

# *Neoscytalidium dimidiatum*: causal agent of dieback in *Ficus benjamina* L. in Mexico

*Neoscytalidium dimidiatum* agente causal de muerte descendente en *Ficus benjamina* L. en México

Ernesto Fernández-Herrera<sup>1\*</sup>; Sergio F. Moreno-Salazar<sup>1</sup>; María E., Rentería-Martínez<sup>1</sup>; Alda A. Arratia-Castro<sup>2</sup>; Edgar Villar-Luna<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Sonora, Departamento de Agricultura y Ganadería. Carretera Bahía de Kino km 21, Hermosillo, Sonora, C. P. 83340, MÉXICO.

<sup>2</sup>Universidad Politécnica de Pénjamo. Carretera Irapuato - La Piedad km 44, Pénjamo, Guanajuato, C. P. 36921, MÉXICO.

<sup>3</sup>Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología - Instituto Politécnico Nacional, Unidad Michoacán. Justo Sierra núm. 28, Jiquilpan, Michoacán, C. P. 59510, MÉXICO.

\*Corresponding author: ernesto.fernandez@guayacan.uson.mx, tel. 66 25 96 02 97

## Abstract

In Mexico, *Ficus benjamina* L. is mainly used as an ornamental and has been widely accepted because of its low production cost, rapid growth and abundant foliage. *Ficus* L. is a very broad genus that groups together diverse species native to tropical and subtropical regions. The aim of this research was to morphologically and molecularly identify the causal agent of “branch dieback” in *F. benjamina* plants. Dieback was observed in *Ficus benjamina* trees in urban areas and gardens in Sonora during the hottest season (June to September) in 2014. Fungal isolates were obtained from different symptomatic plants. The morphological characteristics of these isolates were similar to each other and their pathogenicity was confirmed by observing necrotic lesions caused by four of these isolates in *F. benjamina* plants 40 days after inoculation. Concatenated sequences from the internal transcribed spacer region (ITS; KU141333 and KU141334), large subunit (LSU; MF508739 and MF508740) and RNA polymerase II subunit (RPB2; MF508741 and MF508742) of the DNA from two representative isolates were analyzed phylogenetically, showing that the NDFB002 and NDFB003 isolates form a separate clade with several strains of *Neoscytalidium dimidiatum*. These isolates were previously reported in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) GenBank. To our knowledge, this is the first report where *N. dimidiatum* is designated as a causal agent of branch dieback in *F. benjamina* plants in Mexico.

### Keywords:

branch necrosis, *Botryosphaeriaceae*, phylogenetic analysis, PCR.

## Resumen

En México, *Ficus benjamina* L. se usa principalmente como ornamental y ha sido ampliamente aceptado debido a su bajo costo de producción, crecimiento rápido y follaje abundante. *Ficus* L. es un género muy amplio que agrupa diversas especies originarias de regiones tropicales y subtropicales. El presente trabajo tuvo como objetivo identificar morfológica y molecularmente al agente causal de la “muerte descendente de ramas” en plantas de *F. benjamina*. Se observó muerte descendente en árboles de *Ficus benjamina* de zonas urbanas y jardines de Sonora durante la temporada de mayor calor (junio-septiembre) en 2014. Se obtuvieron aislados fúngicos de diferentes plantas sintomáticas. Las características morfológicas de dichos aislados fueron similares entre sí y su patogenicidad se corroboró al observar las lesiones necróticas ocasionadas por cuatro de estos aislados en plantas de *F. benjamina* a los 40 días después de la inoculación. Las secuencias concatenadas de la región espaciadora interna transcrita (ITS; KU141333 y KU141334), subunidad grande (LSU; MF508739 y MF508740) y ARN polimerasa subunidad II (RPB2; MF508741 y MF508742) del ADN de dos aislados representativos se analizaron filogenéticamente, mostrando que los aislados NDFB002 y NDFB003 forman un clado aparte con varias cepas de *Neoscytalidium dimidiatum*. Dichos aislados se reportaron previamente en el Banco de Genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Hasta donde se sabe, este es el primer reporte donde *N. dimidiatum* se señala como agente causal de muerte descendente de ramas en plantas de *F. benjamina* en México.

### Palabras clave:

necrosis de ramas, *Botryosphaeriaceae*, análisis filogenético, PCR.

Please cite this article as follows (APA 6): Fernández-Herrera, E., Moreno-Salazar, S., Rentería-Martínez, M. E., Arratia-Castro, A. A., & Villar-Luna, E. (2017). *Neoscytalidium dimidiatum*: causal agent of dieback in *Ficus benjamina* L. in Mexico. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(3), 203-210. doi: <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2017.02.009>

Received: February 14, 2017/ Accepted: August 08, 2017.



