

## IDENTIFICACIÓN DEL AGENTE CAUSAL E IMPORTANCIA DE LA GOMOSIS EN LA ZONA CITRÍCOLA DE HUIMANGUILLO, TABASCO, MÉXICO

### Identification of the causal agent and importance of gummosis in the citrus region of Huimanguillo, Tabasco, México

JA Acosta-Pérez, CF Ortiz-García ✉, JM Zaldívar-Cruz, M Rodríguez-Cuevas, CC Bautista-Muñoz, C de la Cruz Castillo-Aguilar

(JAAP)(CFOG)(JMZC)(CCBM)(CCCA) Postgrado en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina, km 3.5 Carretera Cárdenas-Huimanguillo, H. Cárdenas, Tabasco, México. 86500-cfortiz@colpos.mx.  
(MRC) INIFAP-Huimanguillo

**Artículo recibido:** 15 de enero de 2009, **aceptado:** 21 de octubre de 2012

**RESUMEN.** El presente estudio consistió en identificar la especie *Phytophthora* causante de la gomosis o podredumbre del pie en cultivos de Naranja 'Valenciana' (*Citrus sinensis*) y Limón 'Persa' (*Citrus latifolia*) en la Sabana de Huimanguillo, Tabasco. De 34 sitios muestreados sistemáticamente se lograron obtener 13 aislamientos de *Phytophthora* en tejidos de tallo y frutos enfermos. Para esto, se utilizaron medio selectivo agar zanahoria (zanahoria 10 %-agar Pimaricina, Rifampicina, Vancomicina y PCNB). La caracterización morfológica de dichos aislamientos presentaron micelio toruloso cenocítico, esporangios papilados, clamidosporas intercalares y terminales; de acuerdo a las claves morfológicas de Stamps *et al.* (1990) pertenecen a la especie *P. parasitica* sin. *P. nicotianae* var. *parasitica*. Esto fue confirmado por identificación molecular. Este es el primer reporte de *P. parasitica* atacando a cultivos de *C. sinensis* y *C. latifolia* en Tabasco. Adicionalmente se puede señalar que en base a las evaluaciones de las 34 fincas visitadas, la incidencia de la gomosis es 17.5 %, con un intervalo de variación de 1.4 a 45.0 %, siendo los daños mayores en plantaciones de *C. latifolia* que en *C. sinensis*. Asimismo, se puede señalar que en las plantaciones de *C. latifolia*, existe una nueva enfermedad con sintomatología externa parecida a la gomosis y que los productores equivocadamente están manejando como tal. Esta enfermedad estuvo presente en el 44 % de las plantaciones de *C. latifolia* con una incidencia promedio de 10.2 % e intervalo de 1.7 a 25.0 %.

**Palabras clave:** *Phytophthora parasitica*, *Citrus latifolia*, caracterización molecular y morfológica.

**ABSTRACT.** This study was carried out to identify the species of *Phytophthora* that causes gummosis or rot of the foot in Valenciana orange (*Citrus sinensis*) and Persa lemon (*C. latifolia*) crops in the Sabana de Huimanguillo, Tabasco. Of 34 sites that were sampled systematically, 13 isolates of *Phytophthora* were obtained from diseased stem and fruit tissues. For this, a selective carrot agar medium (10 % carrot-agar Rifampicin, Pimaricin, Vancomycin, Pentachloronitrobenzene (PCNB) and Benlate were used. The morphological characterization of these isolates presented torulous coenocytic mycelium, papillate sporangia, intercalary and terminal chlamydospores; according to the morphological keys of Stamps *et al.* (1990) they belong to the species *P. parasitica* without *P. nicotianae* var. *parasitica*. This was confirmed by molecular identification. This is the first report of *P. parasitica* attacking *C. sinensis* and *C. latifolia* crops in Tabasco. It may also be pointed out that based on the evaluation of the 34 farms that were visited, the incidence of gummosis is 17.5 % with a variation range of 1.4 to 45 %, with the greatest damage in the *C. latifolia* crops and the least in the *C. sinensis* crops. It may also be indicated that the *C. latifolia* crops are presenting a new disease with external symptoms similar to gummosis and the producers are wrongly dealing with it as if it were gummosis. This disease was present in 44 % of the *C. latifolia* crops with an average incidence of 10.2 % and a range of 1.7 to 25 %.

**Key words:** *Phytophthora parasitica*, *Citrus latifolia*, molecular and morphological characterization.

## INTRODUCCIÓN

Los cítricos son cultivados en los cinco continentes; en muchos países productores se le considera como la fruta de mayor importancia, tanto por la superficie cultivada, como por la producción y el consumo per-cápita. Entre los principales materiales cultivados se encuentran las naranjas (*Citrus sinensis* Osbeck), limas (*C. aurantifolia* Christm Swingle) y limones (*C. limon* L.). Estos cítricos juegan un papel de gran importancia en la alimentación humana, fortaleciendo las defensas del organismo por su contenido de vitaminas C, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub> y E; sales minerales, ácidos orgánicos, pectina, y componentes que fortalecen a la circulación. La naranja, ocupa el tercer lugar a nivel mundial después del plátano y la uva. Los principales países productores de naranja son: Brasil, Estados Unidos, China y México; seguidos por España y la India (Anónimo 2008).

El limón es el principal fruto productor de ácido cítrico, y es cultivado en regiones de climas fríos, como son el occidente de los Estados Unidos, España, Italia y Argentina. Complementariamente la lima, por su parte, es sumamente sensible al frío y crece exclusivamente en clima tropical. Los principales países productores de limas y limón son la India y México. Se tiene registro que en 2010, la producción mundial de lima y limón fue de 13 933 864.13 t, de las cuales 13.5 % es aportada por México (FAOSTAT 2012).

La importancia de la citricultura en México radica en que es una de las principales fuentes de divisas con una superficie total plantada de 556 087.07 ha incluyendo naranja, limón y toronja, de las cuales 335 471.72 590 ha corresponden a la naranja 'Valencia' (*C. sinensis* Osbeck) y 166 580.41 ha corresponde al limón 'Persa' (*C. latifolia* Tan.), siendo ambas especies las de mayor importancia económica (Gómez-Cruz & Rinderman 1997; Pastrana-Aponte et al. 1998; Anónimo 2011). Esta actividad se desarrolla en más de 20 estados de la República Mexicana, siendo Veracruz, Colima, San Luis Potosí, Nuevo León y Michoacán, los estados con mayor superficie y producción anual.

En Tabasco, la citricultura está establecida en una superficie total de 15 472.91 ha, de éstas,

el 94.5 % (14 635 ha) se producen en el municipio de Huimanguillo; y aunque solo corresponde al 2.8 % de la superficie nacional cultivada con cítricos, dicha producción juega un papel importante en la producción de limón, ya que éste es para el mercado exterior (Anónimo 2011).

