

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**RELACIÓN ENTRE *Colletotrichum* spp. Y LA MUERTE REGRESIVA DE RAMAS
DE CÍTRICOS**

por

**María Florencia PEREYRA FARINA
María Florencia VÁZQUEZ RAVELO**

**Trabajo final de grado
presentado como uno de los
requisitos para obtener el
título de Ingeniera Agrónoma**

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2025**

Página de aprobación

Trabajo final de grado aprobado por:

Director/a:

Ing. Agr. (MSc.) Águeda Scattolini Rimada

Tribunal:

Ing. Agr. (MSc.) Águeda Scattolini Rimada

Ing. Agr. (MSc.) Pamela Lombardo Ferreira

Ing. Agr. (MSc.) Elena Pérez Faggiani

Fecha: 4 de febrero de 2025

Estudiantes:

María Florencia Pereyra Farina

María Florencia Vázquez Ravelo

Agradecimientos:

A nuestras familias y seres queridos por todo el apoyo y sostén incondicional durante todo este proceso de aprendizaje.

A nuestra directora y tutora de tesis Águeda Scatollini, por brindar siempre su conocimiento, gran dedicación, compromiso y cariño en el acompañamiento de este trabajo.

Al grupo del Laboratorio de Fitopatología por siempre estar dispuestos a brindar su ayuda, en particular Julia, Bárbara, Victoria y Laura.

Al establecimiento de Adippe y al vivero Manuel Acosta.

Tabla de contenido

Página de aprobación	2
Agradecimientos:	3
Lista de tablas y figuras	6
Resumen	7
Summary	8
1 Introducción	9
2 Objetivos:.....	10
2.1 Objetivo general:	10
2.2 Objetivos específicos:.....	10
3 Revisión bibliográfica.....	11
3.1 Generalidades de los cítricos.....	11
3.2 Descripción botánica de <i>Citrus limon</i>	11
3.3 Importancia económica y social de la Citricultura en Uruguay	12
3.4 Características Agroclimáticas de Uruguay.....	13
3.5 Enfermedades de los cítricos.....	13
3.6 Género <i>Colletotrichum</i> spp.	14
3.7 Enfermedades de cítricos causadas por especies del género <i>Colletotrichum</i> spp. 16	
3.7.1 Antracnosis.....	16
3.7.2 Caída prematura de frutos (CPF).....	17
3.7.3 Muerte regresiva de ramas	18
4 Materiales y métodos.....	19
4.1 Recolección y procesamiento de muestras.....	19
4.2 Caracterización de los aislamientos.....	19
4.2.1 Caracterización morfológica	19
4.2.2 Identificación molecular	20
4.3 Pruebas de patogenicidad	21
4.3.1 Prueba de patogenicidad en ramas	21
4.3.2 Prueba de patogenicidad en flores	23
5 Resultados y discusión	25
5.1 Recolección y procesamiento de las muestras	25
5.2 Características de los aislamientos.....	25
5.3 Identificación molecular	29
5.4 Pruebas de patogenicidad en ramas	29

5.5	Prueba de patogenicidad en flores	32
6	Conclusiones	36
7	Bibliografía.....	37

Lista de tablas y figuras

Tabla No.	Pág.
Tabla 1 Producción total de especies de cítricos	12
Tabla 2 Caracterización de colonias de origen monospórico de 7 días de edad.....	25
Tabla 3 Caracterización morfológica de los aislamientos	27
Tabla 4 Variables analizadas V máx., r y AUDPC por aislamiento en ramas.....	30
Tabla 5 Variables analizadas V máx., r y AUDPC por aislamiento en flores	34
Figura No.	Pág.
Figura 1 Conidióforos de <i>Colletotrichum</i> spp.....	15
Figura 2 Ciclo <i>Colletotrichum acutatum</i> en cítricos.....	17
Figura 3 Secuencia de pasos para la identificación molecular	21
Figura 4 Diagrama del ensayo experimental en ramas	22
Figura 5 Diagrama del ensayo experimental en flores.....	23
Figura 6 Escala de severidad en flores de Citrus limon.....	24
Figura 7 Colonias de origen monospórico de los aislamientos	26
Figura 8 Evolución del diámetro de las colonias de origen monospórico.....	27
Figura 9 Características de las colonias y conidios de los diferentes aislamientos obtenidos	28
Figura 10 Evolución de incidencia y largo de lesión de la totalidad las ramas inoculadas	29
Figura 11 Evolución de la zona necrosada (mm) por aislamiento	30
Figura 12 Evolución de necrosis en ramas de vivero de distintos grosor.....	31
Figura 13 Ramas necrosadas del aislamiento G	32
Figura 14 Evolución de la proporción de flores con 50% o más de tejido afectado	33
Figura 15 Evolución del índice medio de severidad (IMS) en flores	34
Figura 16 Prueba de patogenicidad en flores a los 3 días de inoculadas	35
Figura 17 Esporulación en aislamiento E	35

Resumen

En las plantaciones cítricas del sur del país asociado a la poda mecánica se detectó necrosis en las ramas de forma generalizada en los cuadros en árboles en plena producción. Para determinar las posibles causas, se llevaron a cabo aislamientos a partir de ramas afectadas de limón lisbon (*Citrus limon*) y de mandarina Afourer (*Citrus reticulata* Blanco). Posteriormente los aislamientos de hongos obtenidos fueron identificados mediante técnicas morfológicas y moleculares, seleccionando representantes de los distintos tipos morfológicos observados. Se realizaron pruebas de patogenicidad en ramas y flores desprendidas de limón bajo condiciones controladas para evaluar la agresividad relativa de cada representante y poder comparar entre ellos. Además, se comparó la susceptibilidad de ramas de diferentes grosores. Se evaluó la cantidad máxima de enfermedad, la tasa de desarrollo de los síntomas y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC). A partir de los síntomas observados en las inoculaciones artificiales, se realizaron aislamientos que confirmaron la presencia de los mismos hongos inoculados. Esto permitió cumplir con los postulados de Koch y establecer una relación causal entre *Colletotrichum gloeosporioides* s.s y la necrosis de ramas en *Citrus limon*.

