, maintaining a similar topology of the cladograms. In the bayesian analysis, the position of the clades (groupings) of *Lasiodiplodia* among each other were different, but inside of each species the topology was similar to the tree with maximum parsimony (TreeBase 11035). In this study, the following four clades were identified: Clade 1 (*Lasiodiplodia* spp.), Clade 2 (*L. citricola*), Clade 3 (*L. pseudotheobromae*) and Clade 4 (*L. theobromae*). The species *Dothiorella viticola* (EF445360) and *Phoma tracheiphila* (HQ231345) were considered out of the group.

Different studies consider that a support high or equal to 70 % provides reliable data about the positioning of each species in the cladogram (Arnold *et al.*, 2007), which agrees with the results obtained in the present study.

As a consequence, the formation of the tree allowed the conformation of groupings, which confirm the presence

*pseudotheobromae*), no han sido encontradas y estudiadas en el mismo hospedero, por lo que se desconoce de alguna posible hibridación entre ambas (Begoude *et al.*, 2010). Por otro lado, Al-Sadi *et al.* (2013) encontraron un moderado nivel de diversidad genética en poblaciones de tres especies de *Lasiodiplodia* provenientes de distintos hospederos y orígenes geográficos, y un alto número de genotipos no especificados.

Los marcadores moleculares se han empleado recientemente para examinar genes y genotipos, modos reproductivos y especiación de un número de hongos, incluyendo *Botryosphaeria* spp. y sus anamorfos (Burgess *et al.*, 2006).

Las 15 secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank con números de accesos para: *Lasiodiplodia citricola* (KY271187), *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (KY284596), *Lasiodiplodia theobromae* (KY284589, KY284587) y *Lasiodiplodia* spp. (KY284584, KY284595, KY284594, KY290890, KY284592, KY284593, KY284588, KY284591, KY284586, KY284585 y KY284590), respectivamente.

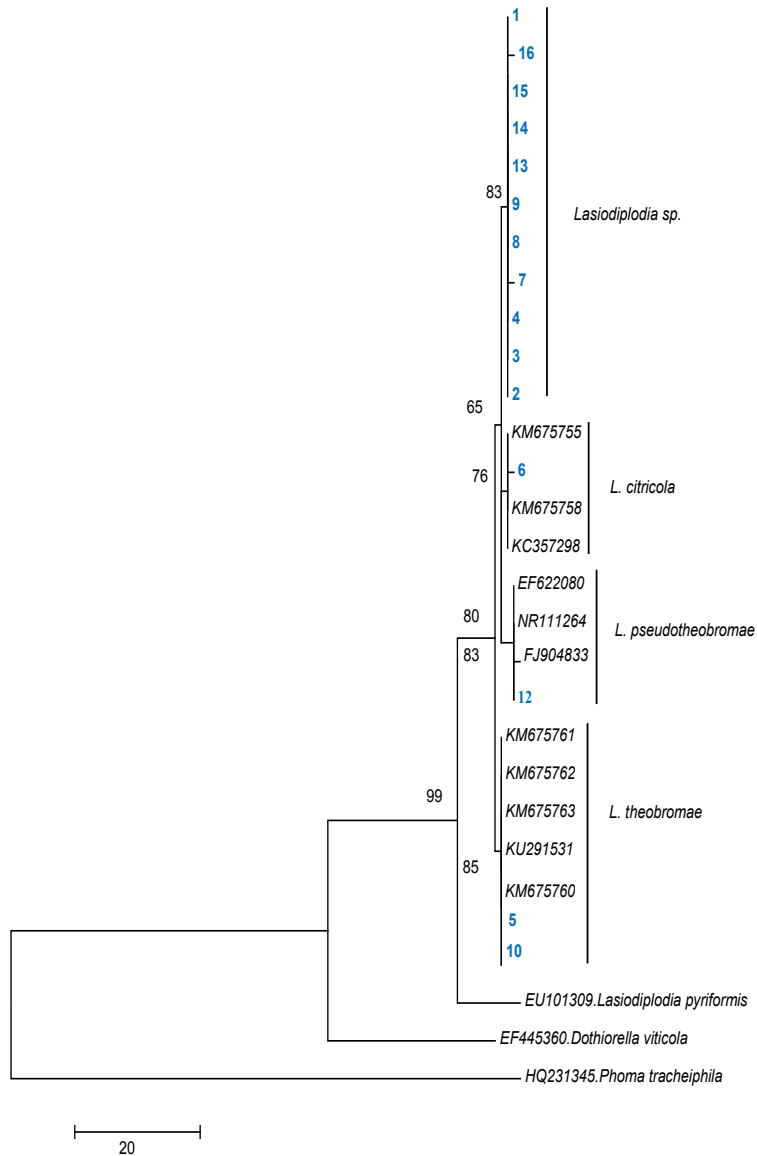
#### Análisis filogenético

El árbol filogenético obtenido del análisis del DNA de los 16 aislamientos del género *Lasiodiplodia* se muestra en la Figura 2.

