



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
CARRERA DE AGRONOMÍA**

TRABAJO DE TESIS

**Previo a la obtención del título de:
INGENIERO AGRÓNOMO**

TEMA:

**“HONGOS QUE CAUSAN NECROSIS APICAL Y MUERTE DE
RAMAS EN LIMÓN SUTIL (*Citrus x aurantifolia* Christm. Swingle) EN
LA PROVINCIA DE MANABÍ”.**

AUTOR:

CEDEÑO ROLDÁN CÉSAR ARTURO

DIRECTOR DE TESIS

Ing. JEFFERSON BERTIN VELEZ OLMEDO, D.Sc.

CO- DIRECTOR

Ing. ALMA ALEXANDRA MENDOZA GARCÍA.

SANTA ANA- MANABÍ- ECUADOR

2022

Dedicatoria

Este trabajo va dedicado principalmente a Dios que me ha acompañado siempre, dándome sabiduría e inteligencia en todos los momentos de mi vida. Seguido a mis padres Aladino Cedeño Loor y Mary Roldán Briones, que con mucho esfuerzo me han encaminado hacia lo correcto con sus consejos, apoyo y dedicación convirtiéndose ellos en un pilar importante en mi vida, de la misma manera a mis queridos tíos Oscar concha y Rosa Avecillas por ese apoyo y amor fraterno que me brindan siempre que lo necesito ellos mis segundos padres al igual que mi abuelo Juan Roldán siempre impulsándome a avanzar y creer en mí, por ultimo a mi hermano Aladino Cedeño Roldán quien ha estado conmigo acompañándome en mi corta trayectoria por esta vida en risas y llantos.

CÉSAR A. CEDEÑO ROLDÁN

Agradecimiento

Principalmente agradezco a Dios, quien permite y da la fuerza para realizar y alcanzar cada logro en nuestras vida, seguido a mis familiares Mary Roldán Briones y Aladino Cedeño Looor mis padres quienes siempre han querido lo mejor y me impulsan a ser mejor día a día con su ejemplo y dedicación como padres, seguido agradecer a mis segundos padres mis tíos Oscar Concha y Rosa Avecillas eternamente agradecidos parte de mis logros tienen su huella, mi abuelo Juan Roldán y mi hermano Aladino Cedeño Roldán por creer en mí y motivarme a avanzar, por ultimo a la ing. Alma Mendoza quien me brindo su mayor ayuda en el periodo de mi estadía en la estación experimental..

CÉSAR A. CEDEÑO ROLDÁN

CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DEL TRABAJO

Ing. JEFFERSON BERTIN VÉLEZ OLMEDO DSc.

CERTIFICO:

Que la tesis de grado titulada **“Hongos que causan necrosis apical y muerte de ramas en limón sutil (*Citrus x aurantifolia* Christm. Swingle) en la provincia de Manabí.”** es trabajo original del señor egresado César Arturo Cedeño Roldán, el cual fue realizado bajo mi dirección, habiendo cumplido con las disposiciones y reglamentos establecidos en su ejecución.

Ing. Jefferson Bertin Vélez Olmedo DSc.

TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN
CERTIFICACIÓN DEL REVISOR DEL TRABAJO

Ing. ADRIANA DEL CARMEN CELI SOTO. PhD.

CERTIFICO:

Que he revisado estilo y ortografía del trabajo de titulación “**Hongos que causan necrosis apical y muerte de ramas en limón sutil (*Citrus x aurantifolia* Christm. Swingle) en la provincia de Manabí**” elaborado por César Arturo Cedeño Roldán, el presente trabajo ha sido escrito de acuerdo a las normas ortográficas y sintaxis vigentes “**en el reglamento de la unidad de titulación especial de la Universidad Técnica de Manabí**”.

Ing. Adriana Del Carmen Celi Soto. PhD.
REVISOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

CERTIFICACIÓN DE LA COMISIÓN DE REVISIÓN Y EVALUACIÓN

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MANABÍ
FACULTAD DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA

“Hongos que causan necrosis apical y muerte de ramas en limón sutil (*Citrus x aurantifolia* Christm. Swingle) en la provincia de Manabí”.

TRABAJO DE TITULACIÓN

Sometida a consideración del Tribunal de Seguimiento y Evaluación, legalizada por el Honorable Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

APROBADA POR:

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

MIEMBRO DEL TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

DECLARACIÓN SOBRE DERECHOS DE AUTOR

Yo **CÉSAR ARTURO CEDEÑO ROLDÁN**, declaro bajo juramento que es de mi autoría y que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y que hemos consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración de este trabajo investigativo es de sumo derecho de propiedad intelectual del autor.

CÉSAR ARTURO CEDEÑO ROLDÁN

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN/ PANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. General.....	3
2.2. Específicos.....	3
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1. Origen y distribución de los cítricos.....	4
3.2. Taxonomía	4
3.3. Descripción morfológica.....	4
3.4. Factores climáticos.....	5
3.5. Importancia económica	5
3.6. Patógenos que causan enfermedades en cítricos.....	5
3.6.1. Familia <i>Glomerellaceae</i>	6
3.6.2. Familia <i>Septobasidiae</i>	7
3.6.3. Familia <i>Botryosphaereaceae</i>	7
3.6.4. Familia <i>Fomitopsidaceae</i>	8
4. METODOLOGÍA.....	9
4.1. Recolección de las muestras y obtención de las muestras	9
4.2. Purificación de los aislamientos.....	12

4.3.	Caracterización morfológica de los aislamientos	12
4.4.	Pruebas de patogenicidad.....	12
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
5.1.	Identificación morfológica de los aislamientos.....	16
5.2.	Resultado de prueba de patogenicidad	21
6.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	25
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
8.	ANEXOS.....	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla.1. Muestras colectadas en diferentes zonas productoras de limón de Manabí.	9
Tabla 2. Comportamiento de los patógenos en prueba de patogenicidad.....	21

ÍNDICE DE GRÁFICOS

- Fig. 1. Síntomas observados en muestras colectadas. A) Necrosis interna (flecha azul) en corte horizontal en el medio de un cancro formado en rama (flecha roja) de limón sutil. B) Corte transversal observado en estereoscopio., C). Cancro en rama observado en estereoscopio. 11
- Fig. 2. Inoculación de los aislamientos obtenidos en plantas de limón. A y B) herida artificial (flecha amarilla) realizada a 8 cm desde la base del injerto. C) disco de MEA con micelio sobre la herida (cuadro rojo). D) Algodón humedecido con agua estéril y sellado con parafilm. para retener humedad. 14
- Fig. 3. Croquis de la ubicación de las plantas inoculadas en la prueba de patogenicidad de aislamientos en limón criollo..... 15
- Fig. 4. A) Árbol con síntomas de muerte regresiva y clorosis (flechas negras), B) Ramas enfermas colectadas en fincas productoras. C) Secreción (imagen izquierda) y cuerpos fructíferos (imagen derecha) en ramas halladas en campo. 17
- Fig. 5. A) Picnidio de un *Botryosphaeria* observado en microscopio a 10x. B) Conidias hialinas encontradas en el interior de un picnidio. C) picnidio en rama de limón sutil observado bajo estereoscopio. 18
- Fig. 6. Conidias de *Botryosphaeria* observadas en microscopio a 10x..... 19
- Fig. 7. Clamidosporas. A, B y C) Clamidosporas presentes en la colonia más adulta. D) Clamidosporas catenuladas en medio de cultivo agar agua..... 20
- Fig. 8. Secreción de goma como respuesta a la virulencia que presenta el hongo en plantas de limón. 23
- Fig. 9. A) Cancro formado sobre del área inoculada (flechas negras). B) Cuerpos fructíferos formados en el tallo de planta inoculada (flecha naranja). 24
- Fig. 10. Planta con marchites presente. 24

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. preparación de medios de cultivo, medio de cultivo AA (imagen izquierda) y PDA (imagen derecha).	32
Anexo 2. Esterilización de materiales, imagen izquierda placas Petri esterilizadas en estufa, imagen derecha medio de cultivo dentro del autoclave.....	33
Anexo 3. Proceso de obtención de muestras, imagen inferior muestras procesadas para aislar, imagen superior colocación de muestras en medios de cultivos.	34
Anexo 4. Colonias obtenidas a partir de los aislamientos, imagen superior colonias adultas, imagen inferior colonias jóvenes	35
Anexo 5. Placas con ramas de pino para obtención de estructuras fúngicas.	36
Anexo 6. Plantas para realizar las inoculaciones.	36

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PDA: agar papa dextrosa.

MEA: agar extracto de malta.

AA: agar agua.

NaClO: hipoclorito de sodio.

ESPAC: Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua.