Palabras Clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, muerte regresiva de ramas, *Citrus limon*

Summary

In citrus plantations in the south of the country associated with mechanical pruning, branch necrosis was detected in a generalized manner in the frames of trees in full production. To determine the possible causes, isolations were made from affected branches of lemon lisbon (*Citrus limon*) and Afourer mandarin (*Citrus reticulata* Blanco). Subsequently, the fungal isolates obtained were identified by morphological and molecular techniques, selecting representatives of the different morphological types observed. Pathogenicity tests were performed on detached lemon branches and flowers under controlled conditions to evaluate the relative aggressiveness of each representative and to be able to compare between them. In addition, the susceptibility of branches of different thicknesses was compared. The maximum amount of disease, the rate of symptom development and the area under the disease progress curve (AUDPC) were evaluated. From the symptoms observed in the artificial inoculations, isolations were made that confirmed the presence of the same inoculated fungi. This allowed us to comply with Koch's postulates and establish a causal relationship between *Colletotrichum gloeosporioides* s.s and branch necrosis in *Citrus limon*.

Keywords: Colletotrichum gloeosporioides, branch dieback, Citrus limon

1 Introducción

La citricultura en Uruguay es considerada como el principal rubro frutícola exportador. El principal destino de la producción es la comercialización como fruta fresca, las exportaciones representan sólo un 37% de la producción total de 245.826 ton (Oficina de Estadísticas Agropecuarias [DIEA], 2024), debido entre otras causas a la presencia de enfermedades cuarentenarias como cancro, sarna y mancha negra. Las exportaciones de fruta fresca alcanzaron 62 millones de dólares en 2022, el 91% corresponden a rubros cítricos (mandarinas, naranjas y limones). Los mercados destino más importantes son la Unión Europea y Estados Unidos los cuales poseen estrictos estándares de calidad de la fruta (Ackermann, 2023).

Las enfermedades causadas por *Colletotrichum* spp. poseen distribución mundial y un amplio rango de hospedantes registrándose tanto en precosecha como en postcosecha (Contreras, 2006). Las especies del complejo *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* en los cítricos causan enfermedades conocidas como Antracnosis y Caída Prematura de Frutos (CPF). Estos patógenos se observan en frutos maduros, hojas, ramas y también flores.

En el caso de la CPF desde los pétalos infectados atacan al fruto en desarrollo produciendo su abscisión, lo que le da el nombre a la enfermedad. Como consecuencia, según Timmer y Tuset (2000), se reduce el rendimiento de las plantas hasta en un 50%. La enfermedad se presenta en todas las zonas cítricas húmedas desde Florida (EE. UU) hasta Uruguay (Timmer & Peres, 2015). Lima et al. (2011) afirman que ambas especies *C. acutatum* s.s. y *C. gloeosporioides* s.s. pueden causar la enfermedad Caída prematura de frutos (CPF) en cítricos. *C. gloeosporioides* se puede encontrar de forma epifita en flores y hojas (Peres et al., 2005).

2 Objetivos:

2.1 Objetivo general:

Estudiar la relación entre la presencia de *Colletotrichum* spp. en ramas necrosadas de *C.limon* y la muerte regresiva de ramas de cítricos.

2.2 Objetivos específicos:

Identificar la especie de *Colletotrichum* asociada al síntoma.

Evaluar la capacidad patogénica de la/s especies de *Colletotrichum* en ramas de limón (*Citrus limon*).

Comparar la patogenicidad de los distintos aislamientos obtenidos.

3 Revisión bibliográfica

3.1 Generalidades de los cítricos

Los cítricos tienen su origen en Asia Oriental en la zona meridional de Himalaya y China, Indochina, Tailandia, Malasia e Indonesia. Su gran adaptabilidad agroecológica se puede demostrar con el hecho de que actualmente están distribuidos entre los paralelos 44° N y 41° S (Agustí, 2020). Las regiones ubicadas en esas latitudes presentan características agroclimáticas que varían entre clima tropical, cálido-húmedo a clima templado de regiones subtropicales. Estas últimas son las que favorecen la mejor calidad de fruta (Gravina, 2014). Las condiciones climáticas de nuestro país ofrecen condiciones que permiten la obtención de frutas con excelentes atributos de color y sabor a pesar de estar en el límite de la latitud para su producción (Gravina, 2014).

Las especies de importancia económica de los cítricos pertenecen a la familia Rutaceae subfamilia Aurantioideae. El género *Citrus* posee especies de plantas de tamaño heterogéneo, forma erecta a globosa, hojas perennes y unifoliadas de tamaño variable desde grandes a pequeñas, presencia de espinas, flores solitarias o en inflorescencias con 5 pétalos blancos, 5 sépalos verdes y de 20 a 40 estambres soldados. Los frutos, hesperidios, -compuestos exteriormente por la piel albedo y flavedo, que componen el exocarpo y mesocarpo-, están formados por un ovario con 8 a 10 carpelos soldados que evolucionan a lóculos que contienen vesículas de jugo y semillas (Agustí, 2020; Gravina, 2014).

Otro género de importancia de la misma subfamilia es *Poncirus*. La especie *Poncirus trifoliata* (L.) Raf., es utilizada como pie o portainjertos debido a su resistencia a bajas temperaturas, entre otras características beneficiosas (Agustí, 2020).

3.2 Descripción botánica de *Citrus limon*

Citrus limon se caracteriza por tener hábito de crecimiento erecto, con espinas grandes, hojas lanceoladas con pecíolo sin alas, brotes jóvenes violáceos y sus frutos de forma esférica a ovalada (Agustí, 2020).

3.3 Importancia económica y social de la Citricultura en Uruguay

La citricultura es uno de los principales rubros frutícolas de Uruguay y está enfocada en la comercialización de fruta fresca en el mercado externo, representando un volumen de 89.941 toneladas, lo cual equivale al 37% de la producción total. Le sigue el mercado interno para el consumo en fresco con un 35%, mientras que sólo un 26% se destina a la industrialización (DIEA, 2024).

Se destacan dos zonas destinadas a la producción comercial de citrus: la zona Litoral Norte que comprende a los departamentos de Salto, Paysandú y Artigas con el 81% de la superficie total (10.739 ha), donde se concentra principalmente la producción de naranja, mandarinas y pomelos. La zona Sur está constituida por los departamentos de San José, Colonia, Canelones y Montevideo, que abarca 19% de la superficie (2.534 ha) y se destaca por la producción de limones (DIEA, 2024).