Entre los factores que limitan la producción de cítricos a nivel mundial están las enfermedades. En este sentido, se pronosticó que el virus de la tristeza de los cítricos (VTC) eliminará millones de árboles en regiones altamente productivas del mundo como es Brasil y Estados Unidos. Igualmente, México se muestra con alta vulnerabilidad al VTC, donde ya se han encontrado plantas con infección positiva al virus en los estados de Baja California Norte, Campeche, Colima, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas, Quintana Roo, Veracruz, Yucatán y Tabasco (Anónimo 2004; Villarreal et al. 1996; 2000). Dentro de los hongos que causan enfermedades a los cítricos en Tabasco, se encuentra la gomosis o pudrición del pie de los cítricos, la cual, ha sido una de las enfermedades más importantes debido a que anualmente produce la muerte de 3 a 5 % de árboles de cítricos de pie franco e injertado (Medina et al. 2001). El manejo sustentable de esta enfermedad, se había logrado empleando patrones resistentes, como ha sido el naranjo agrio (*C. aurantium*) (Klotz 1978). Sin embargo, la alta susceptibilidad de este patrón al VTC, ha inducido a nivel mundial su inminente reemplazo. La selección de nuevos patrones como 'Troyer', 'Volkameriana', 'Swingle', 'Cleopatra', con resistencia al VTC, ha permitido continuar con la actividad citrícola de Estados Unidos y Europa (Orozco-Santos 1995; Rocha-Peña 1995). Sin embargo, la gomosis de los cítricos puede ser causada por más de 12 especies de *Phytophthora* (*P. parasitica*, *P. citrophthora*, *P. citricola*, *P. palmivora*, *P. cryptogea*, etc.), las cuales no responden de igual forma a las estrategias de control (Klotz 1978), lo que da mayor ventaja a *Phytophthora*. La resistencia probada a una especie de *Phytophthora* no implica que cuente con la resistencia a todas ellas. Vanderweyen (1983) señaló al patrón *C. troyer* como resistente a *P. citrophthora* y a *C. volkameriana* como altamente susceptible, a

este patógeno.

En México se ha reconocido a *P. parasitica*, como la especie que provoca la gomosis de los cítricos en los estados de Colima (Vidales-Fernández 1982; Orozco-Santos 1995) y Nuevo León (Rocha-Peña & Padrón-Chávez 2009). Sin embargo, no se cuenta con diagnósticos específicos del agente causal de la gomosis en otros estados productores de cítricos. Esta carencia, impide conocer la diversidad de especies de *Phytophthora* en Veracruz, Nuevo León, Península de Yucatán, Oaxaca y Tabasco; que a su vez conforman áreas citrícolas geográficamente distantes y con orígenes de establecimiento diferentes. Sin embargo, la resistencia probada de algunos patrones de cítricos tolerantes a VTC, *P. palmivora* o *P. citrophthora*, no implica que tenga resistencia a las otras especies del patógeno. Así, en cada estado o en cada región citrícola se requiere conocer las especies locales y realizar las pruebas de resistencia para seleccionar el o los patrones más adecuados (Rocha & López 2004). Considerando que en Tabasco, no existe ningún reporte del agente causal de la gomosis en los cítricos (Hernández-Hernández 2001), se ha desarrollado este trabajo con el objetivo de identificar la especie de *Phytophthora* causante de la gomosis en los cultivos de *C. sinensis* y *C. latifolia*, así también, conocer el nivel de daños de la enfermedad en la Sabana de Huimanguillo, Tabasco.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

La investigación se realizó en 16 huertos de *C. sinensis* y 18 huertos de *C. latifolia*, establecidos en la zona citrícola de la Sabana de Huimanguillo, Tabasco, entre las coordenadas geográficas 17° 39' y 17 45' latitud Norte, y 93° 28' y 93° 38' de longitud Oeste (León 1990). El clima es cálido húmedo [Am (f)] con temperatura media anual de 26.1 °C y precipitación de 2 229 mm, siendo el periodo de baja precipitación (57-92 mm) entre los meses de febrero y mayo.

### Sitios de muestreos

Los sitios muestreados se seleccionaron en base a las unidades y sub unidades de suelo descritas

por Salgado-García *et al.* (2007), considerando que *Phytophthora* es un patógeno de suelo y que puede estar influenciado por las propiedades de éste. La unidad Acrisol presenta seis subunidades, Cambisol y Fluvisol unasubunidades (Tabla 1). Con el fin de asegurar la exploración de la mayor heterogeneidad de ambientes, por cada subunidad de suelo se seleccionaron dos plantaciones (puntos de muestreos).

Las plantaciones empleadas como sitios de muestreo pertenecen a productores socios de las dos principales organizaciones de productores de cítricos del municipio; estas son el Consejo Citrícola de Tabasco A. C. y la Unión Agrícola Regional de Productores de Cítricos de la Chontalpa.

### Colecta de muestras de plantas enfermas

Las muestras fueron tomadas en la base del tallo de árboles enfermos, con lesiones de niveles: (1) exudaciones de goma, (2) agrietamiento visible con exposición de leña, (3) presencia de cancro bien definido y destrucción de leña (Orozco-Santos 1995); y frutos colectados del suelo que presentaban síntomas pudrición blanda, clara u oscura en el pedúnculo del fruto. La toma de muestra del tejido necrosado de la corteza se realizó con la ayuda de marro y un formón previamente desinfectado y flameado con alcohol al 70 %, extrayéndose una muestra de 3 cm de ancho y 5 cm de largo del tejido enfermo. Las muestras de cada planta se colocaron en bolsas de polietileno. Una vez etiquetadas y selladas, las muestras se conservaron refrigeradas a 20 °C. Después de cada toma de muestra, las lesiones de los árboles fueron cubiertas con una mezcla de pintura acrílica (500 ml de agua corriente) previamente mezclada con fungicidas Tecto 60 (20 g) y Benlate (20 g). Todas las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Fitopatología del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

### Aislamientos de corteza

Para el aislamiento de *Phytophthora* de las muestras de tallo, se extrajeron diez segmentos de corteza de 5×10 mm conteniendo tejido sano y enfermo. Los fragmentos seleccionados se desinfectaron por inmersión en una solución acuosa de hipoclorito de sodio a una relación de 1:3 (10 ml de

cloro y 30 ml de agua destilada estéril). Las muestras fueron sumergidas por 30 s, seguidamente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Cada fase de lavado fue de 60 s. Se eliminó el exceso de agua y se depositaron en papel filtro estéril dentro de cajas Petri. Las muestras fueron sembradas en medio selectivo agar zanahoria (ZAS). Debido a las condiciones climáticas, los sitios elegidos fueron los que presentaron humedad residual, con esto se asegura la presencia del patógeno.