RESUMEN

Los cítricos pertenecen a las familias de las Rutaceas son mencionados desde tiempos muy antiguos (entre 776& 600 a.C.), son principalmente cultivados por su valor nutricional y económico. El cantón Santa Ana y sus alrededores están considerados entre las principales zonas productoras de limón sutil en Manabí, lugares en los cuales se pueden observar varios problemas fitosanitarios. Sin embargo, síntomas de necrosis apical y muerte regresiva en ramas de limón es uno de los problemas más comunes que se observan en la gran mayoría de las fincas. Por lo antes mencionado, en el presente trabajo se planteó como objetivo identificar hasta nivel de género a los/ el agente causal de dicha enfermedad. Para lo cual, se colectaron muestras en 7 fincas de varios sectores Ayacucho, La Poza, Peminche, Estero Seco, El Beldaco y Rio Chico, estas fueron llevadas al laboratorio de fitopatología de la estación experimental del INIAP sede Portoviejo ubicada en la parroquia de Colón donde se realizaron los respectivos aislamientos. Se logró identificar al género a través de sus estructuras o cuerpos fructíferos como picnidios y esporas. El género identificado en las muestras colectadas corresponde a *Botryosphaeria* sp. Las pruebas de patogenicidad mostraron que 40 de 47 aislamientos obtenidos fueron patogénicos. Se espera que en lo posterior los investigadores sean motivados a profundizar en el tema de estas enfermedades, para brindar mayor conocimiento de estos géneros y realizar planes de manejo para los productores.

Palabras claves: limón, muerte regresiva, cuerpos fructíferos, aislamientos.

ABSTRACT

Citrus fruits belong to the Rutaceae family and have been mentioned since ancient times (between 776 & 600 BC), they are mainly cultivated for their nutritional and economic value. The Santa Ana canton and its surroundings are considered among the main producing areas of lemon in Manabí, places in which several phytosanitary problems can be observed. However, symptoms of apical necrosis and regressive death in lemon branches is one of the most common problems observed in the vast majority of farms. Due to the aforementioned, in the present work the objective was to identify up to the gender level the causal agent of said disease. For which, samples were collected in 7 farms from various sectors Ayacucho, La Poza, Peminche, Estero Seco, El Beldaco and Rio Chico, these were taken to the phytopathology laboratory of the experimental station of the INIAP headquarters Portoviejo located in the parish of Colón where the respective isolations were made. The genus was identified through its structures or fruiting bodies such as pycnidia and spores. The genus identified in the collected samples corresponds to *Botryosphaeria* sp. Pathogenicity tests showed that 40 of 47 isolates obtained were pathogenic. It is expected that in the future researchers will be motivated to delve into the subject of these diseases, to provide greater knowledge of these genera and to carry out management plans for producers.

Keywords: lemon, dieback, fruiting bodies, isolates.

1. INTRODUCCIÓN/ PANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los cítricos (*Citrus* spp.) son un grupo de plantas pertenecientes a la familia Rutaceae, cuyos frutos son consumidos a nivel mundial por poseer un alto contenido de vitamina C y ácido cítrico (Sir Elkhatim et al., 2018). Estas plantas están ampliamente distribuidas a nivel mundial, concentrándose en el cinturón cítrico ubicado entre las latitudes 24 y 40° (Cleves Leguizamó et al., 2012). Las actuales especies de cítricos descienden de tres antepasados, es decir, el mandarino (*Citrus reticulata* cv. *Cleopatra Blanco*), pomelo (*Citrus maxima* Burm. Merr.) y el citrón (*Citrus medica* L), a partir de los cuales, se ha generado una descendencia de 25 especies y aproximadamente 250 variedades comerciales registradas (Velasco & Licciardello, 2014).

En el Ecuador, el limón es uno de los principales frutales de la región costa, siendo Manabí la provincia que presenta la mayor área cultivada de este cítrico, según fuentes del ESPAC (2020), en el año 2020 la superficie plantada, cosechada y la producción (monocultivo) de fruta fresca a nivel nacional alcanzó 6212 ha, 5614 ha y 27914 t, respectivamente. Sin embargo, en la provincia de Manabí, el rendimiento se ve reducido por varios factores de origen abiótico y bióticos (Cumba-García et al., 2019). Según Velásquez et al. (2018), los factores que contribuyen con la aparición, desarrollo y proliferación de ciertos patógenos es la combinación entre altas temperaturas y una cálida humedad. Siendo el caso de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat) Griffon & Maubl, agente causal de múltiples enfermedades vegetales incluyendo a las limas (Muñoz et al., 2015), Varios estudios han determinado que éste patógeno se desarrolla a temperaturas de 15 - 40 °C, siendo 28 °C la óptima, y una humedad relativa de 75% (Sáenz Pérez et al., 2019; Slippers et al., 2004). Por otro lado, se tiene al complejo *Colletotrichum* spp. agente causal de la antracnosis responsable de ocasionar caída prematura del botón floral y muerte de rama (Ramos et al., 2016), presente en varias regiones tropicales y subtropicales del mundo (Freeman & Shabi, 1996).

Actualmente, en la provincia de Manabí durante las diferentes épocas del año, se ha observado en distintas plantaciones de limón (*C. x aurantifolia* Christm. Swingle) síntomas de: muerte apical y muerte regresiva de plantas, síntomas de los cuales se desconoce su agente causal, sin embargo, se sospecha que puede tratarse de un hongo por el tipo de síntoma observado (Vélez, 2021. Comunicación personal). Por la escasa o nula información documentada al respecto, es la

necesidad del presente trabajo, debido a que el cultivo de cultivo de limón, es un rubro que, con pasar el tiempo, incrementa su importancia económica en la zona de Manabí.

2. OBJETIVOS

2.1. General

- Identificar el o los agentes causales de la necrosis apical y muerte de ramas en limón sutil (*Citrus x aurantifolia* Christm. Swingle) en la provincia de Manabí.

2.2. Específicos

- Determinar las características morfológicas a nivel de género de los aislamientos causantes de la necrosis apical y muerte de ramas en limón sutil (*Citrus x aurantifolia* Christm. Swingle) en la provincia de Manabí.
- Realizar la prueba de patogenicidad para cada uno de los aislamientos obtenido de tejidos en limón sutil (*Citrus x aurantifolia* Christm. Swingle) en la provincia de Manabí.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Origen y distribución de los cítricos

El enunciado más viejo referente a los cítricos se encuentra en la literatura sanscrita y en China donde se encontraron escritos donde se menciona a los cítricos en poemas de época entre los años 776 y 600 a.C. (Scora, 2010). Actualmente se desconoce con exactitud el origen de los cítricos, sin embargo, se menciona que son originarios de Asia desde el oeste de Pakistán hasta el centro-norte de China y en el sur hasta el archipiélago de las Indias Orientales en Nueva Guinea (Scora, 2010; Wu et al., 2018). Los cítricos están distribuidos ampliamente a nivel mundial siempre y cuando se encuentren en adecuadas condiciones edafoclimáticas donde se pueda obtener una óptima producción (Ruiz et al., 2013). En el 2020 la producción a nivel mundial superó los 24 millones t, con un rendimiento de 13,566.140 kg/ha y un área cosechada de 1,463.154 ha siendo el mayor productor la India que superó 3,7 millones t (FAOSTAT, 2021).

3.2. Taxonomía

El limón sutil (*C x aurantifolia*) igual que otros cítricos pertenece a la familia Rutaceae, una de las 21 familias del orden *Sapindales* (Talon et al., 2020). La clasificación taxonómica según la base de datos Tropicos (2012) se describe de la siguiente manera: reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Equisetopsida*, sub-clase *Magnolita*, superorden *Rosanae*, orden *Sapindales*, familia *Rutaceae*, género *Citrus*, especie *Citrus x aurantifolia* (Christm.) Swingle.

3.3. Descripción morfológica

Es un arbusto pequeño aproximadamente con 4 a 5 metros de alto posee espinas en las axilas y tronco torcido generalmente, de hojas perennes unifoliadas generalmente con peciolo alado y articulado en la punta, punteada de glándulas; sus flores poseen pétalos blancos, estambres agrupados generalmente son bisexuales, axilares, de vez en cuando agrupadas y presentan una gran fragancia; el fruto es una baya del tipo “hesperidio” segmentada y llena de células ciliadas infladas llenas de jugo, su forma puede ser ovoide o globoso de 3,5 a 6 cm de diámetro con cascara de color amarillo verdoso, es fina siendo difícil de retirar y su pulpa es muy ácida (Thulin, 2015).

3.4. Factores climáticos

Los cítricos pueden ser cultivados en zonas tropicales, subtropicales, áridas y semiáridas que van entre 12,8 a 37 °C y son sensible ante heladas (Abobatta, 2019; Graham, 1997). Además de los anterior, se pueden cultivar prácticamente en cualquier tipo de suelo a excepción de los arcillosos con mal drenaje, puesto que, una saturación de agua por periodos cortos de tiempo puede ocasionar la muerte de la planta (Valarezo et al., 2014).

3.5. Importancia económica

Los cítricos juegan un papel importante de carácter económico, ambiental y social en el departamento de Meta, Colombia y de la misma manera para los países productores, debido a que las plantaciones actuales generan directa e indirectamente empleos, comercio, activación de mercados, lo cual promueve al factor socio-económico mejorando la calidad de vida de las comunidades locales, además de que se les atribuye un carácter ambiental puesto que muchas plantaciones actuales se sitúan en lo que anteriormente fueron potreros pertenecientes a explotaciones de ganadería extensiva (Cleves Leguízamo et al., 2012). Entre las especies de cítricos que existen en el Ecuador, las que más se cultivan son principalmente el limón Sutil (*C. x aurantifolia*) seguida del limón Tahití o lima persa (*Citrus x latifolia* (Tanaka ex Yu.Tanaka) Tanakana) entre ambas forman un aproximado de 4.400 ha cultivadas (Santistevan Méndez et al., 2017).