Según la Encuesta citrícola “Primavera 2023” (DIEA, 2024), actualmente existen alrededor de 413 explotaciones citrícolas, las cuales varían en tamaño o escala de superficie. Se señala que sólo 8 de estas explotaciones concentran la producción en grandes superficies de más de 400 hectáreas cada una, representando el 63% de la producción total. Por otro lado, las explotaciones de pequeña escala, con menos de 10 hectáreas, representan solamente el 4% de la producción.

Las especies producidas de mayor importancia son; mandarina, naranja y limón, y en menor medida el pomelo. En la Tabla 1 se observan los valores que representan cada una de ellas en cuanto a superficie, producción y rendimiento por hectárea.

Tabla 1
Producción total de especies de cítricos

<i>Especie</i>	<i>Superficie (ha)</i>	<i>Producción (ton)</i>	<i>Rendimiento (t/ha)</i>
<i>Mandarina</i>	5.614	80.288	16,5
<i>Naranja</i>	4.955	88.455	18,2
<i>Limón</i>	2.659	76.325	30,3
<i>Pomelo</i>	61	760	12,5
TOTAL	13.273	245.826	20

Nota. Elaborado en base a Encuesta citrícola “Primavera 2023” (DIEA, 2024).

La especie de citrus más productiva es el limón, siendo la variedad criolla la más importante con 1.247 ha de superficie con un rendimiento de 30 t/ha y con mayor porcentaje de superficie bajo riego. Otras variedades relevantes son Limoneira 8A y Génova (DIEA, 2024).

3.4 Características Agroclimáticas de Uruguay

La temperatura media anual en nuestro país es de 17,7°C las temperaturas medias más altas se presentan en los meses de enero y febrero y por ende las más bajas en los meses de junio y julio (Castaño et al., 2011). Las máximas temperaturas medias se aprecian en el entorno de los 28 y 30°C.

El régimen hídrico de Uruguay es de tipo isohigro, presentando distribución uniforme de las precipitaciones durante el año. La media acumulada anual está entre 1200 a 1600 mm. Los valores de humedad relativa promedio anual oscilan entre 70-78%, se registran los menores valores durante el verano 65 - 75% y los máximos durante el invierno 76 - 80% (Castaño et al., 2011).

3.5 Enfermedades de los cítricos

Considerando que la exportación es el principal destino de la producción cítrica, y que los principales compradores poseen estrictas barreras sanitarias, la protección vegetal de los cítricos es uno de los factores productivos más importantes. Por ello es necesario obtener fruta, además de sin residuos de plaguicidas, libre de Mancha negra, Sarna y Cancro, que son enfermedades cuarentenarias para los principales mercados de destino. También es deseable que la fruta no presente ningún tipo de imperfecciones en la piel (Otero et al., 2020).

La Mancha negra, también conocida como “Black spot”, es una de las enfermedades que afecta la calidad estética del fruto, en ataques severos puede ocasionar bajos rendimientos. Su agente causal es el hongo *Guignardia citricarpa*, su síntoma se expresa como lesiones superficiales grisáceas, deprimidas, con puntuaciones de coloración oscura, que corresponden a los picnidios. Estas lesiones presentan diversos aspectos según el estado de desarrollo del fruto. Puede afectar a todas las especies de citrus, pero el limonero es el más susceptible (Timmer & Tuset, 2000).

La Sarna de los cítricos es una enfermedad que afecta hojas y frutos jóvenes, deteriorando la calidad externa del fruto. El síntoma que se visualiza en el fruto son costras marrón claro, que pueden unirse formando manchones y en hojas una protuberancia de coloración clara (Danós, 1996). El agente causal asociado a esta

enfermedad que se encuentra presente en nuestro país es *Elsinoë australis* (Martínez et al., 2015).

El Cancro cítrico es una enfermedad que causa lesiones en todos los órganos en desarrollo. Su agente causal es la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. El síntoma típico son manchas de color marrón y de consistencia corchosa con un halo acuoso y clorótico (López, 2000). En el fruto el daño es cosmético, dificultando su comercialización en el mercado mundial de citrus. *Citrus limon* es la especie más susceptible, debido a sus numerosas brotaciones y presencia de espinas. Por ser una bacteria el control químico es poco efectivo, por lo cual es imprescindible una combinación de diversas medidas, control cultural, químico y legal (Scattolini, 2009).

Otra preocupación del sector citrícola nacional es el avance de la enfermedad Huang Long Bing o HLB causada por la bacteria *Candidatus liberibacter* en nuestro territorio. HLB es transmitida por el vector *Diaphorina citri* que está presente en el Norte del país. Los síntomas son manchas amarillas en hojas que conforman un moteado difuso y asimétrico (Robles et al., 2013). Los frutos de plantas enfermas se desarrollan de forma asimétrica, pequeños, con coloración verde y con semillas abortadas (Bové, 2006). Debido a la severidad de los daños que ocasiona, en nuestro país existe un programa de monitoreo del vector y de la enfermedad. Hasta el momento se aplica una estrategia de erradicación de las plantas enfermas.

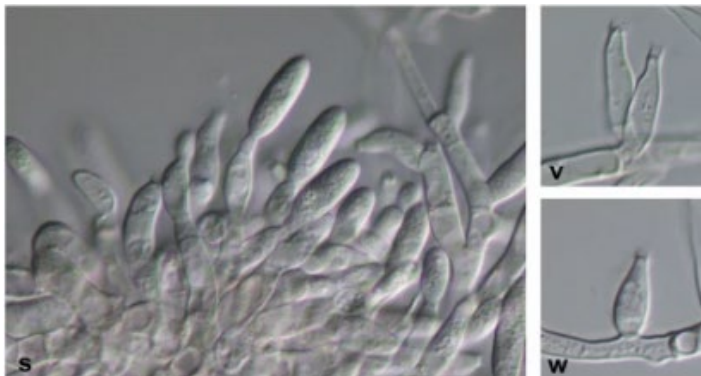
Asociada a la muerte regresiva de ramas encontrada en el predio se reportan diversos agentes causales: *Fusarium*, *Phoma*, *Diplodia*, *Sclerotinia*, *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Lasiodiplodia*, *Fusicoccum* y también *Botryosphaeria* (Graham & Menge, 2002; Reuther et al., 1978).