Revista Chapingo  
Serie Horticultura

[www.chapingo.mx/revistas/horticultura](http://www.chapingo.mx/revistas/horticultura)

## Introduction

*Ficus* L. is a very broad genus that groups many different species together; in addition, it is native to tropical and subtropical regions (Serrato, Ibarra-Manríquez, & Oyama, 2004). Many *Ficus* species are common in different biogeographic regions, and *Ficus* is considered one of the most diverse genera with regard to its habits and life forms (Chaudhary et al., 2012). In Mexico, *Ficus benjamina* L. is mainly used as an ornamental and has been widely accepted because of its low production cost, rapid growth and dense, glossy foliage (Alanís-Flores, 2005). Like many plant species, the growth and development of *F. benjamina* is affected by several phytopathogenic fungi, where ascomycetes and their anamorphs predominate.

The fungi of the family *Botryosphaeriaceae* (Ascomycetes) infect plants such as *Acacia karroo* (South Africa), *Hylocereus polyrhizus* (Malaysia), *Eucalyptus camaldulensis* and *Populus nigra* (Iraq), *Citrus paradisi* (Israel), *Ficus* spp. (Sudan), *Manihot esculenta* (Brazil), *Vitis vinifera* (California), among many other tree and shrub plants in the world (El Atta & Aref, 2013; Hassan, Haleem, & Hassan, 2011; Jami, Slippers, Wingfield, & Gryzenhout, 2013; Machado, Pinho, Oliveira, & Pereira, 2014; Mohd, Salleh, & Zakaria, 2013; Sadowsky, Solel, & Szejnberg, 2007; Úrbez-Torres, Leavitt, Voegel, & Gubler, 2006).

Identification of species of the family *Botryosphaeriaceae* has been inconsistent and poor for many years (Slippers & Wingfield, 2007). However, with the aid of molecular tools, differences in ribosomal DNA sequences, necessary for a more reliable characterization, have been identified (Machado et al., 2014).

In 2014, during the hottest season (June-September), *F. benjamina* plants with symptoms of branch dieback were detected in private gardens and avenues in public areas in Hermosillo, Sonora, Mexico, but without knowing the cause of the organism(s) associated with the disease. Therefore, the aim of this study was to morphologically and molecularly identify the causal agent of branch dieback in *F. benjamina* plants.

## Materials and methods

### Collection and isolation

From gardens and urban areas in Hermosillo, Sonora, samples of tissue with dieback symptoms were collected from *F. benjamina* trees, disinfested with 1 % sodium hypochlorite for 1 min, rinsed three times with abundant sterile distilled water and placed on sterile blotting paper. The tissue fragments were seeded in PDA medium (Difco®) and incubated at 28 °C for three days.

For the morphological identification, tissue assemblages were made from 10-day-old cultures and

## Introducción

*Ficus* L. es un género muy amplio que agrupa numerosas especies diferentes entre sí; además, es originario de regiones tropicales y subtropicales (Serrato, Ibarra-Manríquez, & Oyama, 2004). Muchas especies de *Ficus* son comunes en regiones biogeográficas diferentes y se considera uno de los géneros más diversos respecto de sus hábitats y formas de vida (Chaudhary et al., 2012). En México, *Ficus benjamina* L. se usa principalmente como ornamental y ha sido ampliamente aceptado debido a su bajo costo de producción, crecimiento rápido y follaje denso y lustroso (Alanís-Flores, 2005). Al igual que muchas especies vegetales, el crecimiento y desarrollo de *F. benjamina* es afectado por varios hongos fitopatógenos, donde predominan los ascomicetos y sus anamorfos.

Los hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* (Ascomycetes) infectan plantas como *Acacia karroo* (Sudáfrica), *Hylocereus polyrhizus* (Malasia), *Eucalyptus camaldulensis* y *Populus nigra* (Iraq), *Citrus paradisi* (Israel), *Ficus* spp. (Sudán), *Manihot esculenta* (Brasil), *Vitis vinifera* (California), entre muchas otras plantas arbóreas y arbustivas en el mundo (El Atta & Aref, 2013; Hassan, Haleem, & Hassan, 2011; Jami, Slippers, Wingfield, & Gryzenhout, 2013; Machado, Pinho, Oliveira, & Pereira, 2014; Mohd, Salleh, & Zakaria, 2013; Sadowsky, Solel, & Szejnberg, 2007; Úrbez-Torres, Leavitt, Voegel, & Gubler, 2006).