Los agrupamientos de las especies no cambiaron, manteniendo una topología similar de los cladogramas. En el análisis bayesiano, la posición de los clado (agrupamientos) de las especies de *Lasiodiplodia* en relación entre sí fueron diferentes, pero dentro de cada especie la topología fue similar al árbol de máxima parsimonia (TreeBASE 11035). En este estudio se identificaron cuatro cladogramas, estos fueron: Clado 1 (*Lasiodiplodia* spp.), Clado 2 (*L. citricola*), Clado 3 (*L. pseudotheobromae*) y Clado 4 (*L. theobromae*). Las especies *Dothiorella viticola* (EF445360) y *Phoma tracheiphila* (HQ231345) se encontraron representadas fuera de grupo.

Diferentes estudios consideran que un soporte superior o igual al 70 % brinda una información confiable sobre el posicionamiento de cada especie en el cladograma (Arnold *et al.*, 2007), lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio.

En consecuencia, la formación del árbol permitió la conformation de agrupaciones, las cuales confirman la



**Figure 2. Phylogenetic tree based on Bayesian and maximum parsimony analysis using ITS 5 and ITS 4 primers.**

**Figura 2. Árbol filogenético basado en el análisis bayesiano y máxima parsimonia utilizando los primer ITS 5 e ITS 4.**

for the first time of three species of the *Lasiodiplodia* affecting the plantations of 'Persian' lime in the state of Morelos, Mexico.

presencia de tres nuevas especies del género *Lasiodiplodia* afectando las plantaciones de lima 'Persa' en el estado de Morelos, México.

## Conclusion

The symptoms observed in plantations of 'Persian' lime, with dieback and gummatous exudates, from the municipalities of: Tlaltizapan, Ayala, Coatlan del Rio and Amayuca, in the state of Morelos, 16 isolates were obtained, from which three species were identified corresponding to *Lasiodiplodia* as *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* and *L. theobromae*. Also, it was confirmed for their morphology, pathogenicity and molecular analysis performed on the ITS 5 and ITS 4 gens, with a genetic distance up to 99 %, which were grouped into four clades according to the phylogenetic tree and located in GenBank. This is a new reports of fungal pathogenic agents in 'Persian' lime for the state of Morelos, Mexico.

## Conclusiones

Los síntomas observados en plantaciones de lima 'Persa', con muerte descendente y exudados de goma, procedentes de los municipios: Tlaltizapán, Ayala, Coatlán del Río y Amayuca, en el estado de Morelos, se obtuvieron 16 aislados, entre los que se identificaron tres especies correspondientes al género *Lasiodiplodia*: *L. citricola*, *L. pseudotheobromae* y *L. theobromae*. Asimismo, se confirmó su morfología, patogenicidad y análisis molecular a partir de los genes ITS 5 e ITS 4, con una distancia genética hasta del 99 %, fueron agrupadas en cuatro clados según el árbol filogenético y ubicadas en el GenBank, considerándose como nuevos reportes de agentes patogénicos fungosos en lima 'Persa' para el Estado de Morelos, México.