3.6 Género *Colletotrichum* spp.

El género *Colletotrichum* comprende diversos complejos de especies (Damm et al., 2012) pertenecientes a la clase Ascomycetes y se caracteriza por presentar acérvulos con setas o sin setas, los conidióforos, también conocidos como fiálides, tienen pared gruesa y frecuentemente pigmentada. Los conidios son hialinos generalmente unicelulares, con contenido granuloso en ocasiones y forman apresorios oscuros cuando germinan. Las masas de conidios son claras, blancas o en tonos de rosa o naranja (Von Arx, 1981).

Figura 1

Conidióforos de *Colletotrichum* spp.



Nota. Tomado de Chung et al. (2020).

Alvarado (2015) estudiando hongos de este género, asociados a cítricos, los describe como poseedores de conidios alargados translúcidos, curvos y fusiformes y acérvulos con setas. Dentro del género existen especies saprófitas y parásitas (Timmer & Tuset, 2000). Las especies más mencionadas afectando cítricos son dentro del complejo de especies de *C. gloeosporioides* a *C. gloeosporioides* s.s. y dentro de complejo de *C. acutatum* a *C. acutatum* s.s. y *C. karstii* (Camiletti et al., 2022; Lima et al., 2011).

C. acutatum s.s. en medio de cultivo desarrolla colonias de color anaranjado con masa conidial salmón, presenta micelio algodonoso blanco con anillos concéntricos (Alvarado, 2015). El rango de temperatura en el que se desarrolla varía entre 10 y 40°C siendo su óptimo alrededor de 28°C (Timmer & Tuset, 2000). Sus conidios se dispersan facilitados por el agua, de rocío o lluvia, contenidos en una masa mucilaginosa. Llegan al huésped donde germinan formando un apresorio oscuro, redondo y de color negro y penetran a través de aperturas naturales como estomas, heridas o mediante penetración directa en brotes, frutos y flores. Una vez que ingresa, el micelio crece intercelularmente produciendo muerte de tejidos (Contreras, 2006).

Por otra parte *C. gloeosporioides* s.s. en medio de cultivo desarrolla colonias blancas, con tonalidades gris oscuro, de textura algodonosa y con círculos concéntricos. Presenta acérvulos redondeados y color oscuro. Conidios alargados y con puntas redondeadas (Timmer & Tuset, 2000). El patógeno sobrevive en tejidos muertos infectados en forma latente. Cuando las condiciones son favorables se disemina por medio del agua colonizando las flores nuevas y germinando las esporas a las 12 horas (Del Rivero, 1990).

3.7 Enfermedades de cítricos causadas por especies del género *Colletotrichum* spp.

El género *Colletotrichum* asociado a cítricos puede ocasionar diversas enfermedades: Antracnosis, desarrollando síntomas en órganos debilitados de la planta, Caída prematura de frutos (CPF) que se inicia con la infección de pétalos y muerte regresiva de ramas.

3.7.1 Antracnosis

Antracnosis es un término que se refiere a enfermedades con manchas necróticas, hundidos tanto en hojas como en frutos y tallos y es causada por hongos que producen conidios en acérvulos (Agrios, 2005). Muchos cultivos tienen antracnosis, pero dicha sintomatología puede ser causada por diferentes géneros fúngicos. En cítricos se le llama antracnosis a enfermedades causadas principalmente por las especies *C. gloeosporioides* s.s. y *C. acutatum* s.s. (Waller, 1992, como se cita en Alvarado, 2015) que expresa que éstos patógenos atacan a más de una parte de la misma planta, ocasionando enfermedades separadas que pueden interactuar durante el ciclo del cultivo. En cítricos esta característica es de gran importancia ya que es un cultivo perenne y algunas especies tienen intensas brotaciones. Un órgano infectado, cuando expresa síntomas, se convierte en fuente de inóculo para otro órgano de la misma planta que puede expresar un síntoma distinto. Las mayores pérdidas económicas se observan cuando la infección se da a nivel de los pétalos provocando caída prematura de los frutos en desarrollo (Timmer & Peres, 2015).

Los síntomas causados por *C. acutatum* s.s. pueden presentarse en diversos órganos en desarrollo, provocando muerte regresiva de ramitas, manchas necróticas en hojas y caída prematura de frutos. Los más frecuentes son manchas deprimidas y secas con margen definido y puntuaciones negras en el centro que corresponden a los acérvulos. En frutos cercanos al tamaño final se manifiestan manchas oscuras y deprimidas que afectan gravemente la calidad del mismo (Timmer & Tuset, 2000).

La infección puede desarrollarse en un amplio rango de temperaturas entre 18 y 33°C acompañado de una alta humedad relativa 95 - 100%. El desarrollo del patógeno se ve favorecido por las altas temperaturas, cuando las condiciones no son favorables puede permanecer quiescente en las primeras etapas de infección. Las gotas de lluvia o rocío favorecen la dispersión y desarrollo de la infección. Por esta razón es necesario un periodo de precipitaciones y tejidos en desarrollo para que se manifieste la enfermedad (Alvarado, 2015).

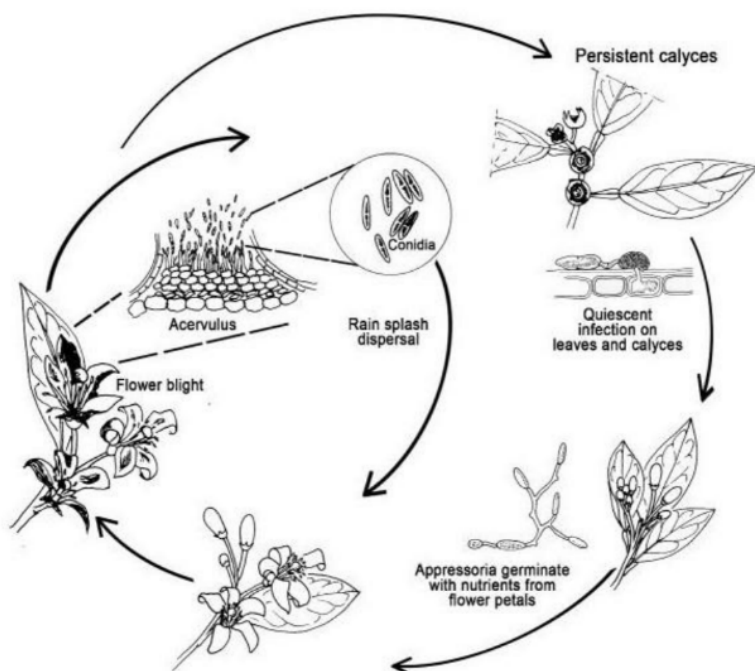
3.7.2 Caída prematura de frutos (CPF)