El medio ZAS, se preparó mediante Zanahoria (rodajas) 100 g l<sup>-1</sup>, Agar 15 g l<sup>-1</sup> (Merck), Ampicilina 250 mg l<sup>-1</sup>, 10 mg l<sup>-1</sup> de pimaricina, 10 mg l<sup>-1</sup> de Rifampicina, Benlate 100 mg l<sup>-1</sup> de benomilo, Pentacloronitrobenzeno (33 %) 116 mg l<sup>-1</sup> y Vancomicina 10 mg l<sup>-1</sup> todo aforado a 1000 ml (Modificado de Ortiz-García 1996).

#### Aislamiento en frutos colectados del suelo

Los frutos colectados del suelo, con necrosis blanda de color marrón rodeando el área del pedúnculo, fueron lavados con agua corriente para eliminar el exceso de suelo, después, fue desinfectado superficialmente mediante flameado con alcohol al 96 %. Posteriormente, de la parte infectada se hicieron cortes del tejido dañado y sano, obteniéndose tres segmentos, que fueron sembrados en medio de cultivo selectivo ZAS (Ortiz-García 1996).

**Identificación macro y micromorfológica.** Los aislamientos obtenidos de campos fueron observados y caracterizados de acuerdo a las claves morfológicas de Stamps *et al.* (1990); para ello, se realizó la inducción para la formación de micelio, esporangios, clamidosporas y oosporas en medio de cultivo selectivo ZAS agregando  $\beta$ -sitosterol (Ortiz-García 1996; Vial *et al.* 2004) a partir de cultivos de cinco días de crecimiento). Las observaciones al microscopio se realizaron mediante preparaciones temporales con lactofenol. Así también, se determinó el tipo de compatibilidad sexual de cada aislamiento mediante la confrontación con cepa A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> (Gallegly & Galindo 1958).

**Identificación molecular.** Se trabajó con 18 cepas de *Phytophthora*, de las cuales 13 fueron aisladas de frutos enfermos de limón colectados del suelo, así como de tallos del injerto y del patrón, además

de otros cinco aislamientos provenientes de cacao, utilizadas como referencias.

#### Extracción de ADN cromosómico

La extracción de ADN de las cepas *Phytophthora* fueron cultivados en matraces de 125 ml con 25 ml de medio YPD enriquecido con Vancomicina (extracto de levadura al 1 %, Dextrosa al 2 %, peptona al 2 % y 10  $\mu$ l de Vancomicina) durante 72 h siguiendo la metodología descrita por Ausebel *et al.* (1999). En todos los casos la centrifugación se llevó a cabo en una microcentrífuga Eppendorff a 14 000 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente. Los matraces se incubaron durante 96 h a temperatura ambiente en agitación orbital a 150 rpm. La biomasa fue cosechada a partir de 3 ml de cultivo en un microtubo de 1.5 ml. Posteriormente, el medio de cultivo fue decantado y las células fueron sometidas a lisis mecánica para la extracción de ADN (Ausebel *et al.* (1999).

La concentración y pureza del ADN se determinó midiendo la absorbencia a 260 nm y considerando que 1U A<sub>260</sub> equivale a 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de ADN de doble cadena. La calidad del ADN se determinó por la relación de absorbencias A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> (Sambrook *et al.* 1989).

#### Amplificación del gen 18S ADNr por PCR

El gen 18S ADNr se usó como gen blanco para la identificación molecular de la cepa aislada. La amplificación fue realizada empleando los iniciadores universales: 1) LV-1 5' CCT CCAGT AGT CAT ATG CTT GTC T 3' y 2) LV-2 5' CAC CTA CGG AAA CCT TGT TAC GAC T 3' de acuerdo a la metodología descrita por Bautista-Muñoz *et al.* (2003). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo con 10 ng del ADN molde, en un volumen final de 25  $\mu$ l bajo la siguiente formulación: 16.3  $\mu$ l de agua grado PCR, regulador de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 2mM, dNTPs 200 mM, iniciadores 0.4 mM y 1U de Taq ADN polimerasa.

#### Purificación de los fragmentos de ADN amplificados

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR fueron purificados empleando el Kit QIAquick

Gel Extraction Kit (250) QIAquick Spin Columns, siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

### Secuenciación del ADN purificado

El producto de PCR purificado fue enviado a secuenciar al Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca, Morelos. Las secuencias de ADN fueron analizadas con el software Chromas Versión 2.31 (Technelysium Pty Ltd.) y comparados con las secuencias de genes homólogos depositadas en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2009).

### Alineación de las secuencias

Con las secuencias nucleotídicas codificantes de genes 18S ADNr de hongos depositadas en la base de datos de la NCBI, fueron alineadas con las secuencias de los fragmentos amplificados del gen 18S ADNr las cepas Ppa 1 a 13 aisladas en este estudio. Los alineamientos múltiples de secuencias nucleotídicas se realizaron con el programa CLUSTAL X versión 1.8 (Thompson *et al.* 1997). El dendrograma fue construido con el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) versión 4.0 (Tamura *et al.* 2007), utilizando el método de agrupamiento de Neighbor-joining y el índice P (Poisson). Las relaciones de similitud fueron valoradas mediante un análisis tipo bootstrap con 1 000 aleatorizaciones. Con base en las relaciones de similitud de éste dendrograma se asignó género y especie a cada una de las cepas de hongos aisladas a partir de cítricos.

### Evaluación de la incidencia y severidad de la gomosis

Para determinar el porcentaje de incidencia de la gomosis de los cítricos en tallo infectado, se llevó a cabo un muestreo sistemático; para ello, en cada una de las plantaciones muestreadas se seleccionó un área rectangular de 441 plantas repartidas en 21 filas con 21 plantas cada una; cuantificando los daños en las plantas de filas de números impares haciendo una submuestra de 121. Adicionalmente, se cuantificó la severidad de la enfermedad mediante el empleo de una escala visual de daño de cuatro niveles: 0, 1, 2 y 3; donde: 0 = árbol sano, 1=

exudaciones de goma, 2= agrietamiento visible con exposición de leña, 3= presencia de cancro bien definido y destrucción de leña (Orozco-Santos 1995). Por lo que sólo se cuantificó el número de plantas enfermas con pudriciones en la base del tronco.

## RESULTADOS

Se muestrearon un total de 34 huertos citrícolos (18 huertos de *C. latifolia* y 16 huertos de *C. sinensis*) en producción, con edades que oscilaban entre los 4 a 25 años. En el 100 % de plantaciones se observaron síntomas típicos de la presencia de la enfermedad gomosis de los cítricos, como son: rajaduras en el tallo, canchales en la base del tallo y pudriciones de fruto (Figura 1).