La identificación de especies de la familia *Botryosphaeriaceae* ha sido inconsistente y pobre por muchos años (Slippers & Wingfield, 2007). No obstante, con ayuda de herramientas moleculares, se han identificado diferencias en secuencias del ADN ribosomal, necesarias para una caracterización más confiable (Machado et al., 2014).

En 2014, durante la temporada de mayor calor (junio-septiembre), se detectaron plantas de *F. benjamina* con síntomas de muerte descendente de ramas en jardines particulares y avenidas en zonas públicas en Hermosillo, Sonora, México, desconociendo la causa del o los organismos asociados con dicha enfermedad. Por ello, el presente trabajo tuvo como objetivo identificar morfológica y molecularmente al agente causal de la “muerte descendente de ramas” en plantas de *F. benjamina*.

## Materiales y métodos

### Colecta y aislamiento

De jardines y zonas urbanas de Hermosillo, Sonora, se colectaron muestras de tejido con síntomas de muerte descendente de árboles de *F. benjamina*, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1 % por 1 min, se enjuagaron tres veces con abundante agua destilada esterilizada y se colocaron en papel secante esterilizado. Los

genus and species classification was performed using the keys of Crous et al. (2006) and Phillips et al. (2013).

### Pathogenicity tests

Four isolates from *F. benjamina* plants with dieback symptoms were used. For this, five *F. benjamina* plants, of approximately one year of age, were inoculated with each of the isolates. In addition, five plants were used as the control. For the inoculation of the plants, superficial cuts were made in the bark of approximately 2 x 5 mm and 2 mm deep with a razor disinfested with alcohol. In the cut made, pieces of the PDA medium with mycelium of the fungus were placed. Similar wounds were made to the control plants, but culture medium without the fungus was placed in them. To avoid drying and contamination, wounds were covered with parafilm tape.

### Molecular identification and phylogenetic analysis

The DNA extracted from the four inoculated isolates was partially amplified with primers: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') / ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990), RPB2-5F (5'-GAY GAY MGW GAT CAY TTY-3') / fRPB2-7cR (5'-GGC CCA TWG CYT GCT TMC CC AT-3') (Liu, Whelen, & Hall, 1999) and LROR (5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC-3') / LR5 (5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3') (Vilgalys & Hester, 1990), which amplify the ITS1-5.8S-ITS2, RPB2 and 28S regions, respectively. The purified amplicons were sequenced in both directions, using the respective primer pair separately. The sequencing equipment used was ABI PRISM® 3700, Genetic-Analyser - Applied Biosystems. The sequences of two representative *N. dimidiatum* isolates, together with other sequences of the family *Botryosphaeriaceae*, were annealed using Clustal W, edited and analyzed using the Maximum Likelihood method with MEGA 7 software (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). A total of 1,345 positions were analyzed. The robustness of the nodes was examined with a bootstrap analysis with 2,000 replicates. *Aplosporella hesperidica* CBS:732.79 was used as the external group.

## Results and discussion

### Isolation and identification

*Neoscytalidium dimidiatum* was isolated with 100 % frequency from *F. benjamina* plants with symptoms of branch dieback (Figure 1A), bark peeling and cankers in the trunk stem, which resulted in the emergence of adventitious roots. *Neoscytalidium* belongs to the family *Botryosphaeriaceae*, being a recently created genus (Crous et al., 2006). The fungi of the family *Botryosphaeriaceae* are typically opportunistic pathogenic organisms, causing diseases only when the plants are stressed and with

fragmentos de tejido se sembraron en medio PDA (Difco®) e incubaron a 28 °C durante tres días.

Para la identificación morfológica se realizaron montajes de tejido de cultivos de 10 días de edad y la clasificación del género y especie se realizó con las claves de Crous et al. (2006) y Phillips et al. (2013).

### Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron cuatro aislamientos de plantas de *F. benjamina* con síntomas de muerte descendente. Para ello, se inocularon cinco plantas de *F. benjamina*, de aproximadamente un año de edad, con cada uno de los aislados. Adicionalmente, se utilizaron cinco plantas como control. Para la inoculación de las plantas, se realizaron cortes superficiales en la corteza de aproximadamente 2 x 5 mm y 2 mm de profundidad con una navaja desinfectada con alcohol. En el corte realizado se colocaron trozos del medio PDA con micelio del hongo. En las plantas control se realizaron heridas similares, pero se les colocó medio de cultivo sin el hongo. Para evitar la desecación y contaminación, se cubrieron las heridas con cinta de parafilm.