3.6. Patógenos que causan enfermedades en cítricos.

Los patógenos que actualmente se encuentran afectando de manera general al cultivo de cítricos se encuentran virus, nematodos y hongos, los cuales afectan directamente a su producción ya que ocasionan daños en raíz, hojas, flores y frutos, siendo los hongos los más comunes ocasionando problemas (Sáenz et al., 2019). Más abajo, se mencionan a diferentes patógenos de acuerdo al órgano afectado:

En cuanto a patógenos que afectan **raíz y sistema vascular** tenemos a: *Phytophthora* spp, *Fusarium* sp, *Verticillium* spp, *Armillaria mellea* (Vahl:Fr.)Kummer, *Rosellinea necatrix* Prill, *Tylenchulus semipenetrans* (Cobb, 1913), *Radopholus similis* (Cobb, 1893), Candidatus

liberibacter, Citrus tristeza virus (CTV), *Xylella Fastidiosa* Wells, entre otras (Sáenz et al., 2019; Verdejo & McKenry, 2004; Jaouad et al., 2020). En cuanto a patógenos que afectan **el área foliar tenemos:** a *Mycosphaerella citri* Whiteside, citrus leaf blotch virus (CLBV), *Diaphorte citri* Wolf, *Pseudocercospora angolensis* (Carvalho & Mendes) Crous & Braun, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Capnodium* sp, *Cladosporium* sp (Gopal et al., 2014; Ploetz, 2003). En cuanto a patógenos que afectan **flores y frutos tenemos:** *Colletotrichum* spp, *Penicillium* sp, *Alternaria alternata* pv. *citri*, *Guignardia citricarpa* Kiely, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Diaphorte citri* Wolf, *Elsinoe australis*, *Diplodia natalensis* P. Evans (Ploetz, 2003; Chung et al., 2011; Valarezo et al., 2014). Y finalmente, entre los patógenos que causan **muerte regresiva de brotes y canchros de en ramas tenemos:** al género *Colletotrichum* spp., perteneciente a la familia *Glomerellaceae*, a *Septobasidium pseudopedicellatum*, perteneciente a la familia *Septobasidiaceae*, a *Lasiodiplodia* spp., y *Neofusicocum parvum* (Pennycook & Samuels) pertenecientes a la familia *Botryosphaeraceae* y finalmente a *Fomitopsis meliae* (Underw.) Gilb. perteneciente a la familia *Fomitopsidaceae* (Valarezo et al., 2014; Riolo et al., 2021; Polanco Florián et al., 2019; Francesco et al., 2021).

3.6.1. Familia *Glomerellaceae*

Actualmente compuesta solo por el género llamado *Glomerella* sp. el cual congrega a más de 71 especies, teniendo una fase asexual llamada *Colletotrichum* sp., muestra peritecios oscuros que no son estomáticos, perifisis ostiolar y exuberante paráfisis, presenta ascas del tipo claviformes con ascosporas hialinas generalmente no septado, lisas, habitualmente curvadas, todo lo dicho anteriormente es correspondiente a la fase sexuada que se observa en condiciones naturales para su fase asexual se observan la formación de acervulos que producen conidias hialinas unicelulares, puede presentar setas dependiendo de la especie, en medios de cultivo forma esporodoquios (Réblová et al., 2011; Rojo et al., 2017). Su rango de hospedero es muy amplio a ser polífago, puede atacar ramas, brotes y frutos, ocasionando canchros, pudriciones y muerte regresiva (Cabezas Hualliyas, 2020).

3.6.2. Familia *Septobasidiae*

Los miembros de esta familia generalmente no son considerados causantes de problemas en las plantas, más bien son considerados entomopatógenos de queresas Homópteras, en este caso el micelio penetra e ingresa en el interior del cuerpo del insecto, pero sin ocasionar su muerte, realmente existe una convivencia positiva entre estos el insecto y el patógeno (Cabezas Huallyas, 2020). Sin embargo, *S. pseudopedicellatum* en limón sutil ocasiona la muerte de ramas (Valarezo et al., 2014).

3.6.3. Familia *Botryosphaeraceae*

Esta familia está conformada por 23 géneros, los cuales son cosmopolitas con un rango de hospedantes muy extensos, principalmente plantas leñosas. Los miembros de esta familia pueden ser desde saprofitos, patogénicos y hasta endófitos. Cuando son patogénicos, pueden ocasionar síntomas tales como: muerte regresiva, caída de hojas, canchros, gomosis, necrosis y muerte de plantas, siendo *Dothiorella*, *Diplodia*, *Neofusicoccum* y *Lasiodiplodia* los géneros de mayor importancia en esta familia y que afectan varios cultivos de importancia económica (Mondragón et al., 2021). En cítricos, varias especies del género *Lasiodiplodia* son las descritas como causantes de muerte regresiva y cancro de ramas (Polanco Florián et al., 2019; Damm et al., 2007; Guajardo et al., 2018). Las estructuras sexuales de *Lasiodiplodia* sp., forman ascomas uniloculares y multiloculares, el estroma de color marrón y su grosor varía dependiendo de la especie incluso en especies dada existe variación, presenta pseudoparafisis hialina, ascas bitunicadas, clavados alargados, ascosporas generalmente hialinas y aceptadas, aunque también se observan de color marrón y tener un único septo, mientras que en su forma asexual se observa picnidios uniloculados y multiloculares, estromáticos, los conidiofros no se presentan en todas las especies y cuando están presentes, son hialinos delgados y cilíndricos, generalmente no son ramificados pero pueden serlo y presentar septos (Phillips et al., 2013). Los conidios son semiovoides o elípticos presenta extremos redondeados con mayor anchura en el tercio superior, poseen paredes gruesas, inicialmente son hialinos y sin septos hasta su maduración donde toman una coloración café además de adquirir un septo, presentan depósitos de melanina los cuales se reflejan como estrías longitudinales (Muños et al., 2015).

Botryosphaeria sp. es conocida también por ser un género que ocasiona muerte regresiva y cancro en especies vegetales leñosas con un amplio rango de hospederos a nivel mundial (Marsberg et al., 2017). Sus ascosporas son hialinas y unicelulares, tienen forma ovoide alargados siendo sus ápices un poco estrechos. Los picnidios pueden estar solos o agrupados, van de color negro a marrón, presentan ostiolo, poseen paredes gruesas. Los conidióforos son hialinos, presentan septos y son cilíndricos, los conidios se muestran hialinos presentan extremos ovalados, siendo unicelulares, pueden formar tabique antes de la germinación, pero esto no es común (Abdollahzadeh, J., Zare, R. & Phillips, AJL., 2013).

3.6.4. Familia *Fomitopsidaceae*

Los miembros de esta familia son fitopatógenos de plantas leñosas en las cual causan pudrición marrón (Joshi et al., 2021). La familia está formada por cerca de 24 géneros y 197 especies, su especie tipo es *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst (1881: 9) (Soares et al., 2017). Los basidiomas de este género generalmente pueden estar presentes de manera perenne o de manera anual, pueden ser aplanados o efusos, con una textura suave a rugosa o corchoso, las hifas son esqueléticas comúnmente desarrolladas, himenio poroso, basidiosporas hialinas, lisas, entre elipsoides y cilíndricas, no tiñen en yodo (Cannon & Kirk, 2007).

4. METODOLOGÍA

4.1. Recolección de las muestras y obtención de las muestras

Se colectaron muestras con síntomas de necrosis apical y cancro de ramas en limón en las diferentes zonas productoras (figura 1), tales son: la parroquia de Ayacucho, la comunidad de La Poza, Peminche, Estero Seco, Lodana, pertenecientes todas al cantón Santa Ana y una colección proveniente de la comunidad Mejía, en la provincia de Manabí (tabla 1). Cada muestra se embolsó, etiquetó y posteriormente fue colocada en una caja térmica y/o hielera para ser trasladado al laboratorio de Fitopatología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Estación Portoviejo. Los aislamientos se obtuvieron por el método de aislamiento indirecto (Alfenas & Mafia, 2016) siguiendo el siguiente protocolo:

A cada muestra se le realizó un lavado con agua para retirar el polvo de la superficie del tejido, posteriormente se retiró el cambium dejando solo la médula la cual se cortó en múltiples pedazos de aproximadamente de 3-5 mm de grosor, estos fueron sumergidos a una solución de alcohol 70% por un lapso de 30 segundos, luego se los pasó a una solución NaClO (hipoclorito de sodio) al 1% durante 3 minutos, por último se realizó un triple lavado con agua destilada estéril en un lapso de un minuto por cada lavado; posteriormente se procedió a secar las muestras en papel toalla previamente autoclavado a 15 minutos por 15 libras de presión, finalmente se colocó un solo disco de madera por placa Petri de 60x15mm con medio agar papa dextrosa (PDA). Todo este proceso se realizó en la cámara de flujo laminar.

Tabla.1. Muestras colectadas en diferentes zonas productoras de limón de Manabí.