## References

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Mohammadi G, E., Zare, R. and Phillips, A. J. L. (2010). Phylogeny and morphology of four new species of *Lasiodiplodia* from Iran. *Molecular Phylogeny and Evolution of Fugin* 25: 1–10. <https://doi.org/10.3767/003158510X524150>
- Acosta-Pérez, J. A., Ortiz-García, C. F., Zaldívar-Cruz, J. M., Rodríguez-Cuevas, M., Bautista-Muñoz, C. C. and Castillo-Aguilar, de la C. (2012). Identificación del agente causal e importancia de la gomosis en la zona cítrica de Huimanguillo, Tabasco, México. *Universidad y ciencia*, 28(3): 245-258. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0186-29792012000300004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792012000300004&lng=es&tlng=es)
- Adesemoye, A. O., Mayorquin, J. S., Wang, D. H., Twizeyimana, 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. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0492-RE>
- Agrios, G. N. (2005). Introduction to plant pathology. *Elsevier Academic Press Publication*. ISBN: 978-0-12-044563-9. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-01423-8>
- Agroecología. (2018). Pudrición negra de los frutos y cáncer del tronco, ramas y raíces. <http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=3788>
- Ahrens, U. & 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)
- Al-Sadi, A. M., Al-Wehaibi, A. N., Al-Shariqi, R. M., Al-Hammadi, M. S., Al-Hosni, I., Al-Mahmooli, I. H. and Al-Ghaithi A. G. (2013). Population genetic analysis reveals diversity in *Lasiodiplodia* species infecting date palm, citrus, and mango in Oman and the UAE. *Plant Disease* 97(10): 1363-1369. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0245-RE>
- Álvarez, M. G. (1976). Primer catálogo de enfermedades de plantas Mexicanas. *Fitofilo* 71: 169 <https://biblat.unam.mx/es/revista/fitofilo>
- Alves, A., Crous, P. W., Correia, A. and Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity* 28: 1-13. <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/28-1.pdf>
- Aparicio-Apolinar, E., Gallardo-Huertas, A. F., Valle-de la Paz, M., Gijón-Hernández, A. R. and Guillén-Sánchez, D. (2016). Identificación molecular de hongos asociados al manchado del cáliz en Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) en Tecoaapa y Mecatepec, Guerrero, México. En *Revista Mexicana de Fitopatología. Mexican Journal of Phytopathology*. Fully Bilingual. ISSN-2007-8080. Volumen 34: 45 p.
- Arnold, A., Henk, D., Eells, R., Lutzoni, F. and Vilgalys, R. (2007). Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endo-

- phytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Micología*, 99(2): 185–206. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832578>
- Bautista-Cruz, M. A., Almaguer-Vargas, G., Leyva-Mir, S. G., Colinas-León, M. T., C. Correia, K., Camacho-Tapia, M., Robledo-Yenera L., Michereff S.J. and Tovar-Pedraza, J. M. (2018). Phylogeny, distribution, and pathogenicity of *Lasiodiplodia* species associated with cankers and dieback symptoms of Persian lime in Mexico. *Plant Disease*, (ja). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1036-RE>
- Becerra-Leor, E. N., Rosas-González, X. and Silva-Rosales, L. (2014). Enfermedades presentes en el cultivo de papaya (*Carica papaya* L.) en la costa central del Estado de Veracruz durante los años 2012-2013. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 32 (Suplemento). S59.
- Begoude, B. A. D., Slippers, B., Wingfield, M. J. and Roux, J. (2010). Characterization of Botryosphaeriaceae and Cryptonectriaceae associated with *Terminalia* spp. in Africa, PhD Thesis, University of Pretoria. 268 p. <https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/28515/Complete.pdf?sequence=6>
- Burgess, T. I., Barber, P. A., Mohali, S., Pegg, G., de Beer, W. and Wingfield, M. J. (2006). Three new *Lasiodiplodia* spp. From the tropics, recognized based on DNA sequence comparisons and morphology. *Mycologia* 98(3): 423-435. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17040071>
- CESVMOR. (Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos A.C.) (2018). Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos. Campaña contra huanglongbing de los cítricos. Primer reporte de enero del 2018. <https://cesvmor.org.mx/informes-mensuales-sanidad-vegetal-2018/>
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F., Phillips, A. J., Alves A., BurgessT., BarberP. and Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. *Studies in Mycology*, 55: 235-253. <https://doi.org/10.3114/sim.55.1.235>
- Damm, U., Crous, P. W. and Fourie, P. H. (2007). Botryosphaeriaceae as potential pathogens of *Prunus* in South Africa, with descriptions of *Diplodia africana* and *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Mycologia* 99(5): 664-680. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18268901>
- Dugan, F. M., Lupien, S. L., Osuagwu, A. N., Uyoh, E. A., Okpako, E. and Kisha, T. (2015). New Records of *Lasiodiplodia theobromae* in seeds of *Tetrapleura tetraptera* from Nigeria and fruit of *Cocos nucifera* from Mexico. In: 2015 *Journal of phytopathology*. <https://doi.org/10.1111/jph.12384>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Society for the Study of Evolution*, 39(4): 783-791. <https://doi.org/10.2307/2408678>
- Guajardo, J., Riquelme, N., Tapia, L., Larach, A., Torres, C., Camps, R. and Besoain, X. (2018). First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Bot Gummosis in *Citrus limon* in Chile. *Plant Disease*, 102(4): 818 <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1517-PDN>
- González, D. E., Alves, A., León, M., and Armengol, J. (2017). Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with diseased loquat (*Eriobotrya japonica*) in Spain. *Plant Pathol.* 66:77-89. DOI:10.1111/ppa.12556.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*. Vol. 41: pp. 95-98. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000. Oxford University Press, <http://jwbrown.mbio.ncsu.edu/JWB/papers/1999Hall1.pdf>
- Hashemi, H. & Mohammadi, H. (2016). Identification and characterization of fungi associated with internal wood lesions and decline disease of willow and poplar trees in Iran. *Forest Pathology*, 46: 341–352. <https://doi.org/10.1111/efp.12269>
- Hillis, D. M. & Bull, J.J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology* 42(2): 182-192. <https://doi.org/10.1093/sysbio/42.2.182>
- Johnson, G. I., Mead, A. J., Cooke, A. W. and Dean, J. R. (1992). Mango stem end rot pathogens-Fruit infection by endophytic colonization of the inflorescence and pedicel. *Annals of Applied Biology*. 120: 225-234. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1992.tb03420.x>
- Kimura, M. (1980) A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16(2): 111-120. <https://doi.org/10.1007/BF01731581>
- Li, H. Y., Cao, R. B., and Mu, Y. T. (1995). In vitro inhibition of Botryosphaeria dothidea and Lasiodiplodia theobromae, and chemical control of gummosis disease of Japanese apricot and peach trees in Zhejiang Province, China. *Crop*