### Identificación molecular y análisis filogenético

El ADN extraído de los cuatro aislamientos inoculados se amplificó parcialmente con los iniciadores: ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') / ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990), RPB2-5F (5'-GAY GAY MGW GAT CAY TTY-3') / fRPB2-7cR (5'-GGC CCA TWG CYT GCT TMC CC AT-3') (Liu, Whelen, & Hall, 1999) y LROR (5'-ACC CGC TGA ACT TAA GC-3') / LR5 (5'-TCC TGA GGG AAA CTT CG-3') (Vilgalys & Hester, 1990), que amplifican las regiones ITS1-5.8S-ITS2, RPB2 y 28S, respectivamente. Los amplicones purificados se secuenciaron en ambas direcciones, usando el respectivo par de iniciadores por separado. El equipo de secuenciación utilizado fue ABI PRISM® 3700, Genetic-Analyser - Applied Biosystems. Las secuencias de dos aislados representativos de *N. dimidiatum*, junto con otras secuencias de la familia *Botryosphaeriaceae*, se alinearon utilizando Clustal W, editadas y analizadas con el método de máxima verosimilitud con el software MEGA 7 (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). Se analizaron un total de 1,345 posiciones. La robustez de los nodos se examinó con un análisis de *bootstrap* con 2,000 réplicas. Se utilizó a *Aplosporella hesperidica* CBS:732.79 como grupo externo.

## Resultados y discusión

### Aislamiento e identificación

Se aisló a *Neoscytalidium dimidiatum* con una frecuencia de 100 % de plantas de *F. benjamina* con síntomas de muerte descendente de ramas (Figura 1A), desprendimiento



a cosmopolitan distribution; they are also commonly associated with dieback and cankers in woody plants and shrubs (Bush, 2015). *Neoscytalidium dimidiatum* presented the following morphological features: light green to olive-green mycelium when young (three days) and gray-dark to black when old (seven to ten days), dark pycnidia in affected trunks and conidia in chain, ellipsoid and globose, with 0-2 septa at maturity of approximately 3 to 5.5 and 6 to 9.5  $\mu\text{m}$  (Figure 1B).

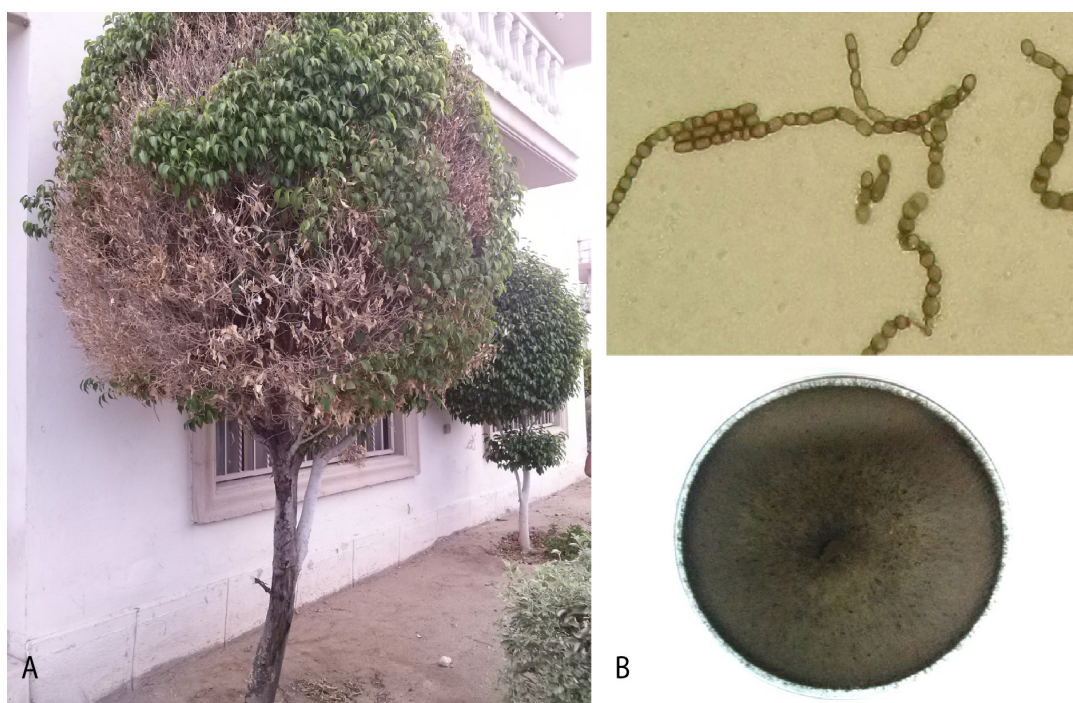
The sequences of the internal transcribed spacer region (ITS; KU141333 and KU141334), large subunit (LSU; MF508739 and MF508740) and RNA polymerase II subunit (RPB2; MF508741 and MF508742) of the DNA from the representative isolates NDFB002 and NDFB003 were deposited in the National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). These sequences were compared using the NCBI BLAST tool, showing 99 to 100 % similarity to *Neoscytalidium dimidiatum*.