Muestra	Provincia	Cantón	Parroquia	Comunidad
Finca Neri 1	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	La Poza
Finca Neri 2	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	La Poza
Finca Neri 3	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	La Poza
Finca Neri 4	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	La Poza
Finca Neri 5	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	La Poza
Casa 1	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	Faustino
Casa 2	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	Faustino

Casa 3	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	Faustino
Casa 4	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	Faustino
Casa 5	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	Faustino
Finca Milton 1	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	Estero Seco
Finca Milton 2	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	Estero Seco
Finca Milton 3	Manabí	Santa Ana	Ayacucho	Estero Seco
Teodomira 1	Manabí	Santa Ana	Lodana	N/A
Teodomira 2	Manabí	Santa Ana	Lodana	N/A
Teodomira 3	Manabí	Santa Ana	Lodana	N/A
Teodomira 4	Manabí	Santa Ana	Lodana	Lodana
Beldaco 1	Manabí	Santa Ana	Lodana	El Beldaco
Beldaco 2	Manabí	Santa Ana	Lodana	El Beldaco
Beldaco 3	Manabí	Santa Ana	Lodana	El Beldaco
Beldaco 4	Manabí	Santa Ana	Lodana	El Beldaco
Beldaco 5	Manabí	Santa Ana	Lodana	El Beldaco
Don Pachay 1	Manabí	Santa Ana	Lodana	El Beldaco
Don Pachay 2	Manabí	Santa Ana	Lodana	El Beldaco
Don Pachay 3	Manabí	Santa Ana	Lodana	El Beldaco
Peminche 1	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 2	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 3	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 4	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 5	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 6	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 7	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 8	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 9	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
Peminche 10	Manabí	Santa Ana	N/A	Peminche
FV 1	Manabí	Portoviejo	Picoazá	Mejía
FV 2	Manabí	Portoviejo	Picoazá	Mejía

FV 3	Manabí	Portoviejo	Picoazá	Mejía
FV 4	Manabí	Portoviejo	Picoazá	Mejía

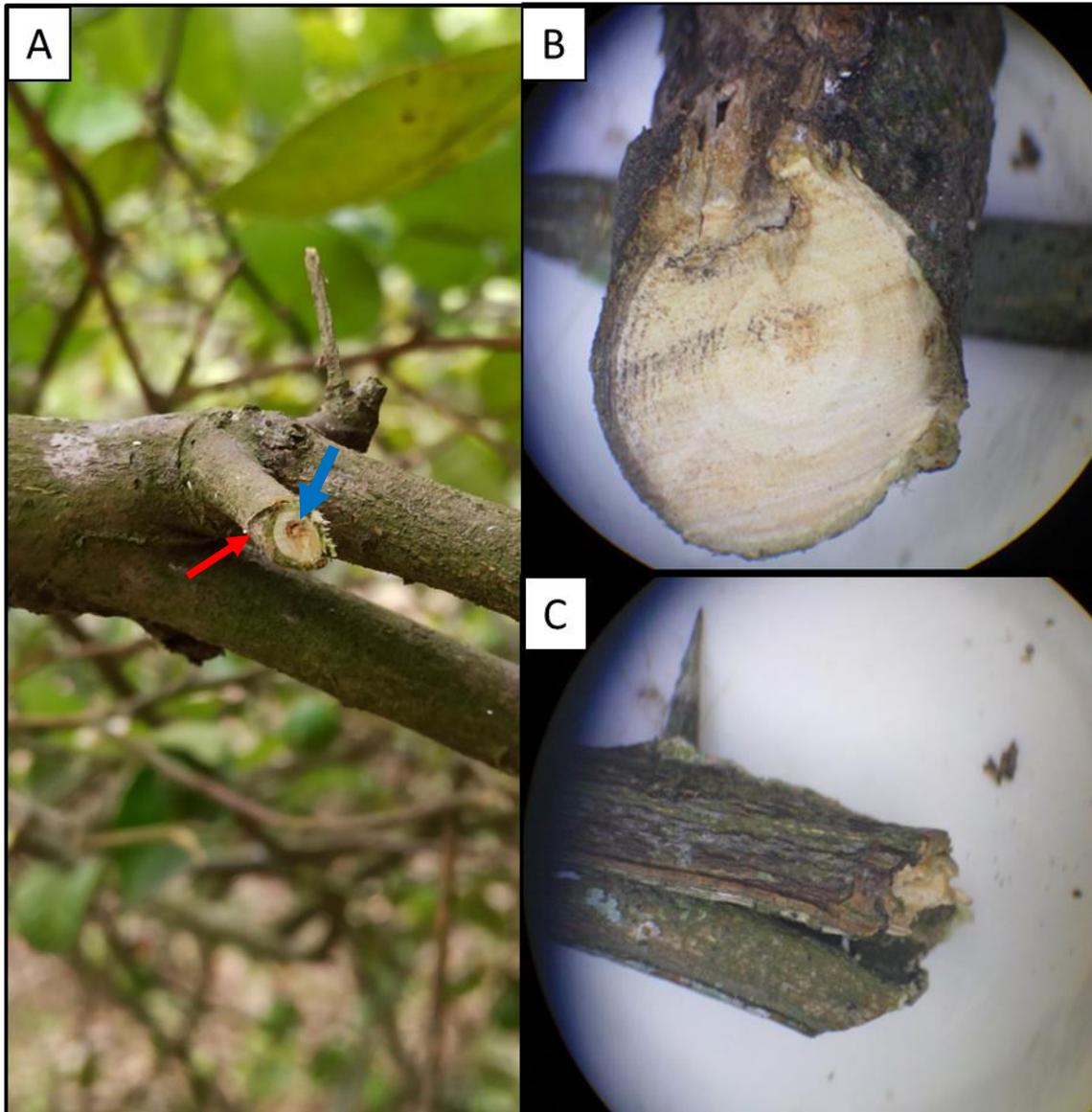


Fig. 1. Síntomas observados en muestras colectadas. A) Necrosis interna (flecha azul) en corte horizontal en el medio de un cancro formado en rama (flecha roja) de limón sutil. B) Corte transversal observado en estereoscopio., C). Cancro en rama observado en estereoscopio.

4.1. Obtención de plantas

Semillas de mandarina cleopatra (*C. reticulata*.) fueron sembradas en camas de 15 cm de altura bordeadas con caña guadua, se realizaron las respectivas desinfecciones de suelo fumigando fungicida sobre el mismo, se rego de acuerdo a las necesidades del cultivo. Al tener un tamaño aproximado a 20 - 25 cm de altura las plantas fueron trasplantadas a fundas de polietileno, ya al tener un grosor semejante al de un lápiz fueron injertadas a una altura de aproximadamente entre 30 y 40 cm con yemas de limón sutil (*C. aurantifolia*). Todo este procedimiento fue realizado por el vivero Diana, ubicado en la vía principal Lodana-Portoviejo.

4.2. Purificación de los aislamientos

El protocolo para este proceso se delimito en función a lo recomendado por Alfenas & Mafia, 2016: de cada aislamiento obtenido en las placas con PDA se repicaron discos con ayuda de un sacabocados de 8mm, los cuales fueron sembrados en placas Petri con medio Agar Agua (AA) durante 24-48 horas con la finalidad de obtener una hifa única la del hongo, la misma que se sustrajo con ayuda de una aguja estéril y un estereoscopio. La hifa que se tomó del medio Agar Agua, se colocó en una placa Petri con medio agar extracto de malta (MEA).

4.3. Caracterización morfológica de los aislamientos

La producción de estructuras de fructificación fue realizada en medio agar agua (AA) con ramas de pino según la metodología de Phillips et al. (2013). Posteriormente se realizaron observaciones de estructuras tales como de las esporas y sus conidióforos (n = 30) forma y tamaño de los picnidios, las observaciones fueron realizadas con la ayuda de un microscopio de luz binocular marca LABOMED Lx500.

4.4. Pruebas de patogenicidad

Plantas de limón sutil (*C. aurantifolia*) con aproximadamente 8 meses de ser injertadas en patrón de mandarina Cleopatra (*C. reticulata*) fueron inoculadas artificialmente para cumplir con los postulados de Koch. La inoculación fue realizada a una altura de 8 cm desde la base del injerto de la planta (figura 2) donde se realizó una pequeña herida con un sacabocados de 8mm en la corteza, esto con la finalidad de removerla. En la lesión artificial, se depositó un disco con micelio

de 8 días de edad acompañado de un algodón humedecido previamente esterilizados, luego se envolvieron con parafilm. Para este ensayo se utilizaron tres plantas por cada aislamiento obtenido. El experimento fue evaluado cada semana hasta el apareamiento de los respectivos síntomas.

A cada aislamiento se le asignó un código de referencia, estos fueron enumerados del 1 al 48 incluyendo al tratamiento testigo tal cual se muestra en el croquis de aislamiento (figura 3).