De los huertos muestreados se obtuvieron 13 aislamientos de *Phytophthora*; provenientes de tejidos de tallos de *C. latifolia* y *C. sinensis*, así también, frutos de limón (Tabla 1). La siembra de los 13 aislamientos en cajas de Petri con medios de cultivo V8 y selectivo ZAS, desarrollaron colonias que fueron de color blanco a crema y presentaron dos diferentes morfologías, una circular compacta y plana (Figura 2a), con bordes ligeramente indefinidos; y las otras 12 colonias fueron semejantes entre sí, presentando crecimiento en lóbulos y bordes ligeramente indefinidos. Con un crecimiento en medio V8 variable de moderado a rápido. Los aislamientos presentaron micelio cenocítico, esporangios que se caracterizaron por ser escasos de forma globosa y papilados (Figura 2b), clamidosporas intercalares y terminales (Figura 2c). El micelio presentaba forma irregular "toruloso", con hinchamientos hifales (Figura 2d). Los tejidos fúngicos son típicos a *P. parasitica* de acuerdo con Stamps *et al.* (1990), la cual es sinónimo de *P. nicotianae* var. *Parasitica*.

Los resultados anteriores y las secuencias obtenidas por amplificación de un fragmento del gen 18S DNAr de las cepas aisladas procedentes de huertos cítricos de Huimanguillo, Tabasco al ser comparadas con secuencias depositadas en el banco de genes del NCBI, confirmó a la especie *P. nicotianae* var. *parasitica* como el agente causal de la gomosis en dicha zona citrícola.

Los aislamientos PCR14-LV1 (aislada a partir



**Figura 1.** Síntomas de gomosis en tallo de *C. sinensis*: a) cancro en el patrón, b) cancro sobre el injerto, c) cancro en ramificación, y d) pudrición en fruto de *C. latifolia* en Huimanguillo, Tabasco.

**Figure 1.** Symptoms of stem gummosis in *C. sinensis*: a) canker in pattern, b) canker on the graft c), branch canker, and d) fruit rot in *C. latifolia* in Huimanguillo, Tabasco.

**Tabla 1.** Porcentaje de incidencia de gomosis de los cítricos (*C. latifolia* y *C. sinensis*) cuantificada en huertas de productores de distintas localidades de la Sabana de Huimanguillo, Tabasco.

**Table 1.** Percentage of gummosis incidence on citric fruit (*C. latifolia* and *C. sinensis*) quantified in producers' orchards in different localities of the Sabana de Huimanguillo, Tabasco.

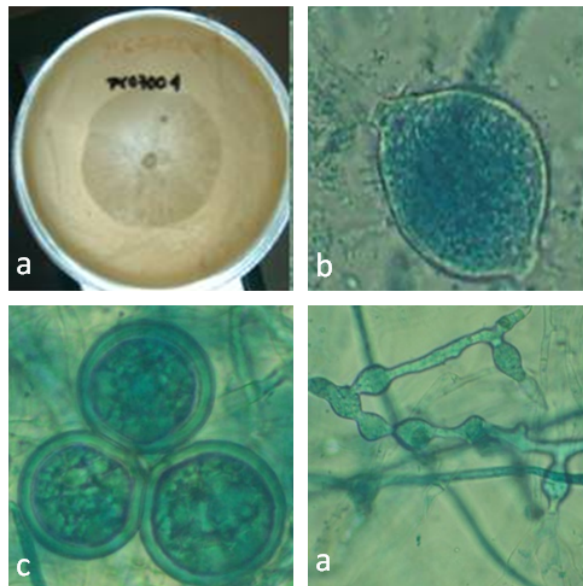
Fincas de <i>C. sinensis</i>			Fincas de <i>C. latifolia</i>		
Localidad	Códigos de subunidades de suelos	Incidencia (%)	Localidad	Códigos de subunidades de suelos	Incidencia (%)
Col. Gilberto Flores M.	ACumgl	8.3	Tierra Nueva 3ra. Sección	ACgl	37.2
Col. Gilberto Flores M.	ACumgl	9.9	Col. José Ma. Pino Suárez	ACglpl, ACgl	2.5
Col. Gilberto Flores M.	ACumgl	19.0	Col. José Ma. Pino Suárez	ACumgl	28.1
Col. Gilberto Flores M.	Achuum	14.9	Col. José Ma. Pino Suárez	ACumgl	43.8
Col. Gilberto Flores M.	Achupl	14.0	Col. José Ma. Pino Suárez	ACHupl	24.8
Col. Gilberto Flores M.	Achupl	12.4	Col. Marcelino Inurrieta	ACHupl	34.7
Col. Gilberto Flores M.	Achupl	16.5	Col. José Ma. Pino Suárez	ACglpl	44.6
Col. Marcelino Inurrieta	Achupl	7.4	Col. Antonio Zamora Arrijoja	ACfrum	21.5
Tierra Nueva 3ra. Sección	Acumpl	9.9	NI	ACfrum	14.9
Tierra Nueva 3ra. Sección	Acumpl	10.7	Col. José Ma. Pino Suárez	ACHuum	1.7
NI	CMcrfl	14.9	Col. José Mercedes Gamas	CMcrfl	41.3
Col Miguel Alemán	ACfrum	9.1	Col. Encomendero	ACfrum	14.9
Col. José Mercedes Gamas	CMcrfl	33.9	Ej. Habanero 1ra Secc. Cárdenas	FLeu	14.9
Col. Encomendero	ACfrum	24.8	Col. José Mercedes Gamas	CMcrfl	4.1
Col. José Mercedes Gamas	AC huum	10.7	R/a Florida	ACHupl	10.7
Tierra Nueva 3ra. Secc	Acumpl	7.4	Col. Mercedes Gamas	CMcrfl	14.9
			Tierra Nueva 3ra. Secc	Acumpl	8.3
			Tierra Nueva 3ra. Secc	Acumpl	7.4
<b>Incidencia promedio</b>		<b>14.0</b>	<b>Incidencia promedio</b>		<b>20.5</b>

NI= Localidad no identificada; ACumgl: Acrisol Umbri-Gléyico; ACfrum: Acrisol Ferri-Úmbrico; Acumpl: Acrisol Umbri-Plíntico; ACglpl: Acrisol Gleyi-Plíntico; Achuum: Acrisol Humi-Úmbrico; Achupl: Acrisol Humi-Plíntico; CMfgl: Cambisol Ferrari-Gléyico; CMcrfl: Cambisol Cromo-Ferrálico; FLeu: Fluvisol eutrico (Salgado et al. 2007).

de Chile) y PCR16-LV1, PCR17-LV1, PCR18-LV1 y PCR19-LV1 (aislados a partir de fruto enfermo de cacao) fueron identificados como *P. tropicalis*. La secuencia del gen 18S DNAr de *Moniliophthora roerei* MRO1 con número de acceso Genbank JF730693, fue incluida como control externo, formando un gru-

po separado de las cepas de *P. nicotianae* y *P. tropicalis*.

En lo que se refiere a la robustez de los agrupamientos obtenidos, este se comprobó con un análisis de 1 000 aleatorizaciones tipo bootstrap. Corroborando con esto la consistencia del grupo detecta-



**Figura 2.** Estructura de *P. parasitica*: a) colonia en medio ZAS, b) esporangios, c) clamidospora, d) hinchamientos hifales.