#### Pathogenicity tests

The *Ficus benjamina* plants inoculated with fungal isolates showed necrosis and slight bark peeling in the inoculated area at 40 days after inoculation (dai) (Figure 2: D, E, G and H), whereas in the control plants these symptoms were not observed (Figure 2: C and F). The morphological characteristics of the isolates

de corteza y cancos en el fuste del tronco; que como consecuencia provocó la emergencia de raíces adventicias. *Neoscytalidium* pertenece a la familia *Botryosphaeriaceae*, siendo un género recientemente creado (Crous et al., 2006). Los hongos de la familia *Botryosphaeriaceae* son organismos típicamente patógenos oportunistas, causando enfermedades solo cuando las plantas están estresadas y con distribución cosmopolita; asimismo, están comúnmente asociados con muerte descendente y cancos de plantas leñosas y arbustivas (Bush, 2015). *Neoscytalidium dimidiatum* presentó las siguientes características morfológicas: micelio de color verde claro a verde-olivo cuando joven (tres días) y gris-oscuro a negro cuando viejo (siete a diez días), picnidios oscuros en troncos afectados y conidias en cadena de forma elipsoides y globosas, con 0-2 septas al madurar de aproximadamente 3 a 5.5 y 6 a 9.5  $\mu\text{m}$  (Figura 1B).

Las secuencias de la región espaciadora interna transcrita (ITS; KU141333 y KU141334), subunidad grande (LSU; MF508739 y MF508740) y ARN polimerasa subunidad II (RPB2; MF508741 y MF508742) del ADN de los aislados representativos NDFB002 y NDFB003 se depositaron en el Banco de Genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Dichas secuencias se compararon mediante la herramienta BLAST del NCBI, mostrando de 99 a 100 % de similitud con *Neoscytalidium dimidiatum*.



**Figure 1. Characteristics of *Neoscytalidium dimidiatum*. A) Dieback in *F. benjamina* plants; B) arthroconidia (above) and mycelial growth in PDA medium (below).**

**Figura 1. Características de *Neoscytalidium dimidiatum*. A) Muerte descendente en plantas de *F. benjamina*; B) artroconidias (arriba) y crecimiento micelial en medio PDA (abajo).**

obtained from the inoculated plants coincided with the inoculated isolates, confirming Koch's postulates.

Diseases caused by *Botryosphaeriaceae* spp. are greater when the affected plants are under stress conditions. Under the environmental conditions of Hermosillo, Sonora, namely extreme heat and low relative humidity, *Ficus* plants are more likely to become infected with *N. dimidiatum*. The greater predisposition of the plants to infections by species of the family *Botryosphaeriaceae* due to specific environmental conditions was reported by Hassan et al. (2011). They exposed eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) and poplar (*Populus nigra*) plants to warm (32 °C) and very warm (40 °C) temperatures and to *N. dimidiatum*, observing that extreme temperatures predisposed the plants to

### Pruebas de patogenicidad

Las plantas de *Ficus benjamina* inoculadas con los aislados fúngicos mostraron necrosis y ligero descortezamiento en la zona inoculada a los 40 días después de la inoculación (ddi) (Figura 2: D, E, G y H); mientras que en las plantas control no se observaron dichos síntomas (Figura 2: C y F). Las características morfológicas de los aislados obtenidos de las plantas inoculadas coincidieron con los aislados inoculados, cumpliéndose los postulados de Koch.

Las enfermedades ocasionadas por *Botryosphaeriaceae* spp. son mayores cuando las plantas afectadas están bajo condiciones de estrés. Bajo las condiciones ambientales de Hermosillo, Sonora, de extremo calor



**Figura 2.** Symptoms in *Ficus benjamina* at 40 days after inoculation. C) and F) control plants, without and with a cut, respectively; D) and G) necrosis induced by *N. dimidiatum* (isolated NDFB002), without and with a cut, respectively; E) and H) necrosis induced by *N. dimidiatum* (isolate NDFB003), without and with a cut, respectively.

**Figura 2.** Síntomas en *Ficus benjamina* a los 40 días después de la inoculación. C) y F) plantas control, sin y con corte, respectivamente; D) y G) necrosis inducida por *N. dimidiatum* (aislado NDFB002), sin y con corte, respectivamente; E) y H) necrosis inducida por *N. dimidiatum* (aislado NDFB003), sin y con corte, respectivamente.