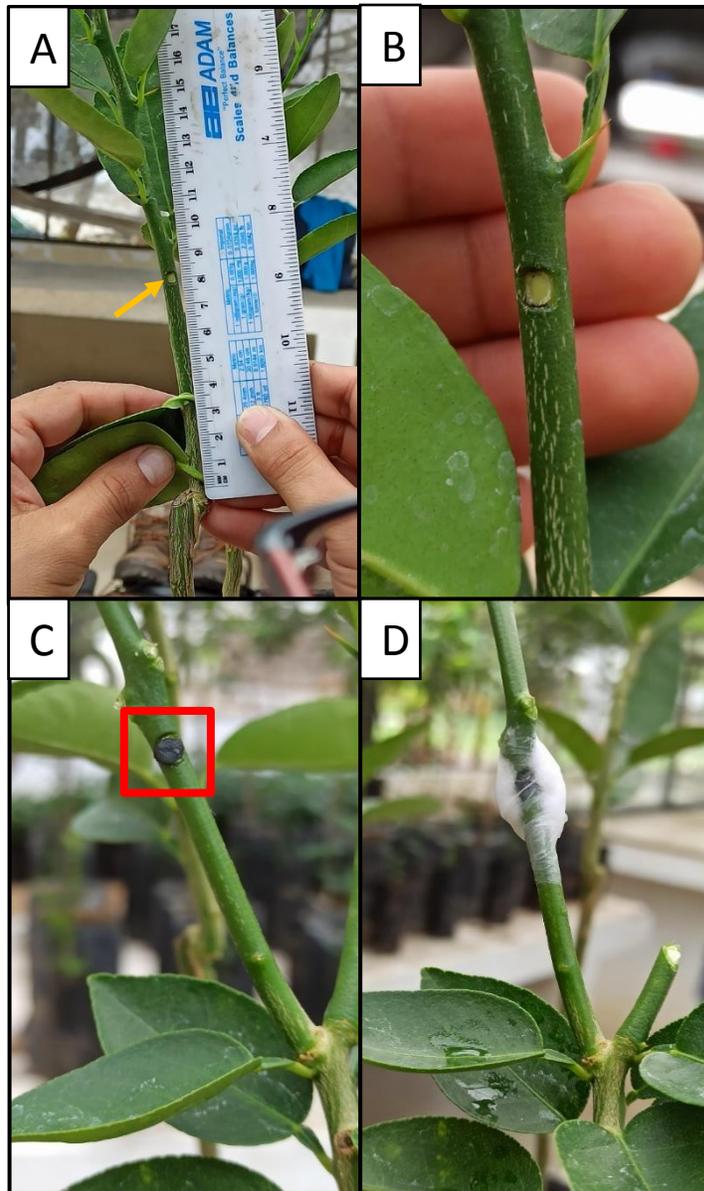


Fig. 2. Inoculación de los aislamientos obtenidos en plantas de limón. A y B) herida artificial (flecha amarilla) realizada a 8 cm desde la base del injerto. C) disco de MEA con micelio sobre la herida (cuadro rojo). D) Algodón humedecido con agua estéril y sellado con parafilm.

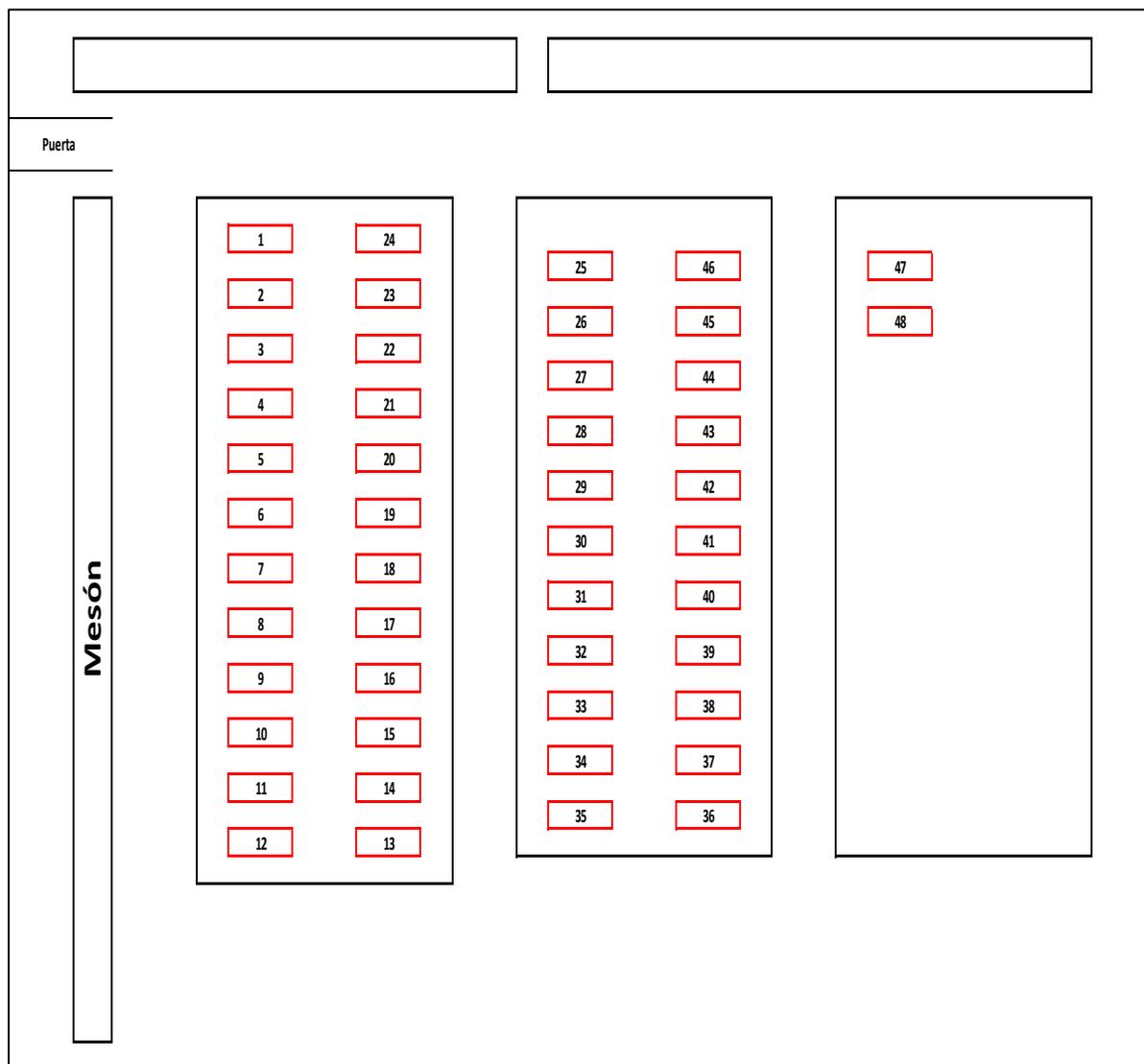


Fig. 3. Croquis de la ubicación de las plantas inoculadas en la prueba de patogenicidad de aislamientos en limón criollo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Identificación morfológica de los aislamientos

De las 7 fincas muestreadas se obtuvieron 47 aislamientos a partir de las ramas con lesiones y canchros de árboles enfermos (figura 4). Los aislamientos formaron micelios hialinos, raramente presentaba una coloración café muy tenue aparentando ser más hialino que café. La formación de estructuras tales como picnidios (figura 5) se apreciaron a partir de la tercera semana, las mismas que ayudaron a referenciar el género respectivo del agente fitopatogénico, el cual por sus características morfológicas indica pertenecer al género *Botryosphaeria*. Las esporas que se formaron en ese momento dentro del picnidio se muestran de apariencia hialinas (figura 5). La forma que presentaban dichos picnidios era de forma tipo botella, depositados sobre la superficie de las ramas de limón siendo de color gris y con el pasar del tiempo se volvían más oscuros. Ciertas esporas encontradas en la colonia presentaban un solo septo con una coloración café clara (figura 6), también se observó la presencia de clamidosporas en el micelio (figura 7).

Según Phillips (2013) el género *Botryosphaeria* describe morfológicamente a través de su ascomatas y conidiomas, tomando como referencia ciertas características de las estructuras de este género, quien posee un micelio hialino, picnidios agrupados o solitarios, conidios hialinos, en ocasiones oliváceos que al envejecer pueden tomar color más oscuros, pueden formar uno o dos septos o simplemente ser no septado, puede presentar forma elíptica, claviforme o fusiforme en unas especies, al igual que en otras forma picnidios agrupadas o solitarios marrones que pueden tornar oscuras en Agar Agua, de forma globosa ubicándose en la superficie y conidias hialinas de forma cilíndricas a lageniformes. Lo mencionado anteriormente tiene una estrecha relación con las estructuras encontradas en el trabajo, por lo que se atribuye a este género como el responsable.

Además, según Marsberg et al (2017) mencionó este género como patógeno de importancia en plantas leñosas a nivel mundial ya que afecta drásticamente su salud ocasionando canchros y muerte regresiva como síntomas característicos de este género.