Esta enfermedad fue reportada en 1956 en Belice en cultivos de naranja Valencia (Fagan, 1979), es la de mayor importancia causada por el género *Colletotrichum* ya que puede ocasionar grandes pérdidas productivas. En nuestro país es una enfermedad que causa mucha preocupación en el sector productivo. Timmer y Tuset (2000) estiman que reduce hasta en un 50% la cosecha (2000). Esos mismos autores afirman que la CPF está fuertemente vinculada con *C. acutatum* s.s. aunque más recientemente también se reportó a *C. gloeosporioides* s.s. como agente causal de CPF (Lima et al., 2011; McGovern et al., 2012).

Los síntomas se visualizan como manchas acuosas a color rosa claro y a marrones en los botones florales y en flor abierta manchas que en condiciones favorables, ambiente húmedo y temperatura entre 18 - 27°C, evolucionan rápidamente a un tizón floral (Del Rivero, 1990). Los pétalos infectados quedan adheridos a los frutos lo que resulta en su abscisión prematura. La abscisión de frutos causada por la enfermedad difiere de la caída fisiológica normal de los frutos por la persistencia de cáliz y pedicelos en la planta (Fagan, 1979). Este síntoma característico es denominado comúnmente como “estrellita”.

Figura 2

Ciclo *Colletotrichum acutatum* en cítricos



Nota. Tomado de Timmer y Peres (2015).

3.7.3 Muerte regresiva de ramas

Si bien hay distintos géneros fúngicos asociados a muerte de ramas (Polanco et al., 2019), esta enfermedad está descrita como una de las causadas por *Colletotrichum* spp. asociada a la antracnosis de la lima que incluye también síntomas en flores y frutos (Timmer, 2002).

Esta enfermedad, se encuentra presente en la zona citrícola del Mediterráneo, causada por *C. gloeosporioides* s.s. y ocasionalmente por *C. karstii* confirmado por estudios realizados en el sur de Italia y Albania (Riolo et al., 2021). El síntoma de esta enfermedad es la necrosis de ramas estresadas y/o debilitadas con avance difuso y en ocasiones con presencia de puntuaciones negras. En un establecimiento productivo del sur de Uruguay fue estudiada en mandarina Afourer y limón Lisbon asociada a *C. gloeosporioides* s.s. (Pereyra et al., 2023).

Hay diversas investigaciones referidas a la muerte regresiva de ramas en cítricos que se atribuyen a diferentes géneros fúngicos. Trabajos realizados en México asocian la muerte regresiva de ramas con especies del género *Lasiodiplodia* y otros géneros de la familia Botryosphaeraceae (Polanco et al., 2019). Sin embargo, Camiletti et al. (2022), en California, describen a *C. gloeosporioides* s.s. y *C. karstii*, como agente causal de Dieback o muerte regresiva en cítricos.

4 Materiales y métodos

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República Uruguay.

4.1 Recolección y procesamiento de muestras

Las ramas con síntomas fueron obtenidas a principios de otoño de 2022 en un monte de 25 años de limón Lisbon y en otro de mandarina Afourer, de un predio de las inmediaciones de la ciudad de Pando, Canelones, Uruguay. Consistieron en ramas jóvenes con necrosis regresiva y zona de avance difuso. Se llevaron al laboratorio para posterior análisis.

En el laboratorio las muestras fueron observadas para caracterizar detalladamente el síntoma. Se tomó tejido de transición entre el síntoma y la parte sana, se sumergió 1 minuto en alcohol 70%, se enjuagó con agua destilada estéril (ADE) y secó en papel absorbente en cámara de flujo; posteriormente se sembró en placas con Potato Dextrosa Agar (PDA Oxoid®). Estas se incubaron en oscuridad a 25°C. A las 48 hs se observaron colonias fúngicas y a los cinco días se repicaron los hongos desarrollados para obtener los aislamientos.

4.2 Caracterización de los aislamientos

4.2.1 Caracterización morfológica

A partir de los aislamientos obtenidos se realizaron monospóricos mediante la siembra de una suspensión de esporas en Agar Agua (AA). A las 24 horas utilizando una lupa en cámara de flujo se repicaron a PDA los conidios germinados.

Los aislamientos monospóricos obtenidos se clasificaron por características morfológicas de colonia y se nombraron con letras de la A a la L. Se utilizó la clave de identificación de hongos de Von Arx (1981) para identificar a nivel de género. Para su almacenamiento se colocaron trozos de papel secante estéril en la placa de cada aislamiento. Una vez colonizados por el hongo, se colocaron en sobres de papel estériles, se secaron en sílica gel y se ingresaron a la micoteca del Laboratorio de Fitopatología.

En cada aislamiento se evaluó la velocidad de crecimiento de colonia, dimensiones de conidios e intensidad de esporulación. Para esto los aislados se incubaron en oscuridad a 25°C. La velocidad de crecimiento se obtuvo midiendo periódicamente el diámetro de la colonia promediando la medida en dos ejes