- Protection 14:187-191. [DOI: 10.1016/0261-2194\(95\)00011-A](https://doi.org/10.1016/0261-2194(95)00011-A).
- Linaldeddu, B. T., Deidda, A., Scanu, B., Franceschini, A., Serra, S., Berraf, T. A., Zouaoui, B. M., Ben, J. M. L. and Phillips, A. J. L. (2015). 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(1): 201-214 <https://doi.org/10.1007/s13225-014-0301-x>
- Machado, A. R., Pinho, D. B. & Pereira, O. L. (2014). Phylogeny, identification and pathogenicity of the Botryosphaeriaceae associated with collar and root rot of the biofuel plant *Jatropha curcas* in Brazil, with a description of new species of *Lasiodiplodia*. *Fungal Diversity*. 67(1): 231-247 <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0274-1>
- Marques, M. W., Lima, N. B., De Morais Js M.A., Barbosa G. M.A., Souza B.O., Michereff S.J., Phillips A.J.L. and Marcos, A. (2013). Species of *Lasiodiplodia* associated with mango in Brazil. *Fungal Diversity* 61(1): 181-193 <https://doi.org/10.1007/s13225-013-0231-z>
- Mehl, J. W. M., Slippers, B., Roux, J. and Wingfield, M. J. (2014). Botryosphaeriaceae associated with die-back of *Schizolobium parahyba* trees in South Africa and Ecuador. *Forest. Pathology*. 44: 396-408. <https://doi.org/10.1111/efp.12116>
- Mohali, T., Burgess, I. S., and Wingfield, M., J. (2005). Diversity and host association of the tropical tree endophyte *Lasiodiplodia theobromae* revealed using simple sequence repeat markers. *Forest Pathology*. 35: 385-396. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0329.2005.00418.x>
- Moriwaki, J., Sato, T. and Tsukiboshi, T. (2003). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. Nov. Japan. *Mycoscience* 44: 47-53. <https://doi.org/10.1007/S10267-002-0079-7>
- Muñoz, P., García-Estrada, R., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A. and Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33(1): 54-74. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61240687004>
- NCBI. (El Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (2016). National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
- Netto, M. S. B., Assuncao, I. P., Lima, G. S. A., Marques, M. W., Lima, W. G., Monteiro, J. H. A., de Queiroz, B. V., Michereff, S. J., Phillips, A. J. L. and Camara, M. P. S. (2014). Species of *Lasiodiplodia* associated with papaya stem-end rot in Brazil. *Fungal Diversity*. 67(1): 127-141. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0279-4>
- Ni, H. F., Chen, R. S., Chang, S. F. and Yang, H. R. (2008). First report of *Lasiodiplodia* fruit rot of Jack fruit in Taiwan. *Plant pathology*. Disease Notes 92(7): 1137. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-92-7-1137A>
- Nolasco-Guzmán, V., Tovar-Pedraza, J. M., Cabrera-Huerta, E., Ayala-Escobar, V., Calyéac-Cortero, H. G., and Miranda-Rangel, A. (2014). Diversidad de hongos en semillas de *Jatropha curcas* de colecciones de Puebla, Veracruz y Chiapas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 32 (Suplemento). S64.
- Norhayati, M., Erneeza, M. H. and Kamaruzaman, S. (2016). Morphological, pathogenic and molecular characterization of *Lasiodiplodia theobromae*: A causal pathogen of black rot seed Kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *International Journal of Agriculture and Biology* 18(1): 80-85. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.0065>
- Ortiz, G. C. F. (1996). Etude de la diversite genetique de populations de *Phytophthora* pathogenes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.) (No. 04; TESIS.).129 p. <http://catalogue-bibliotheques.cirad.fr/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=19334>
- Ortiz-García, F., Ramos-Hernández, E., Teran-Villanueva, N. and Saldaña-y-Hernández, M. I. (2014). Enfermedades de las Heliconias en plantaciones de Tabasco, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 32 (Suplemento). S63.
- Pereira, de M. M., Evando, A. B. J. J., Silva, M. K., Intra, M. S. and Liparini, P. O. (2015). First report of *Lasiodiplodia theobromae* causing stipe canker on ornamental palm (*Dypsis lutescens*) in Brazil. *Plant Disease*. Volume 0, Number. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-08-16-1188-PDN>
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A. and Allende-Molar, R. (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](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054)
- 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 Mycology*. 76: 51-167. <https://doi.org/10.1007/s11557-013-0901-1>