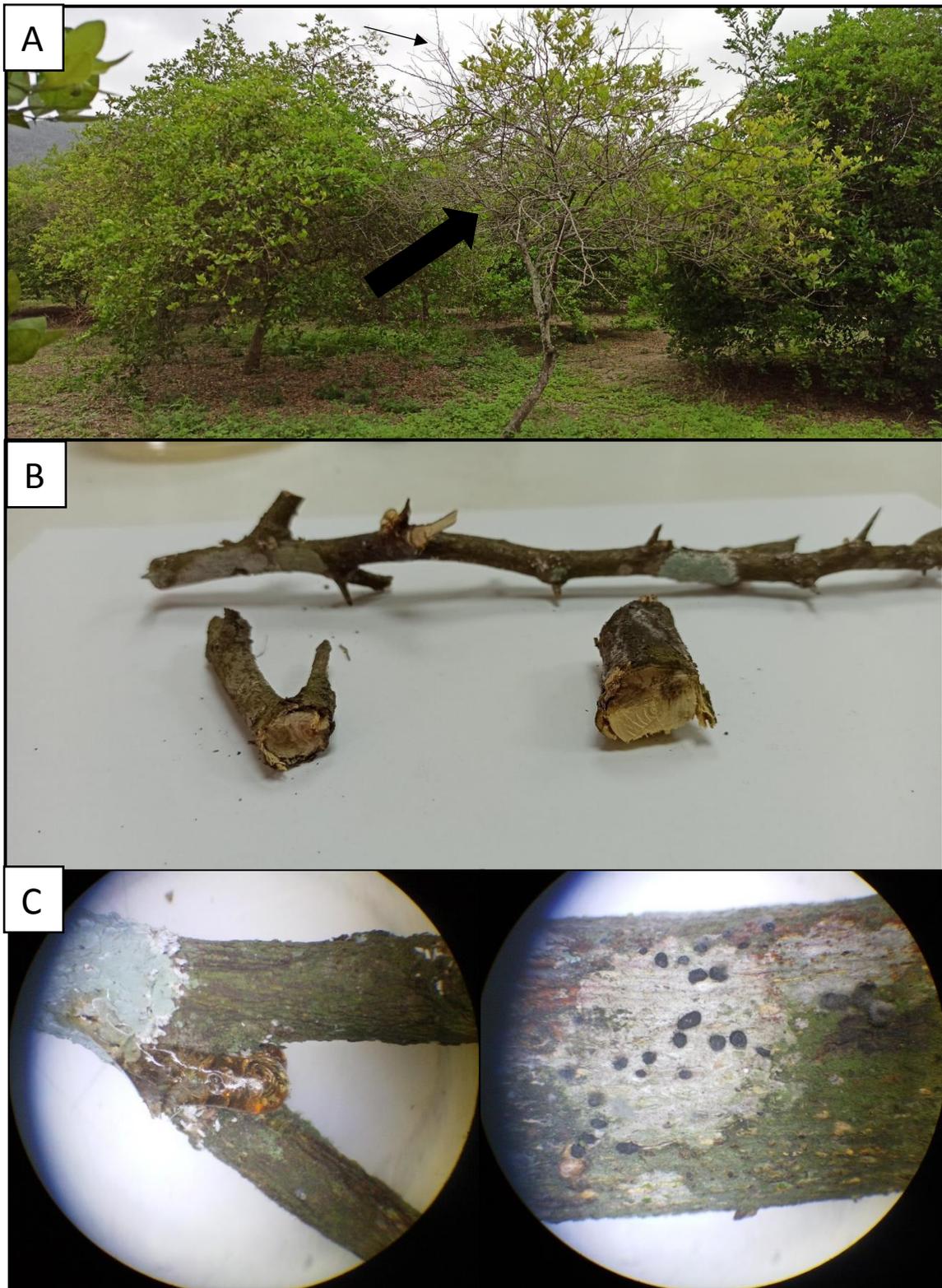


Fig. 4. **A)** Árbol con síntomas de muerte regresiva y clorosis (flechas negras), **B)** Ramas enfermas colectadas en fincas productoras. **C)** Secreción (imagen izquierda) y cuerpos fructíferos (imagen derecha) en ramas halladas en campo.

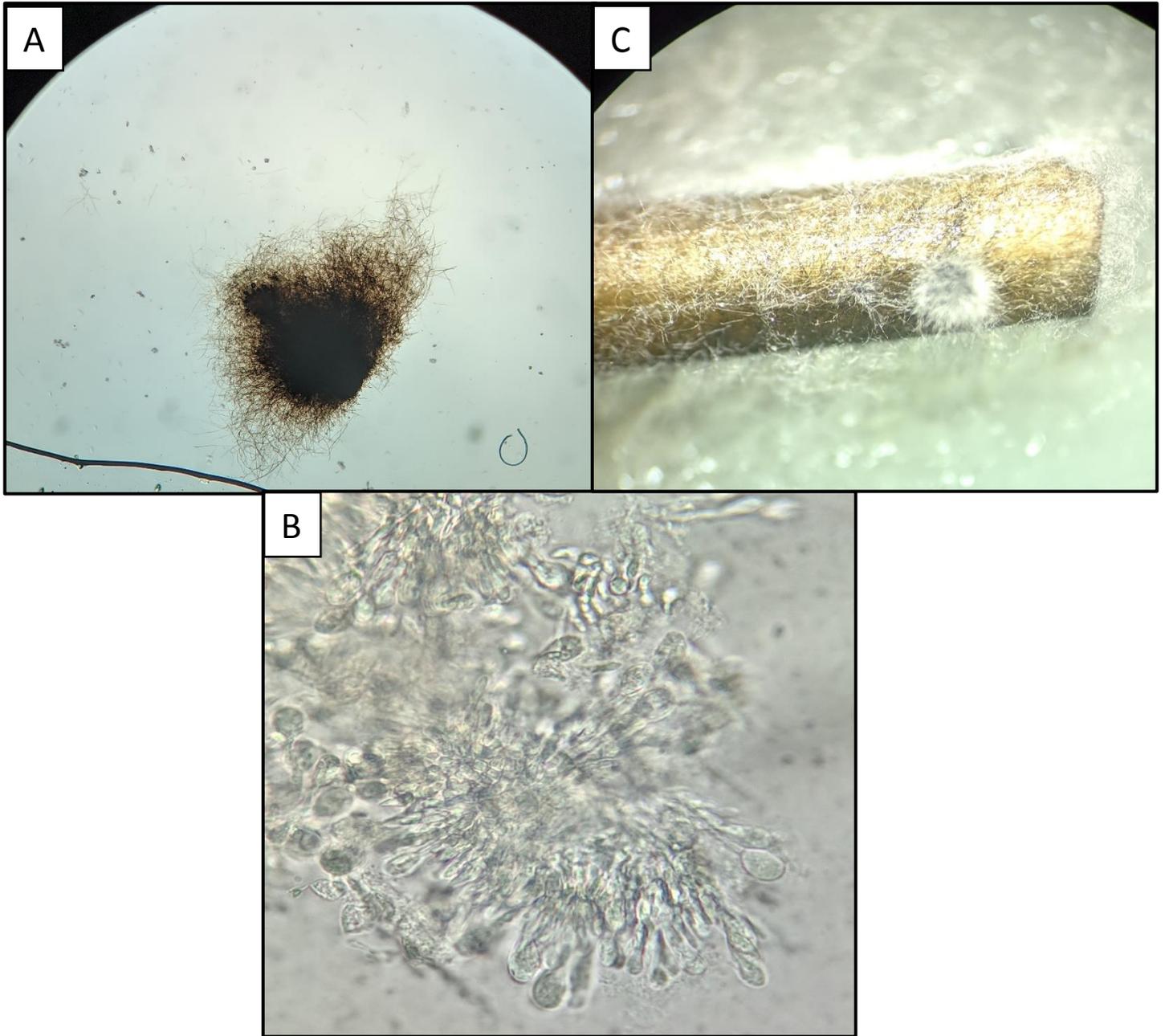


Fig. 5. A) Picnidio de un *Botryosphaeria* observado en microscopio a 10x. B) Conidias hialinas encontradas en el interior de un picnidio. C) picnidio en rama de limón sutil observado bajo estereoscopio.



Fig. 6. Conidias de *Botryosphaeria* observadas en microscopio a 10x.