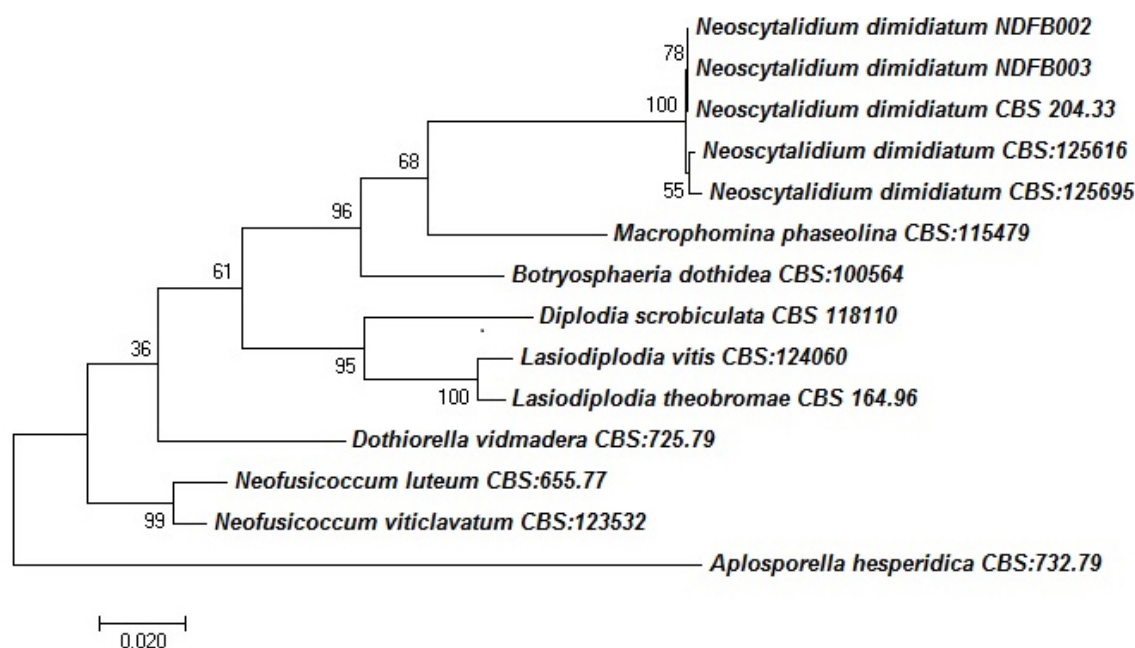


greater infection by the fungus. Similarly, Sadowsky et al. (2007) reported the effect of three temperatures (25, 32 and 40 °C) on grapefruit plants, indicating that extreme temperatures (40 °C) are a crucial factor in predisposing plants to infection by *Scytalidium lignicola*. In this regard, Jami et al. (2013) and Slippers and Wingfield (2007) note that several members of the family *Botryosphaeriaceae* are latent pathogens that live as endophytes in their asymptomatic hosts for extended periods and that cause diseases under stress conditions. In particular, *N. dimidiatum* has been reported as a pathogen of woody plants such as English walnut (*Juglans regia*), mango (*Mangifera indica*), grapevine (*Vitis vinifera* L.), *Ficus carica* and *Ficus* spp., in which it produces symptoms such as dieback, branch necrosis and cankers in the stem, as well as death of the graft union in English walnut plants in nurseries, among other symptoms (Al-Saadoon, Ameen, Hameed, Al-Badran, & Ali, 2012; Chen, Fichtner, Morgan, & Michailides, 2013; El Atta & Aref, 2013; Ray, Burgess, & Lanoiselet, 2010).

### Phylogenetic analysis

The concatenated sequences of the ITS, RPB2 and LSU regions were compared with those of fungal isolates