**Figure 2.** Structure of *P. parasitica*: a) colony in ZAZ medium, b) sporangia, c) chlamydospore, d) hyphal swellings.

do. Los números presentes en los nodos indican el número de veces, medido en porcentaje, en que la topología de un nodo se repite. Con una homogeneidad entre las cepas de *Phytophthora* provenientes de huertos de Huimanguillo (Figura 3).

### Incidencia y severidad de la gomosis

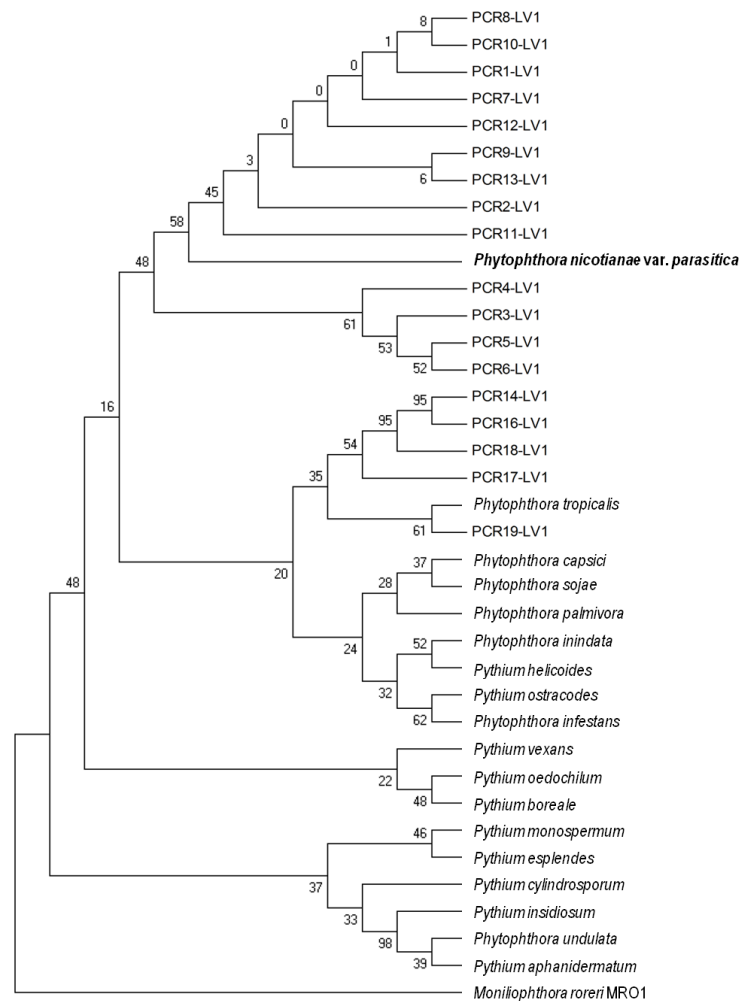
Con base en el muestreo secuencial se determinó que la incidencia promedio de la enfermedad en la zona citrícola de Huimanguillo, para ambos cultivos es de 17.5 % con un intervalo de variación de 1.4 hasta 45.0 % (Tabla 1).

Las plantaciones de *C. sinensis* mostraron incidencia promedio de gomosis de los cítricos es de de 14.0 % con un intervalo de 7.4 hasta 34.0 %, con presencia de gomosis del tallo sobre la región basal del injerto, el porta injerto y frutos. En el caso particular de las plantaciones de *C. latifolia*, se detectó la presencia de *Phytophthora* en tallo (gomosis) y en frutos (mancha café de los frutos), con porcentaje de incidencia promedio de ataque de gomosis en estas plantaciones en tallo fue de 20.5 % con un intervalo de variación del 2 a 45.0 % (Tabla 1).

Pese a estos resultados la comparación de me-

dias de la incidencia de gomosis en el cultivo de *C. sinensis* y *C. latifolia* mediante las muestras obtenidas de ambos cultivos consideradas como aleatorias e independientes (Infante & Zárate, 1984), y con ayuda del programa SAS 9.1 no presentaron diferencias estadísticas significativas fueron diferentes ( $p = 0.028$ ). Referente al nivel de daño o severidad, se pudo verificar que el 83 % de los árboles de una plantación están aparentemente sanos, y que un 12.5 % presentan un nivel de daño inicial, sin embargo, el porcentaje de severidad de mayor impacto es del orden del 4.5 %. En la Figura 4, se presentan los síntomas externos de las plantas de *C. latifolia* atacadas por la enfermedad de la secadera, los cuales son diferentes a la gomosis de los cítricos pero los productores confunden con dicha enfermedad. La incidencia de ésta se registró en el 40 % de las plantaciones visitadas tomando valores en un intervalo del 1.6 a 24.8 % y con una media de 10.2 %, situación que preocupa a los productores ya que dicha enfermedad termina por matar las plantas en un periodo de dos a tres años.

### Resultados complementarios



**Figura 3.** Dendrograma de las secuencias nucleotídicas del gen 18S DNAr de las cepas aisladas y otras especies de los género *Phytophthora*, *pythium* y *Moniliopnthora rorei*. Se muestra la relación que guardan las cepas PCR1-LV1, PCR2-LV1, PCR3-LV1, PCR4-LV1, PCR5-LV1, PCR6-LV1, PCR7-LV1, PCR8-LV1, PCR9-LV1, PCR10-LV1, PCR11-LV1, PCR12-LV1 y PCR13-LV1 (aisladas de tallos y frutos de *C. latifolia* y *C. sinensis*) con *P. nicotianae* var. *parasitica*; las cepas PCR14-LV1, PCR16-LV1, PCR17-LV1, PCR18-LV1 y PCR19-LV1 con *P. tropicalis*. La secuencia del gen 18S DNAr de la cepa MRO1 de *Moniliopnthora rorei* fue incluida como grupo externo. Los números en los nodos representan los valores de Bootstrap. El número de acceso GenBank de cada secuencia nucleotídica comparada es indicado. (*P. nicotianane* var. *parasitica*, AY742753; *P. sojae*, AY742749; *P. inundata*, EU199111; *P. tropicalis*, AY742743; *P. capsici*, AY742748; *P. palmivora*, AY742745; *Pythium vexans*, EF418924; *Py. ostracodes*, AY2759; *Py. helicoides*, EF418925; *Py. oedochilum*, EF418926; *Py. boreale*, EF418927; *P. infestans*, AY742744; *Py. monospermun*, AJ238653; *Py. esplendes*, AY742756; *Py. cylindrosporium*, EU199112; *P. undulata*, AJ238654; *Py. insidiosum*, AY486144; *Py. aphanidermatum*, AY742755).