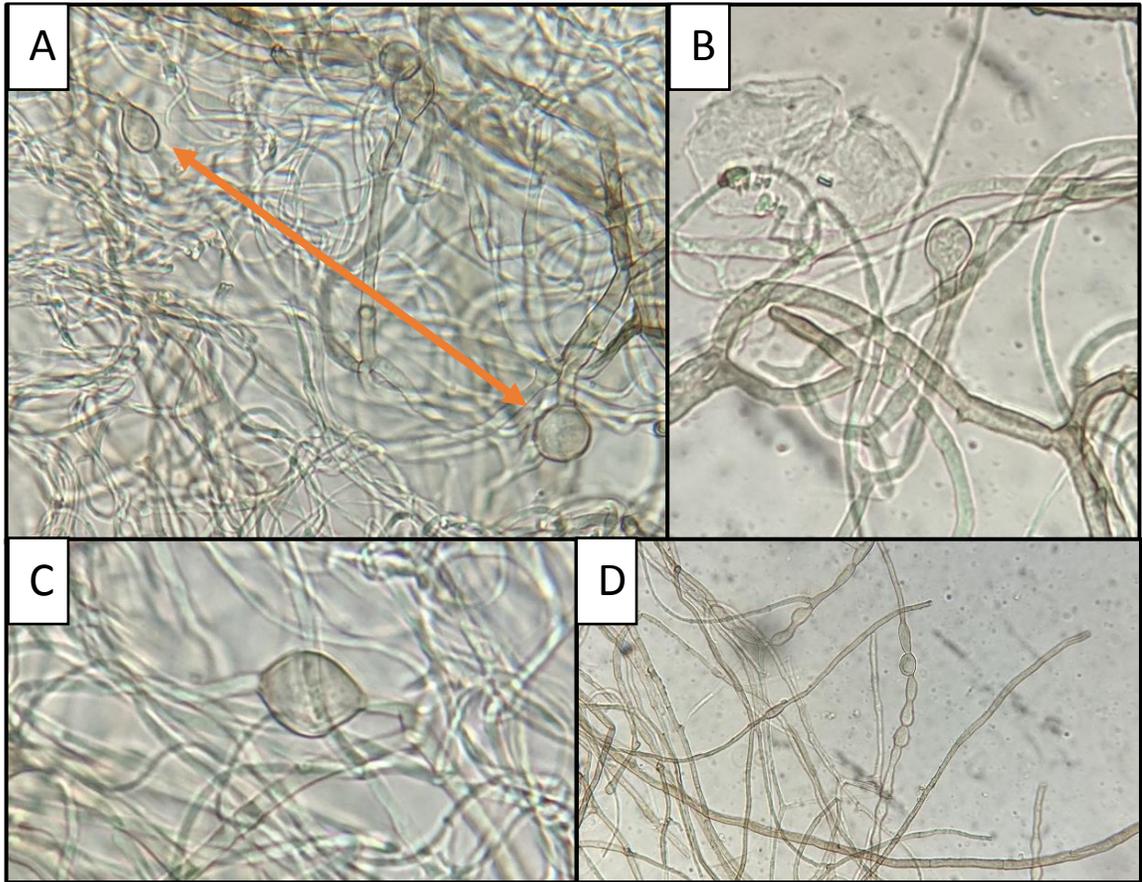


Fig. 7. Clamidosporas. A, B y C) Clamidosporas presentes en la colonia más adulta. D) Clamidosporas catenuladas en medio de cultivo agar agua.

5.2. Resultado de prueba de patogenicidad

A mediados de la segunda semana después de haber realizado la inoculación se observaron los primeros síntomas manifestados como presencia de secreción o exudado de goma naranja marrón (figura 8), en la segunda semana de evaluación se manifestaron canchales y ciertas plantas se marchitaron (figura 9 y 10), un grupo de aislamientos demostró ser no patogénicos para el limón sutil. En siguiente tabla se presenta el comportamiento de los aislamientos.

Tabla 2. Comportamiento de los patógenos en prueba de patogenicidad.

Aislamiento	Patogenicidad	Cancro	Cuerpo fructífero	Marchites
1	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
2	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
3	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
4	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
5	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
6	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
7	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
8	Positivo	Presente	Presente	Negativo
9	Positivo	Presente	Presente	Negativo
10	Negativo	Ausente	Ausente	Negativo
11	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
12	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
13	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
14	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
15	Positivo	Ausente	Presente	Positivo
16	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
17	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
18	Positivo	Ausente	Presente	Positivo
19	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
20	Negativo	Ausente	Ausente	Negativo
21	Negativo	Ausente	Ausente	Negativo
22	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
23	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
24	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
25	Positivo	Presente	Presente	Negativo
26	Planta testigo			
27	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
28	Positivo	Presente	Ausente	Negativo

29	Positivo	Ausente	Ausente	Positivo
30	Negativo	Ausente	Ausente	Negativo
31	Positivo	Presente	Presente	Negativo
32	Positivo	Ausente	Ausente	Positivo
33	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
34	Negativo	Ausente	Ausente	Negativo
35	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
36	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
37	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
38	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
39	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
40	Positivo	Ausente	Ausente	Positivo
41	Negativo	Ausente	Ausente	Negativo
42	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
43	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
44	Positivo	Presente	Ausente	Negativo
45	Positivo	Presente	Presente	Negativo
46	Positivo	Ausente	Ausente	Positivo
47	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo
48	Positivo	Ausente	Ausente	Negativo



Fig. 8. Secreción de goma como respuesta a la virulencia que presenta el hongo en plantas de limón.



Fig. 9. A) Cancro formado sobre del área inoculada (flechas negras). B) Cuerpos fructíferos formados en el tallo de planta inoculada (flecha naranja).



Fig. 10. Planta con marchites presente.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En relación al trabajo realizado en el campo y de acuerdo a los resultados obtenidos, se puede concluir lo siguiente:

Se pudo identificar al género *Botryosphaeria* como responsable de la formación de canchales, necrosis apical y muerte regresiva de ramas de árboles de limón sutil, en las diferentes zonas productoras aledañas y pertenecientes al cantón Santa Ana. Siendo esta una de las limas que tiene un gran valor del tipo económico para los productores de la zona.

Este trabajo reveló la presencia del agente causal, sin embargo la escasa información sobre el tema en alguna de las zonas productoras de la provincia deja un camino abierto para continuar con futuras investigaciones sobre su manejo y/o control en campo, epidemiología, entre otras.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abobatta, W. (2019). Potential impacts of global climate change on citrus cultivation [Impactos potenciales del cambio climático global en el cultivo de cítricos]. *MOJ Ecology & Environmental Sciences*, 4(6), 308–312. <https://doi.org/10.15406/mojes.2019.04.00168>
- Abdollahzadeh, J., Zare, R. y Phillips, AJL (2013). Filogenia y taxonomía de especies de *Botryosphaeria* y *Neofusicoccum* en Irán, con descripción de *Botryosphaeria scharifii* sp. nov. *Micología*, 105(1), 210–220. doi:10.3852/12-10710.3852/12-107
- Alfenas, A. C., & Mafia, R. C. (2016). *Métodos em fitopatologia [métodos en fitopatología]*. (2ª ed.). Editora UFV.
- Cabezas Hualliyas, O. (2020). *Fitopatología tropical enfermedades causadas por hongos y Pseudohongos* (1ª ed., p. 126). Cabezas Huayllas, Óscar.
- Cannon, P. y Kirk, P. (2007). *Familias fúngicas del mundo* (1ª ed., p. 127). CABI.
- Chung, K. R. (2011). *Elsinoë fawcettii* and *Elsinoë australis*: the fungal pathogens causing citrus scab. *Molecular plant pathology*, 12(2), 123-135. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00663.x>
- Cleves Leguízamo, J. A., Orduz Rodríguez, J. O., & Fonseca Carreño, J. A. (2012). Aportes de la investigación en cítricos al manejo agroecológico del cultivo en el piedemonte del departamento del Meta, Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 85. <https://doi.org/10.22490/21456453.945>
- Cumba-García, M. F., Mendoza de Arroyave, A., & Garcés-Fiallos, F. (2019). Efecto de oxiclورو de cobre y riego sobre enfermedades y producción de plantas de limón (*Citrus aurantifolia* Swingle). *Ciencia y Tecnología*, 12(2), 7–13. <https://doi.org/10.18779/cyt.v12i2.321>
- Damm, U., Crous, PW y Fourie, PH (2007). *Botryosphaeriaceae* como patógenos potenciales de las especies de *Prunus* en Sudáfrica, con descripciones de *Diplodia africana* y *Lasiodiplodia plurivora* sp. nov. *Micología*, 99(5), 664–680. doi:10.1080/15572536.2007.1183253
- ESPAC (2020). *Encuesta De Producción y Espacio Continua*, mayo 2020. Recuperado el 07 de febrero del 2022, de: https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Tabulados%20ESPAC%202020.xlsx

- FAOSTAT. (2019). Producción de limas y limones a nivel mundial. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Recuperado el 02 de marzo de 2022, de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>
- Francesco Aloï., Mario Riolo., Rossana Parlascino., Antonella Pane., Santa Olga Cacciola. (2021). Bot Gummosis of Lemon (*Citrus × limon*) Caused by *Neofusicoccum parvum*. *Journal of Fungi*, 7(4), 294. doi:10.3390/jof7040294
- Freeman, S., & Shabi, E. (1996). Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts [Infección cruzada de frutos subtropicales y templados por especies de *Colletotrichum* de varios huéspedes.]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 49(6), 395–404. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0062>
- Gopal, K., Lakshmi, LM, Sarada, G., Nagalakshmi, T., Sankar, TG, Gopi, V. y Ramana, KTV (2014). Citrus melanose (*Diaporthe citri* Wolf): una revisión. En t. *J. Curr. Microbiol. aplicación. Sci*, 3 (4), 113-124.
- Graham, J. H. (1997). *Biology of citrus*. By P. Spiegel-Roy and E. E. Goldschmidt. 24 x 14 cm [Biología de los cítricos. Por P. Spiegel - Roy y E.E Goldschmidt. 24 × 14 cm]. *New Phytologist*, 136(2), 369–373. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1997.00745-4.x>
- Guajardo, J., Riquelme, N., Tapia, L., Larach, A., Torres, C., Camps, R., & Besoain, X. (2018). First Report of *Lasiodiplodia theobromae* Causing Bot Gummosis in *Citrus limon* in Chile [Primer reporte de *Lasiodiplodia theobromae* causante de gomosis bot en *Citrus limon* en Chile.]. *Plant Disease*, 102(4), 818. doi:10.1094/pdis-09-17-1517-pdn
- Jaouad, M., Moinina, A., Ezrari, S., & Lahlali, R. (2020). Plagas y enfermedades clave de los árboles de cítricos con énfasis en las enfermedades de pudrición de la raíz: una descripción general. *Revista Marroquí de Ciencias Agrícolas*, 1 (3).
- Joshi, M., Bhargava, P., Bhatt, M., Kadri, S., Shri, M. y Joshi, C. (2021). Fomitopsidáceas. Hongos de Gujarat, 1, 125-126. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4999-8_16
- Marsberg, A., Kemler, M., Jami, F., Nagel, JH, Postma-Smidt, A., Naidoo, S., ... & Slippers, B. (2017). *Botryosphaeria dothidea*: un patógeno latente de importancia mundial para la salud de las plantas leñosas. *Patología vegetal molecular*, 18 (4), 477-488.
- Mondragón-Flores, Alejandra, Rodríguez-Alvarado, Gerardo, Gómez-Dorantes, Nuria, Guerra-Santos, Jesús Jaime, & Fernández-Pavía, Sylvia Patricia. (2021). *Botryosphaeriaceae*: una familia de hongos, compleja, diversa y cosmopolita. *Revista mexicana de ciencias*