y humedad relativa baja, las plantas de *Ficus* tienen mayor probabilidad de infectarse con *N. dimidiatum*. La mayor predisposición de las plantas a infecciones por especies de la familia *Botryosphaeriaceae* por efecto de condiciones ambientales específicas fue reportada por Hassan et al. (2011). Ellos expusieron plantas de eucalipto (*Eucalyptus camaldulensis*) y álamo (*Populus nigra*) a temperaturas cálidas (32 °C), muy cálidas (40 °C) y a *N. dimidiatum*, observando que las temperaturas extremas predispusieron a las plantas a una mayor infección por parte del hongo. De igual forma, Sadowsky et al. (2007) reportaron el efecto de las temperaturas 25, 32 y 40 °C en plantas de pomelo, indicando que las temperaturas extremas (40 °C) son un factor crucial para predisponer a las plantas a la infección por *Scytalidium lignicola*. En este sentido, Jami et al. (2013) y Slippers y Wingfield (2007) mencionan que varios miembros de la familia *Botryosphaeriaceae* son patógenos latentes que viven como endófitos en sus hospedantes asintomáticos por periodos extensos y que causan enfermedades bajo condiciones de estrés. Particularmente, *N. dimidiatum* se ha reportado como patógeno de plantas leñosas como nogal (*Juglans regia*), mango (*Mangifera indica*), vid (*Vitis vinifera* L.), *Ficus carica* y *Ficus* spp., en las cuales produce síntomas como muerte descendente, necrosis de ramas y canchros en el tallo; así como, muerte de la unión



**Figure 3.** A phylogenetic tree of species of the family *Botryosphaeriaceae* using the Maximum Likelihood method with combined sequences of the ITS, LSU and RPB2 regions. Only bootstrap values  $\geq 60$  % are shown. The length of the branches is proportional to the genetic distances. All related sequences were taken from the CBS-KNAW culture collection database of the Westerdijk Institute in Holland.

**Figura 3.** Árbol filogenético de especies de la familia *Botryosphaeriaceae* usando el método de Máxima Verosimilitud con secuencias combinadas de la región ITS, LSU y RPB2. Solo se muestran valores de bootstrap  $\geq 60$  %. La longitud de las ramas es proporcional a las distancias genéticas. Todas las secuencias relacionadas se tomaron de la base de datos de la colección de cultivos CBS-KNAW del Instituto Westerdijk de Holanda.

from species belonging to the family *Botryosphaeriaceae*. The multilocus analysis indicated that the *N. dimidiatum* isolates (CBS: 204.33, CBS: 125616 and CBS: 125695) are grouped in the same phylogenetic branch as the fungi obtained in the present study. By contrast, the species of *Botryosphaeria*, *Macrophomina*, *Neofusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* and *Diplodia* are grouped in phylogenetically different nodes (Figure 3).

## Conclusions

Based on the morphological and molecular characteristics of the ITS, RPB2 and LSU regions, *Neoscytalidium dimidiatum* was identified as the causal agent of branch dieback and cankers in *Ficus benjamina* plants in Hermosillo, Sonora. To our knowledge, this is the first report of *Neoscytalidium dimidiatum* affecting *Ficus benjamina* plants in Mexico.

## End of English version

## References / Referencias

- Alanís-Flores, G. J. (2005). El arbolado urbano en el área metropolitana de Monterrey. *Ciencia UANL*, 8(1), 20-32. Retrieved from <http://www.isahispana.com/treecare/resources/monterrey.pdf>
- Al-Saadoon, A. H., Ameen, M. K. M., Hameed, M. A., Al-Badran, A., & Ali, Z. (2012). First report of grapevine dieback caused by *Lasiodiplodia theobromae* and *Neoscytalidium dimidiatum* in Basrah, Southern Iraq. *African Journal of Biotechnology*, 11(95), 16165-16171. doi: 10.5897/AJB12.010
- Bush, A. E. (2015). *Botryosphaeria canker and dieback of trees and shrubs in the landscape*. USA: Virginia Tech and Virginia State University. Retrieved from [https://pubs.ext.vt.edu/450/450-726/450-726\\_pdf.pdf](https://pubs.ext.vt.edu/450/450-726/450-726_pdf.pdf)
- Chaudhary, L. B., Sudhakar, J. V., Kumar, A., Bajpai, O., Tiwari, R., & Murthy, G. V. S. (2012). Synopsis of the genus *Ficus* L. (Moraceae) in India. *Taiwania*, 57(2), 193-216. Retrieved from <http://tai2.ntu.edu.tw/taiwania/pdf/tai.2012.57.193.pdf>
- Chen, S. F., Fichtner, E., Morgan, D. P., & Michailides, T. J. (2013). First report of *Lasiodiplodia citricola* and *Neoscytalidium dimidiatum* causing death of graft union of english walnut in California. *Plant Disease*, 97(7), 993. doi: 10.1094/PDIS-10-12-1000-PDN
- Crous, P. W., Slippers, B., Wingfield, M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L.,... & Groenewald J. Z. (2006). Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. *Studies in Mycology*, 55, 235-253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2104729/>
- El Atta, H. A., & Aref, I. M. (2013). Pathogenic mortality of *Ficus* spp. *International Journal of Plant, Animal and*
- del injerto en plantas de nogal en viveros, entre otros síntomas (Al-Saadoon, Ameen, Hameed, Al-Badran, & Ali, 2012; Chen, Fichtner, Morgan, & Michailides, 2013; El Atta & Aref, 2013; Ray, Burgess, & Lanoiselet, 2010).