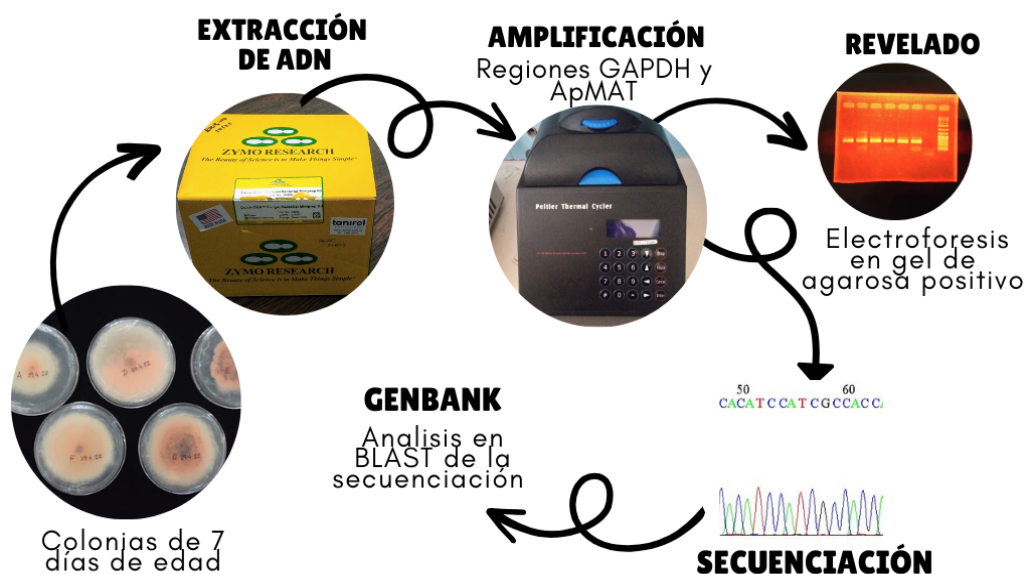
perpendiculares en mm/día. A partir de una suspensión de esporas se estudió la forma de las mismas con un microscopio Olympus CX23 con aumento 40X; el tamaño se determinó con un promedio de 10 mediciones, utilizando Dino Eye Digital Piece Camera AM-4023X y el software Dinocapture 2.0; la intensidad de esporulación expresada en conidios/ml se calculó utilizando una cámara de Neubauer a partir de colonias con 7 días de edad.

4.2.2 Identificación molecular

Para realizar una identificación a nivel de especie, se extrajo ADN de un aislamiento representativo de cada tipo de morfología de colonia con 7 días de crecimiento utilizando kit comercial ADN Quick - DNA™ Fungal/Bacterial Miniprep kit (Zymo Research, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante; se amplificó la región del gen que codifica la enzima gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) con los cebadores GDR y GDF y la región intergénica ApMat con los cebadores CgDL_F6/CgMAT1_F2 y se utilizó el programa de amplificación para ambas regiones sugerido por Moreira et al. (2021). Se confirmó la amplificación con una electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. Los productos de PCR se secuenciaron en MACROGEN Inc., Seoul, Korea y las secuencias obtenidas se analizaron con el BLAST en el GenBank para confirmar el género e identificar la especie del patógeno.

Figura 3

Secuencia de pasos para la identificación molecular



4.3 Pruebas de patogenicidad

4.3.1 Prueba de patogenicidad en ramas

Para realizar las pruebas de patogenicidad se utilizaron colonias de 7 días de edad y ramas de *Citrus limon* tipo Lisbon de árboles adultos y de plantas jóvenes de vivero clasificadas por grosor. Al mismo tiempo que se aplicó uno de los postulados de Koch se comparó la agresividad entre los aislamientos de los tipos morfológicos encontrados.

Las inoculaciones en las ramas se realizaron colocando un cilindro de agar de 5 mm de diámetro del margen de la colonia de cada aislamiento en una incisión oblicua en la zona de entrenudos de las ramas desinfectadas (alcohol 70%) y sellando con film de polietileno. Para las ramas testigo se colocó un cilindro de PDA aséptico. Las ramas se enterraron en arena húmeda esterilizada en recipientes plásticos y se los cubrió para generar una cámara húmeda. Para cada parcela se inocularon 10 ramas. Se regaron periódicamente con agua destilada para mantener la humedad y a una temperatura entre 25-28°C óptima para el desarrollo del patógeno (Timmer & Tuset, 2000).

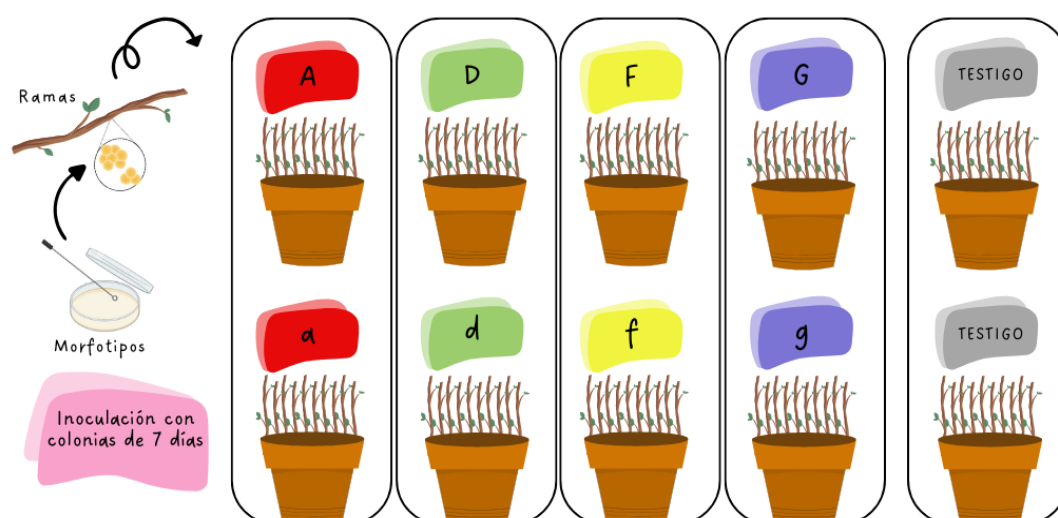
Para ajustar la metodología, se inocularon ramas jóvenes de 15 cm de longitud de un monte adulto con cilindros de agar del borde de la colonia del aislamiento G y cilindros con medio de PDA estéril para las ramas testigo. Se obtuvieron resultados a los 11 días.

El ensayo 1 se realizó inoculando ramas vigorosas de 30 cm obtenidas de podas de vivero con los aislamientos A, D, F y G y con cilindros de medio PDA para tratamiento testigo. Cada aislamiento fue inoculado en 10 ramas gruesas (> 5mm de diámetro) y en 10 ramas finas (< 5mm diámetro) (Figura 4). Se realizó una evaluación periódica durante 25 días para determinar la aparición de síntomas y la producción de esporas.