- [org/10.3114/sim0021](https://doi.org/10.3114/sim0021)
- Pitt, J.I. & Hocking, A.D. (2009). Fungi and Food Spoilage. 3 ed. Springer. pp 125-127. ISBN:978-0-387-92207-2. <https://www.springer.com/br/book/9780387922065>
- Punithalingam, E. (1980). Plant diseases attributed to Botryodiplodia theobromae. Pat. J. Cramer, Vaduz. 121 pp. ISBN 3768212564, 9783768212564
- Rodríguez, G. E., Maldonado, E. and Alves, A. (2015). Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* causing dieback of table grapes in Peru. *European Journal of Plant Pathology*. 141: 477. <https://doi.org/10.1007/s10658-014-0557-8>
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (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>
- Schwentesius, R. R. & Manuel, Á. G. C. (2005). Limón Persa. Tendencias en el mercado mexicano. Ed. CIESTAAM/UACH y Banco Mundial, México, D.F. 158 pp. ISBN: 968-02-0167-8. <http://www.conciter.com/archivosenpdf/Limonpersa2005.pdf>
- Segura-Contreras, S., Rodríguez-Espejo, M. and Chico-Ruiz, J. (2015). Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de laboratorio. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas*. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú. ISSN: 2313-3171. REBIOL 2015; 35(2): 47-52. <http://www.revistas.unitr.u.edu.pe/index.php/facccbiol/article/view/1075>
- SIAP. (El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2017). Atlas Agroalimentaria Anual. in: Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México 236 p. <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>
- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D. and Wingfield, M. J. (2004). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea*. *Mycologia*. 96(1): 83-101. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21148832>
- Slippers, B. & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews*. 21(2-3): 90-106. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Swofford, D. L., (2002). (PAUP). Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates. <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.458.6867&rep=rep1&type=pdf>
- Swofford, D. L. (2003). PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and other methods) Version 4. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. <https://doi.org/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, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. (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/>
- Timmer, L. W., Garnsey, S. M. and Graham, J. H. (2002). Plagas y enfermedades de los cítricos. The American Phytopathological Society. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 90 pp.
- Varela, F. S. E., Orozco, S. M., Torres, A. R. I. and Silva, A. G. L. (2013). Guía técnica para la identificación y manejo de plagas y enfermedades en cítricos. Universidad Autónoma de Tamaulipas. ISBN: 9786077654643. 428 p.
- Woodward, J. E., Langston, Jr. D. B., Brock, J. H., Kemerait, Jr. R. C. and Brenneman, T. B. (2005). First demonstration of Koch's postulates for *Lasiodiplodia theobromae* fruit spot on eggplant (*Solanum melongena*). *Plant Disease*. 89(6): 687.1 <https://doi.org/10.1094/PD-89-0687A>
- Zúñiga-Estrada, L. & Yáñez-Morales, M. de J. (2015). Fungal organisms associated to the yellowing and drying of aloe. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 33 (Suplemento). 2015. S96.