## Análisis filogenético

Las secuencias concatenadas de las regiones ITS, RPB2 y LSU se compararon con las de aislados de hongos de especies pertenecientes a la familia *Botryosphaeriaceae*. El análisis multilocus indicó que los aislados de *N. dimidiatum* (CBS:204.33, CBS:125616 y CBS:125695) se agruparon en la misma rama filogenética que los hongos obtenidos en el presente estudio. Por el contrario, las especies de *Botryosphaeria*, *Macrophomina*, *Neofusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Diplodia* se agrupan en nodos filogenéticamente diferentes (Figura 3).

## Conclusiones

Basados en las características morfológicas y moleculares de las regiones ITS, RPB2 y LSU, se identificó a *Neoscytalidium dimidiatum* como agente causal de muerte descendente de ramas y canchros en plantas de *Ficus benjamina* en Hermosillo, Sonora. Hasta donde se sabe, este es el primer reporte donde *Neoscytalidium dimidiatum* se encuentra afectando plantas de *Ficus benjamina* en México.

## Fin de la versión en español

- Environmental Sciences*, 3(1), 204-210. Retrieved from [http://ijpaes.com/admin/php/uploads/295\\_pdf.pdf](http://ijpaes.com/admin/php/uploads/295_pdf.pdf)
- Hassan, W. A., Haleem, R. A., & Hassan, P. H. (2011). Effect of heat-stress predisposition on the development of sooty canker caused by *Neoscytalidium dimidiatum* (Penz.) Crous & Slippers. *Acta Agrobotanica*, 64(4), 207-212. doi: 10.5586/aa.2011.062
- Jami, F., Slippers, B., Wingfield, M. J., & Gryzenhout, M. (2013). Greater *Botryosphaeriaceae* diversity in healthy than associated diseased *Acacia karroo* tree tissues. *Australasian Plant Pathology*, 42(4), 421-430. doi: 10.1007/s13313-013-0209-z
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 36(7), 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Liu, Y. J., Whelen, S., & Hall, B. D. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution*, 16(12), 1799-1808. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/489f/13d5c3ea5604ba263092a691dad6d71f84a7.pdf>
- Machado, A. R., Pinho, D. B., Oliveira, S. A. S., & Pereira, O. L. (2014). New occurrences of *Botryosphaeriaceae* causing black root rot of cassava in Brazil. *Tropical*

- Plant Pathology*, 39(6), 464-470. doi: 10.1590/S1982-56762014000600008
- Mohd, M. H., Salleh, B., & Zakaria, L. (2013). Identification and molecular characterization of *Neoscytalidium dimidiatum* causing stem canker of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Journal of Phytopathology*, 161, 841-849. doi: 10.1111/jph.12146
- 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. *Studies in Mycology*, 76, 51-167. doi: 10.3114/sim0021
- Ray, J. D., Burgess, T., & Lanoiselet, V. M. (2010). First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia. *Australasian Plant Disease Notes*, 5(1), 48-50. doi: 10.1071/DN10018
- Sadowsky, A., Solel, Z., & Szejnberg, A. (2007). Effect of heat-stress predisposition on the development of *Scytalidium* wilt of "Star Ruby" grapefruit, caused by *Scytalidium lignicola*. *European Journal of Plant Pathology*, 117(2), 123-127. doi 10.1007/s10658-006-9076-6
- Serrato, A., Ibarra-Manríquez, G., & Oyama, K. (2004). Biogeography and conservation of the genus *Ficus* (Moraceae) in Mexico. *Journal of Biogeography*, 31(3), 475-485. doi: 10.1046/j.0305-0270.2003.01039.x
- Slippers, B., & Wingfield, M. J. (2007). *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal Biology Reviews*, 21(2), 90-106. doi: 10.1016/j.fbr.2007.06.002
- Úrbez-Torres, J. R., Leavitt, G. M., Voegel, T. M., & Gubler, W. D. (2006). Identification and distribution of *Botryosphaeria* spp. Associated with grapevine cankers in California. *Plant Disease*, 90(12), 1490-1503. doi: 10.1094/PD-90-1490
- Vilgalys, R., & Hester, M. (1990). Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology*, 172(8), 4238-4246. Retrieved from <http://pubmedcentralcanada.ca/pmc/articles/PMC213247/pdf/jbacter00122-0118.pdf>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, W. J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., & White, T. J. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp. 315-322). New York: Academic Press, Inc.