agrícolas, 12(4), 643-654. Epub 21 de febrero de 2022. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2620>

- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: Genera and species known from culture [Las Botryosphaeriaceae: géneros y especies conocidas por cultivo]. *Studies in Mycology*, 76, 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Picos-Muñoz, Paola Alejandra, García-Estrada, Raymundo Saúl, León-Félix, Josefina, Sañudo-Barajas, Adriana, & Allende-Molar, Raúl. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *Revista mexicana de fitopatología*, 33(1), 54-74. Recuperado en 20 de abril de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054&lng=es&tlng=es
- Ploetz, R. (2003). *Enfermedades de los cultivos de frutas tropicales* (2ª ed., pp. 163-190). CABI Pub.
- Polanco Florián, L. G., Alvarado Gómez, O. G., Pérez González, O., González Garza, R., & Olivares Sáenz, E. (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>
- Ramos, A. P., Talhinhos, P., Sreenivasaprasad, S., & Oliveira, H. (2016). Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C. karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal [Caracterización de *Colletotrichum gloeosporioides*, como principal agente causal de la antracnosis de los cítricos, y *C. karstii* como especie preferentemente asociada con la muerte regresiva de la ramita de limón en Portugal]. *Phytoparasitica*, 44(4), 549–561. <https://doi.org/10.1007/s12600-016-0537-y>
- Réblová, M., Gams, W. y Seifert, KA (2011). *Monilochaetes* y géneros afines de los Glomerellales, y una reconsideración de familias en los Microascales. *Estudios en Micología*, 68, 163–191. doi:10.3114/sim.2011.68.07
- Riolo, M., Aloï, F., Pane, A., Cara, M., & Cacciola, SO (2021). Muerte regresiva de ramas y brotes de cítricos, una nueva enfermedad causada por especies de *Colletotrichum*. *Células*, 10(2), 449. doi:10.3390/cells10020449

- Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2017). Situación actual de *Colletotrichums* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3). doi: 10.18781/r.mex.fit.1703-910.18781/r.mex.fit.1703-9
- Ruiz C., J.A., G. Medina G., I. J. González A., H.E. Flores L., G. Ramírez O., C. Ortiz T., K.F. Byerly M. y R.A. Martínez P. 2013. Requerimientos agroecológicos de cultivos. Segunda Edición. Libro Técnico Núm. 3. INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias-CIRPAC-Campo Experimental Centro Altos de Jalisco. Tepatitlán de Morelos, Jalisco, México. 564 p.
- Sáenz Pérez, C. A., Osorio Hernández, E., Estrada Drouaillet, B., Poot Poot, W. A., Delgado Martínez, R., & Rodríguez Herrera, R. (2019). Principales enfermedades de los cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(7), 1653–1665. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1827>
- Santistevan Méndez, M., Helfgott Lerner, S., Loli Figueroa, O., & Julca Otiniano, A. (2017). Comportamiento del cultivo del limón (*Citrus aurantifolia* Swingle) en "fincas tipo" en Santa Elena, Ecuador. *Idesia*, 35(1), 45–49. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292017005000003>
- Scora, R. W. (2010). Torrey Botanical Society on the History and Origin of Citrus [Sobre la historia y el origen de los cítricos]. *Society*, 102(6), 369–375. <https://dx.doi.org/10.2307/2484763>
- Sir Elkhatim, K. A., Elagib, R. A. A., & Hassan, A. B. (2018). Content of phenolic compounds and vitamin C and antioxidant activity in wasted parts of Sudanese citrus fruits [Contenido de compuestos fenólicos y vitamina C y actividad antioxidante en las partes desperdiciadas de los cítricos sudaneses]. *Food Science and Nutrition*, 6(5), 1214–1219. <https://doi.org/10.1002/fsn3.660>
- Slippers, B., Crous, P. W., Denman, S., Coutinho, T. A., Wingfield, B. D., & Wingfield, M. J. (2004). Combined multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several species previously identified as *Botryosphaeria dothidea* [La combinación de múltiples genealogías de genes y caracteres fenotípicos diferencian varias especies previamente identificadas como *Botryosphaeria dothidea*]. *Mycologia*, 96(1), 83–101. <https://doi.org/10.1080/15572536.2005.11833000>

- Slippers, B., Crous, P. W., Jami, F., Groenewald, J. Z., & Wingfield, M. J. (2017). Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward [Diversidad en los Botryosphaeriales: mirando hacia atrás, mirando hacia adelante]. *Fungal Biology*, 121(4), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.02.002>
- Soares, A., Nogueira-Melo, G., Plautz Jr, H., & Gibertoni, T. (2017). Una nueva especie, dos nuevas combinaciones y notas sobre Fomitopsidaceae (Agaricomycetes, Polyporales). *Fitotaxa*, 331 (1), 75. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.331.1.5>
- Talon, M., Wu, G. A., Gmitter, F. G., & Rokhsar, D. S. (2020). The origin of citrus [El origen de los cítricos]. *The Genus Citrus*, 9–31. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812163-4.00002-4>
- Thulin, M. (2015). *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swingle family Rutaceae [Citrus aurantifolia (Christm) Swingle familia Rutaceae]. *Global plants*. 1-1. Recuperado el 03 de marzo de 2021, de: <https://plants.jstor.org/stable/history/10.5555/al.ap.specimen.s08-11812>
- Tropicos. (2012). Name - *Citrus aurantiifolia* (Christm.) Swingle [Nombre - Citrus aurantiifolia (Christm.) Swingle]. *The plant list*. Obtenido el 03 de marzo de 2021, de: <http://legacy.tropicos.org/Name/50119437?langid=66>
- Valarezo C., A., Valarezo Cely, O., Mendoza García, A., y Álvarez P., H. (2014). Guía técnica sobre el manejo de los cítricos en el Litoral ecuatoriano. Portoviejo, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Portoviejo, Programa Nacional de Fruticultura. Tomado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1194>
- Velasco, R., & Licciardello, C. (2014). A genealogy of the citrus family [Una genealogía de la familia de los cítricos]. *Nature Biotechnology*, 32(7), 640–642. <https://doi.org/10.1038/nbt.2954>
- Velásquez, A. C., Castroverde, C. D. M., & He, S. Y. (2018). Plant–Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions [Guerra entre plantas y patógenos en condiciones climáticas cambiantes]. *Current Biology*, 28(10), 619–634. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.054>
- Verdejo-Lucas, S. y McKenry, MV (2004). Manejo del nematodo de los cítricos, *Tylenchulus semipenetrans*. *Revista de nematología* , 36 (4), 424–432.
- Wu, G. A., Terol, J., Ibanez, V., López-García, A., Pérez-Román, E., Borredá, C., Domingo, C., Tadeo, F. R., Carbonell-Caballero, J., Alonso, R., Curk, F., Du, D., Ollitrault, P., Roose, M. L., Dopazo, J., Gmitter, F. G., Rokhsar, D. S., & Talon, M. (2018). Genomics of the

origin and evolution of Citrus [Genómica del origen y evolución de los cítricos]. *Nature*, 554(7692), 311–316. <https://doi.org/10.1038/nature25447>

8. ANEXOS



Anexo 1. preparación de medios de cultivo, medio de cultivo AA (imagen izquierda) y PDA (imagen derecha).



Anexo 2. Esterilización de materiales, imagen izquierda placas Petri esterilizadas en estufa, imagen derecha medio de cultivo dentro del autoclave.



Anexo 3. Proceso de obtención de muestras, imagen inferior muestras procesadas para aislar, imagen superior colocación de muestras en medios de cultivos.



Anexo 4. Colonias obtenidas a partir de los aislamientos, imagen superior colonias adultas, imagen inferior colonias jóvenes.



Anexo 5. Placas con ramas de pino para obtención de estructuras fúngicas.



Anexo 6. Plantas para realizar las inoculaciones.