El ensayo 2 consistió en repetir la metodología del anteriormente propuesto inoculando ramas vigorosas de 30 cm de un monte adulto con los aislamientos A, D, E, F y G y se observó la severidad de la necrosis a los 30 días.

El diseño experimental fue completamente al azar (DCA) con 2 factores: grosor de ramas y aislamientos, con 10 repeticiones por parcela. Siendo la unidad experimental cada una de las ramas inoculadas.

Figura 4
Diagrama del ensayo experimental en ramas



Nota. Las letras A, D, F y G indican inoculación en ramas gruesas y letras a, d, f y g ramas finas.

Las evaluaciones consistieron en medir el avance de la lesión longitudinalmente en mm/día y registrar la presencia de esporulación. Las variables analizadas fueron el máximo de necrosis alcanzada, la tasa de desarrollo de esta (r) y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (AUDPC).

De las ramas que expresaron síntomas se realizaron los re aislamientos, se compararon las características de las colonias desarrolladas con las colonias de origen siguiendo así los postulados de Koch.

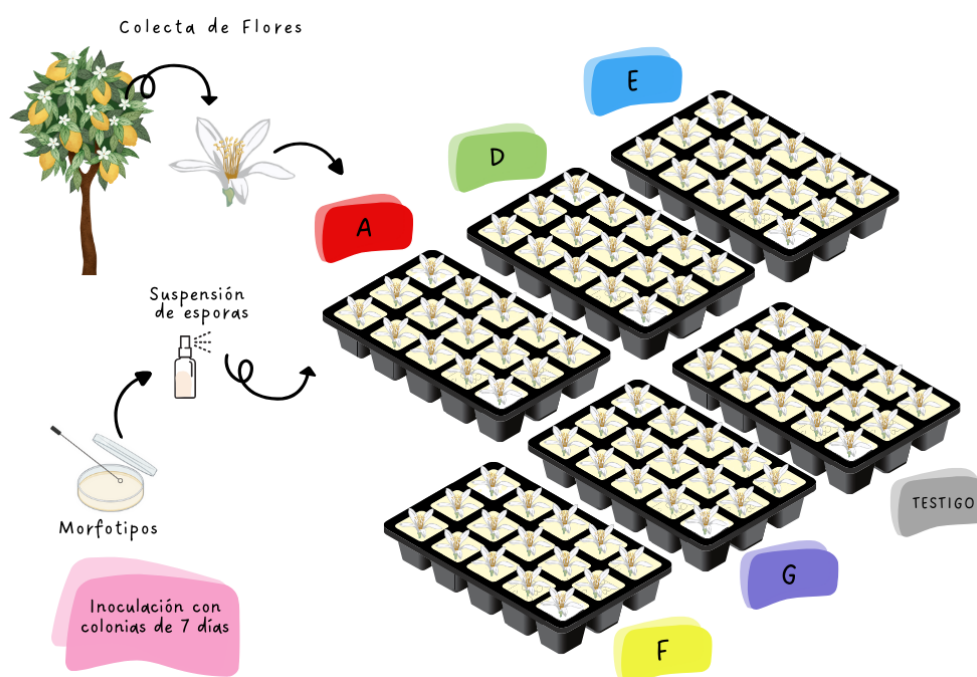
4.3.2 Prueba de patogenicidad en flores

Se recolectaron flores de *Citrus limon* en anthesis de aspecto sano e inmediatamente después de su recolección a campo se desinfectaron (alcohol 70%), se asperjaron con suspensión de esporas. Esta se realizó agregando 10 ml de ADE a colonias de 7 días de edad desprendiendo las esporas frotando con un ansa de Drigalsky. Se volcó la suspensión a un vaso de bohemia y se midió la concentración de esporas utilizando la cámara de Neubauer (French & Hebert, 1980). Se ajustó la concentración de esporas a 1×10^6 (Ruiz et al., 2014) utilizando la fórmula $C_i \cdot V_i = C_f \cdot V_f$

Para instalar el ensayo se utilizaron almacigueras de 15 celdas para cada tratamiento (aislamiento representante de cada morfotipo). En cada celda se colocó un algodón humedecido sobre el que se ubicaron flores; éstas se inocularon asperjándolas hasta punto de goteo con la suspensión de esporas de los distintos tratamientos y con ADE en el tratamiento testigo. Se las cubrió con bolsas de nylon para generar una cámara húmeda (Figura 5).

Figura 5

Diagrama del ensayo experimental en flores



Las evaluaciones consistieron en la cuantificación de la incidencia de síntomas como proporción de flores afectadas y la severidad utilizando una escala de 5 niveles basada en la propuesta por Hernández (2016) (Figura 6). Se registró la expresión de signo rosa salmón.

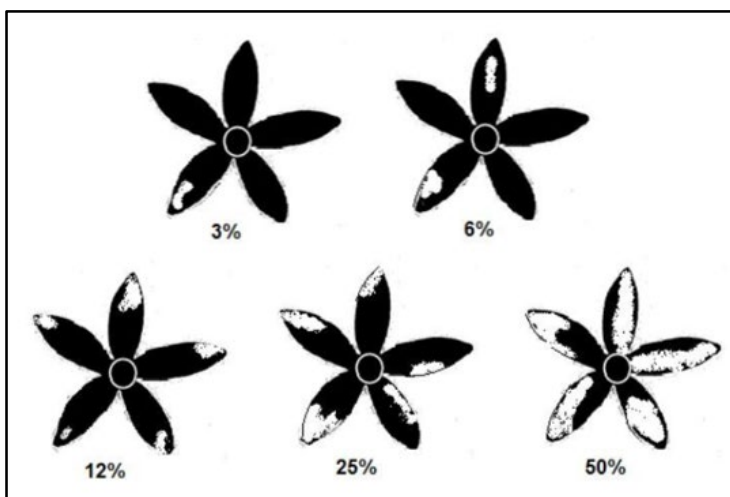
Con los datos obtenidos se calculó el Índice medio de severidad (IMS) según la siguiente fórmula:

$$IMS = \frac{(0 * N^0 + 1 * N^1 + 2 * N^2 + 3 * N^3 + 4 * N^4 + 5 * N^5)}{N^0 + N^1 + N^2 + N^3 + N^4 + N^5}$$

Donde N°0 es el número de flores sin síntomas; N°1 es el número de flores con severidad de índice de clase 3%; N°2 es el número de flores con severidad de índice de clase 6%; N°3 es el número de flores con severidad de índice de clase 12%; N°4 es el número de flores con severidad de índice de clase 25%; N°5 es el número de flores con severidad de índice de clase 50%. 0, 1, 2, 3, 4, 5 son los niveles de severidad correspondientes a 0%, 3%, 6%, 12%, 25%, 50% respectivamente. Se realizó la evolución de IMS por cada tratamiento A, D, E, F y G, y se calculó AUDPC.