**Figure 3.** Dendrogram of the nucleotide sequences of the 18S rADN gene from isolates strains and others species of the genera *Phytophthora*, *Pythium* and *Moniliopnthora rorei*. Shown is the relationship among the strains PCR1-LV1, PCR2-LV1, PCR3-LV1, PCR4-LV1, PCR5-LV1, PCR6-LV1, PCR7-LV1, PCR8-LV1, PCR9-LV1, PCR10-LV1, PCR11-LV1, PCR12-LV1 and PCR13-LV1 (isolates from stem and fruits of *C. latifolia* and *C. sinensis*) with *P. nicotianae* var. *parasitica*, and the strains PCR14-LV1, PCR16-LV1, PCR17-LV1, PCR18-LV1 and PCR19-LV1 with *P. tropicalis*. The sequence of the 18S rDNA gene of the *Moniliopnthora rorei* MRO1 strain was included as an external group. The numbers on the nodes represent the Bootstrap values. The GenBank accession number of each compared nucleotide sequence is indicated (*P. nicotianane* var. *parasitica*, AY742753; *P. sojae*, AY742749; *P. inundata*, EU199111; *P. tropicalis*, AY742743; *P. capsici*, AY742748; *P. palmivora*, AY742745; *Pythium vexans*, EF418924; *Py. ostracodes*, AY2759; *Py. helicoides*, EF418925; *Py. oedochilum*, EF418926; *Py. boreale*, EF418927; *P. infestans*, AY742744; *Py. monospermun*, AJ238653; *Py. esplendes*, AY742756; *Py. cylindrosporium*, EU199112; *P. undulata*, AJ238654; *Py. insidiosum*, AY486144; *Py. aphanidermatum*, AY742755).

En ocho plantaciones de *C. latifolia* injertados





**Figura 4.** Síntomas de la secadera en *C. latifolia* injertado sobre *C. volkameriana*: a) marchitamiento y amarillamiento del follaje de una rama, b) atizonamiento parcial del follaje, c) muerte de ramas y emisión de chupones basales, d) cancro sobre el tallo o rama secundaria, e) necrosis interna sobre el tallo o rama secundaria.

**Figure 4.** Symptoms of dry wilt in *C. latifolia* grafted on *C. volkameriana*: a) wilting and yellowing of the foliage of a branch, b) partial blighting of the foliage, c) death of branches and emission of baseline suckers, d) canker on the stem or secondary branch, e) internal necrosis on the stem or secondary branch

sobre patrón *C. volkameriana*, de las 18 plantaciones muestreadas de este cultivo, se detectó, además de la gomosis de los cítricos, la presencia de una nueva enfermedad denominada por algunos productores como secadera. Esta enfermedad provoca daños a nivel de la base del tallo del injerto, mostrando taponamiento de vasos, necrosis de tallo. Estos daños provoca marchitamiento parcial, amarillamiento del follaje de una rama (Figura 4a), atizonamiento parcial del follaje (Figura 4b), muerte de ramas y emisión de chupones basales (Figura 4c), cancro sobre el tallo o rama secundaria (Figura 4d), necrosis interna sobre el tallo o rama secundaria (Figura 4e), finalizando después de un año, dos o tres años con la muerte de la propia planta. La incidencia promedio de esta enfermedad, contabilizada dentro del patrón de muestreo sistemático para gomosis, fue de 10.2 % con un intervalo de 1.6 a 24.8 %, lo que preocupa a los productores de cítricos.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos muestran que la especie asociada a la gomosis de los cítricos en la zona cítrica de la Sabana de Huimanguillo, Tabasco con lesiones de grado 1 a 3, es *P. nicotianae* var. *parasitica* sinónimo de *P. parasitica*, del mismo modo que lo es en otras zonas cítricas de estado de Colima (Vidales-Fernández, 1982) y Nuevo León. Tradicionalmente, las especies de *Phytophthora* han sido uno de los agentes patógenos de mayor importancia en las zonas cítricas a nivel mundial (Álvarez et al. 2008a), siendo las especies más frecuentes *P. parasitica* y *P. citrophthora* (Araújo et al. 2008), Álvarez et al (2008a, 2008b) han descrito principalmente estas dos especies.

En el caso particular de *C. sinensis*, se detectó la presencia de *P. parasitica* en tallo (gomosis) sobre la región basal del injerto. Los síntomas de plantas enfermas son de acuerdo a los reportados por Vial et al. (2004) y Vial et al. (2006), los cuales están descritos como pudrición del pie con lesiones necró-

ticas en la parte basal del tronco del portainjerto, dándose la infección hacia abajo del injerto y hacia arriba sobre las ramas y el aguado o podredumbre marrón de los frutos. A partir del punto de infección, la necrosis avanza hasta rodear completamente las ramas afectadas, o el tronco del árbol, ocasionando su muerte (Álvarez et al. 2008a), es decir, al extenderse las lesiones descritas, se produce el colapso de tejidos floemáticos provocando la muerte de ramas y finamente del árbol (Álvarez et al. 2006).

Los síntomas de la gomosis observados en los tallos de *C. sinensis* y *C. latifolia* correspondieron bien a los descritos por Klotz (1978) y Orozco-Santos (1995). En el caso de las plantaciones de *C. latifolia*, se detectó la presencia de *Phytophthora* en tallo y en frutos (mancha café de los frutos). Resultados que muestran que este problema tiene importancia económica en la región. Esto puede deberse a la alta susceptibilidad de los limones a esta enfermedad (Timmer et al. 2002).

Las cepas aisladas en este estudio reúnen las características macro y micromorfológicas de *P. parasitica*. En aislamientos de lesiones irregulares, café claro, en la base del tronco del aguacate Ceja-Torres et al. (2000) aislaron a *P. parasitica* con micelio color blanco, oosporas apleróticas y anteridios anfiginos, esporangios papilados de forma globosa, limoniforme, sobre esporangios simples. La confrontación sexual mostró que los trece aislamientos pertenecen al tipo A<sub>1</sub>. De acuerdo con estas descripciones, las cepas de cítricos aisladas en Huimanguillo, Tabasco cumplen con descripciones de acuerdo a las claves morfológicas de Stamps et al. 1990, por lo que se corrobora que los aislamientos estudiados pertenecen a *P. parasitica* (Timmer et al. 2002). La reproducción sexual se da con mayor frecuencia en condiciones naturales, existen dos tipos el homotálico conocido como gametos masculinos (anteridio) y el femenino (oogonio) además que se manifiesta la compatibilidad A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> (Brasier, 1978; Boccas, 1980; Shaw, 1988). Los procesos sexuales involucran la producción del oogonio y el anteridio, los cuales surgen de las puntas del micelio que se contactan. Si el oogonio crece sobre el anteridio, éste se denomina anfiginio y si el anteridio rodea el oogonio, en su parte basal cerca del pedicelo, se conoce como

paraginio. En *Pythium* el anteridio rodea completamente el oogonio (Erwin & Ribeiro, 1996).

El patógeno *P. parasitica* es una de las tres especies de mayor importancia reportada causando gomosis o pudrición del pie de los cítricos en el mundo: *P. parasitica* Dastur [(sin. *P. nicotianae* Breda de Haan var. *parasitica* (Dastur) Waterhouse)] *P. citrophthora* (Sm. and Sm.) Leonian, *P. palmivora* Butler; (Vanderweyen 1983; Matheron et al. 1997; Erwin & Ribeiro, 1996; Timmer et al. 2002; Dirac et al. 2003).

El agente causal de Gomosis reportado en Estados Unidos es *P. parasitica*, en los estados de Florida, Texas, Arizona y California; (Fawcett 1936; Klotz et al. 1958; Timmer 1973; Klotz, 1978; Timmer et al. 1993, Matheron et al. 1997; Timmer, 2002). En Brasil en el estado de Sao Paulo (Carpenter & Furr 1962; Graham 1990; Matheron et al. 1997; Feichtenberger 2001; Medina et al. 2003). Para México, estudios realizados en Tecomán, Colima, indican que la Gomosis en *C. aurantifolia* Swingle es causada igualmente por *P. parasitica* Dastur (Vidales-Fernández 1982). Este es el primer reporte de *P. parasitica* como agente causal de la gomosis de los cítricos en Tabasco, de acuerdo a lo reportado por Álvarez et al. (2006), hasta el momento, no se conoce cuál es el factor o factores ligados a la aparición y desarrollo de esta enfermedad. Estos autores sugieren que debido a la amplia distribución geográfica de *Phytophthora*, esta enfermedad ya estaba presente anteriormente al establecimiento de los cítricos.

Los resultados de la incidencia de la gomosis de los cítricos mostraron que existe una amplia distribución de inoculo en toda la región citrícola de Huimanguillo, y su importancia entre las plantaciones puede deberse a la eficiencia del control adoptado y al manejo de huerta (Orozco-Santos 1995). Esta incidencia es favorecida por los suelos pesados del área citrícola que retienen humedad en sus perfiles por mayor tiempo (Salgado-García et al. 2007). Lo que refiere un manejo regional inadecuado de esta enfermedad. La incidencia de esta enfermedad es variable, en España, existen registros de pérdidas considerables a partir del 2002, donde más del 90 % de los árboles han sido afectados por el patógeno *P.*

*citrophthora* (Álvarez *et al.* 2008b). Álvarez *et al.* (2006), mencionan que en España, la importancia de esta enfermedad ha llegado al extremo, ya que en algunas provincias han sido eliminadas parcelas enteras afectadas con este patógeno.

Asimismo, la enfermedad de la secadera, algunos productores la asocian equivocadamente con daños de gomosis o con daños de insectos, dándole el manejo semejante. La descripción de una enfermedad con tal sintomatología no se encontró reportada en la literatura. Por lo que el diagnóstico del agente causal se hace imperativo. Estos resultados muestran que el grado de conocimiento de las enfermedades en la producción de cítricos para muchos productores es deficiente. Además, que en el proceso de la producción de cítricos se siguen estrategias de manejo inapropiadas posiblemente desarrolladas

en otras regiones productoras del país, que lejos de reducir las pérdidas económicas en Huimanguillo, éstas se han visto acentuadas. Por lo que se recomendaría con el fin de reducir el impacto de las enfermedades deben impulsarse el desarrollo de cursos de capacitación entre otras estrategias divulgativas.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Fondo Mixto del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Gobierno del estado de Tabasco, por el financiamiento al Proyecto "Evaluación de Patrones tolerantes al Virus de la tristeza injertados con diferentes especies de cítricos en Tabasco" Clave TAB-2004-CO5.21.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez LA, Vicent A, García-Rellán D, Martínez-Culebras P, de la Roca E, Bascón J, Armengol J, Abad-Campos P, Alfaro-Lassala A, García-Jiménez J (2006) Muerte de árboles cítricos causada por ataques de *Phytophthora citrophthora* a ramas principales. Bol. San. Veg. Plagas. 32: 241-258.
- Álvarez LA, Vicent A, de la Roca E, Bascón J, Abad-Campos P, Armengol J, García-Jiménez J (2008a) Branch cankers on citrus trees in Spain caused by *Phytophthora citrophthora*. Plant Pathology 57: 84-91.
- Álvarez LA, Vicent A, de la Roca E, Bascón J, García-Jiménez J (2008b) Comparison of application methods of systematic fungicides to suppress branch cankers in clementine trees caused by *Phytophthora citrophthora*. Plant disease. 92 (9): 1357-136
- Anónimo (2004) Norma Oficial Mexicana NOM-031-FITO-2000, por la que se establece la campaña contra el virus tristeza de los cítricos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México.
- Anónimo (2008) Avances de siembras y cosechas del año agrícola 2008. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA. Revista Claridades Agropecuaria. N°. 182 (10): 52-62.
- Anónimo (2011) Avances de siembras y cosechas del año agrícola 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). SAGARPA. <http://www.siap.gob.mx/>.
- Araújo JR, Broetto F, Salibe AA, Feichtenberger E (2008) Alteração na atividade de peroxidase e concentração de fenóis em microtangerinas (*Citrus spp.*) infectadas por *Phytophthora parasitica*. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre 6 (1): 1-5.
- Ausebel FM, Brent R, Kingston EE (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4th edition. John Wiley & Sons, New York.
- Bautista-Muñoz C, Boldo XM, Villa-Tanaca L, Hernández-Rodríguez C (2003) Identification of *Candida* spp. by randomly amplified polymorphic DNA analysis and differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR methods. Journal of Clinical Microbiology 41:414-420.

- Brasier CM (1978) Stimulation of oospore formation in *Phytophthora* by antagonistic species of Trichoderma and its ecological implications. *Annals of Applied Biology* 89: 135-139.
- Boccas BR (1980) Interspecific crosses between closely related heterothallic *Phytophthora* species. *Phytopathology* 70: 60-65.
- Carpenter JB, Furr JR (1962) Evaluation of tolerance to rot root caused *Phytophthora parasitica* in seedlings of citrus and related genera. *Phytopathology* 52: 1277-1285.
- Ceja-Torres LF, Téliz D, Osada S, Morales JL (2000) Etiología, distribución e incidencia del cancro del aguacate *Persea americana* Mill en cuatro municipios Del Estados de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 18 (2)79-86.
- Carpenter JB, Furr JR (1962) Evaluation of tolerance to rot root caused *Phytophthora parasitica* in seedlings of citrus and related genera. *Phytopathology* 52: 1277-1285.
- Dirac MF, Menge JA, Madore MA (2003) Comparison of seasonal infection of citrus roots by *Phytophthora citrophthora* and *P. nicotianae* var. *parasitica*. *Plant Dis.* 87: 493-501.
- Erwin DC, Ribeiro OK (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. APS Press, the American Phytopathological Society, Minnesota, USA. Exp. Sta. Res. Bull. 153, 208 pp.
- FAOSTAT (2012) Food and Agriculture Organization. <http://faostat3.fao.org/home>.
- Fawcett HS (1936) *Citrus Diseases and Their Control*. McGraw-Hill, New York. 582 pp.
- Feichtenberger E (2001) Doenças incitadas por *Phytophthora* em citros. In: E. D. M. N. Luz, A. F. Santos, K.Matsuoka, J.L. Bezerra (eds). *Doenças causadas por Phytophthora no Brasil*. Campinas. Livraria e Editora Rural Ltda. 283-342 pp.
- Gallegly ME, Galindo J (1958) Mating types and oospores of *Phytophthora infestans* in Mexico. *Phytopathology* 48: 274-277.
- Gómez-Cruz MA, Rinderman RS (1997) *La agroindustria de naranja en México*. Editorial. CIESTAAM, UACH. Chapingo, México.
- Graham JH (1990) Evaluation of tolerance of citrus rootstocks to *Phytophthora* root rot in chlamydospore infested soil. *Plant Disease* 74:743-746.
- Hernández-Hernández LU (2001) Importancia de los Problemas Sanitarios Foliares Asociados a los Cítricos en Tabasco, México. Montecillo, Texcoco, Edo. de México. 79 pp.
- Klotz LJ (1978) Fungal, bacterial and nonparasitic diseases and injuries originating in the seedbed, and nursery orchard. In: W. Reuther, E.C. Calavan, G.F. Carman (eds.) *The Citrus Industry Vol. 4*. University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. Richmond, Crop Protection. USA. 66 pp.
- Klotz LJ, DeWolfe T A, Wong PP (1958). Decay of fibrous roots of citrus. *Phytopathology* 48: 616-622.
- Matheron ME, Porchas M, Matejka JC (1997) Distribution and seasonal population dynamics of *Phytophthora citrophthora* and *P. parasitica* in Arizona citrus orchards and effect of fungicides on tree health. *Plant Dis.* 81:1384-1390.
- Medina HP, Bordignon R, Siqueira WJ, Feichtenberger E, CarvalhAao MRT, Teófilo-Sobrinho J (2003) Resistência de clones e híbridos de porta-enxertos de citros à gomose de tronco causada por *Phytophthora parasitica*. *Fitopatología Brasileira* 28: 534-540.
- Medina VM, Robles MM, Becerra S, Orozco J, Orozco M, Garza JG, Ovando ME, Chave X, Feliz FA (2001) *El cultivo del limón mexicano*. INIFAP. Libro técnico. Núm. 1. México. 188 pp.

- NCBI (2009) National Center for Biothecnology Information ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).
- Nicholas KB, Nicholas HB, Derfield DI (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization Of Genetic Variation. *Embnews News* 4: 14.
- Orozco-Santos M (1995). Enfermedades presentes y potenciales de los cítricos en México. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo de México. México 150 pp.
- Ortiz-García CF (1996) Etude de la diversité génétique de populations de *Phytophthora* pathogenes du cacaoyer (*Theobroma cacao* L.) et du cocotier (*Cocos nucifera* L.) Tesis Doctoral. Université Paul Sabatier Toulouse, Francia. 85 pp.
- Pastrana-Aponte L, Rodríguez-Cuevas MA, León EI, Ramírez-Sandoval G (1998) Manejo tecnológico para el cultivo de la naranja valencia en Tabasco. ISPROTAB- INIFAP. Villahermosa, Tabasco, México. 32 pp.
- Rocha MA, López JI (2004) La citricultura de México y su fitosanidad. In. Memoria Manejo integrado Fitosanitario de los cítricos en México. Veracruz, Veracruz. Julio 27, 2004.
- Rocha-Peña MA (1995) Citrus tristeza virus and its aphid vector *Toxoptera citricida*. *Plant Disease* 79: 437-445.
- Rocha-Peña MA, Padrón-Chávez JE (2009) El cultivo de los cítricos en el Estado de Nuevo León. Instituto de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Libro Técnico 1. 474 pp.
- Salgado-García SD, Palma-López J, Zavala-Cruz J, Lagunes-Espinoza LC, Castelán-Estrada M., Ortiz-García CF, Ventura-Ulloa A, Marín-Aguilar A, Moreno-Cáliz E, Rincón-Ramírez JA (2007) Sistema integrado para recomendar dosis de fertilizantes (SIRDF) en el área cítrica de Huimanguillo, Tabasco. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco México. 89 pp.
- Sambrook J, Fritsch FT, Maniatis E (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. 1531.
- Shaw DS (1988) The *Phytophthora* species. In: Ingram DS, Williams P.H. (eds) *Advances in Plant Pathology*; Chapitre II. AP. London 6: 27-51.
- Spreen TH (2001) "The Free Trade Area of the Americas and the Market for Processed Citrus Products." 13th Intergovernmental Meeting on Citrus, Food and Agriculture Organization, Beijing, China. 265-291.
- Stamps DJ, Warehouse GM, Newhook J, Hall GS (1990) Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. CAB Int. Mycol. Inst. Mycol. Num. 162. 28 pp.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599.
- Thompson JD, Gibson T J, Pluwniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The Clustal IX windows interface; flexible strategies for multiples sequences alinement aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Timmer LW (1972) Management of soilborne diseases of citrus in the Lower Rio Grande Valley. *Journal Rio Grande Valley Horticulture Society*, 26: 44-58.
- Timmer LW, Menge JA, Zitko S E, Pond E, Miller S A, Johnson, EL (1993) Comparison of ELISA techniques and standard isolation methods for *Phytophthora* detection in citrus orchards in Florida and California. *Plant Disease* 77: 791-796.
- Timmer LW (1973) Characteristics of *Phytophthora* isolates from Texas citrus orchards. *Journal Rio Grande Valley Horticulture Society* 27: 44-48.

- Timmer LW, Garnsey SM, Graham JH (2002) Plagas y enfermedades de los cítricos. The American Phytopathological Society. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. 90 pp.
- Vanderweyen A (1983) Contribution a l'étude de la gommosé à *Phytophthora* des agrumes au Maroc. Fruits 38(1): 43-182.
- Vial A, Latorre B, Ortuzar J (2004) Gomosis, pudrición del pie y de los frutos causada por *Phytophthora* spp. Aconex 84: 5-9.
- Vial A, Latorre G, Ortuzar, J (2006) Caracterización de *Phytophthora citrophthora* y *P. inundata* asociado a pudrición del pie y raíz de árboles cítricos en Chile. Ciencia e Investigación Agraria 33 (3): 205-216.
- Vidales-Fernández JA (1982) Etiología de la gomosis de los cítricos en Tecomán, Colima y búsqueda de fuentes de resistencia. Tesis. Maestría en Ciencias. UACH. Chapingo México. 53 pp.
- Villarreal LA, Aguirre L, Cruz M (1996) Detección del virus de la tristeza en México. Memorias XXIII Congreso Nacional de Fitopatología. Guadalajara, Jalisco. México.
- Villarreal LA, Ramírez AM, Robles PL (2000) Campaña contra el virus tristeza de los cítricos en México. In: Memorias Séptima Reunión Anual del Consejo Nacional Consultivo. Secretaría de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural. Comisión Nacional Agropecuaria. Puebla, Puebla, Octubre 24-26.