Figura 6

Escala de severidad en flores de Citrus limon



Nota. Adaptado de Hernández (2016).

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha \leq 0,05$), utilizado el software R Studio.

5 Resultados y discusión

5.1 Recolección y procesamiento de las muestras

Se obtuvieron 12 aislamientos fúngicos con características morfológicas del tipo de *Colletotrichum spp.* a partir de ramas de limón (7 aislamientos) y mandarina Afourer (5 aislamientos). Estos presentaron 7 tipos morfológicos de acuerdo a las características de su desarrollo en medio PDA.

5.2 Características de los aislamientos

En los cultivos monospóricos realizados las colonias presentaron crecimiento radial, color salmón con borde blanquecino en cara inferior y en cara superior color blanco grisáceo y textura algodonosa como se describe en la bibliografía (Contreras, 2006; Orozco, 2006). Algunos presentaron círculos concéntricos (Allende-Molar et al., 2019; Alvarado, 2015) (Figura 7). Las estructuras reproductivas desarrolladas en las colonias corresponden al género *Colletotrichum*, que en ocasiones presentaron puntuaciones negras que corresponden a fiálides de tonalidades oscuras (Von Arx, 1981). En los aislamientos E y G se observaron más fiálides oscuras, que en el resto de los aislamientos; el F no presentó estas estructuras mientras que el A y el D, las presentaron en menor cantidad (Tabla 2).

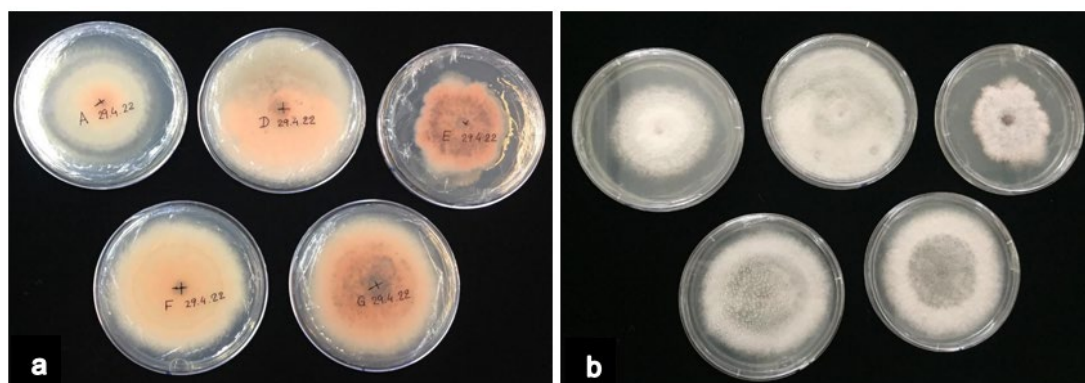
Tabla 2

Caracterización de colonias de origen monospórico de 7 días de edad

Morfotipos	Origen	Cara inferior	Cara superior	Textura	Puntuaciones oscuras
A	Limón	Salmón y blanco	Blanco	Algodonosa	Escasas
D	Limón	Salmón y blanco	Blanco y gris	Algodonosa	Escasas
E	Limón	Salmón y rosa	Blanco y salmón	Algodonosa	Abundantes
F	Mandarina	Salmón y gris	Blanco y gris	Algodonosa	Ausentes
G	Mandarina	Salmón y blanco	Blanco y gris	Algodonosa	Abundantes

Figura 7

Colonias de origen monospórico de los aislamientos

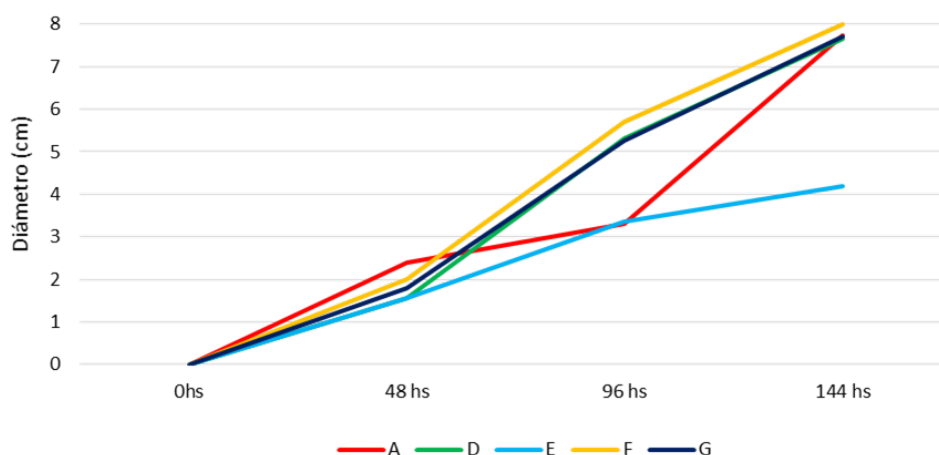


Nota. Cara inferior (a) y cara superior (b), de izquierda a derecha A, D, E, inferior F y G.

Las colonias presentaron un rápido crecimiento en medio PDA y una tasa de crecimiento de 19,3 mm/día, mayor que lo reportado por otros autores para *C. gloeosporioides* s.s. (McGovern et al., 2012; Orozco, 2006; Riolo et al., 2021). La tasa de crecimiento de los aislamientos F, G y D fueron de 22,4 mm/día, 21 mm/día y 20,7 mm/día respectivamente y homogénea durante el período de evaluación; el aislamiento A presentó una tasa de crecimiento fluctuante durante el mismo período (Figura 8). El aislamiento E presentó la menor tasa con un valor de 13 mm/día logrando un diámetro final de 42 mm, lo que fue una limitante para incluirlo en prueba de patogenicidad en ramas (Tabla 3).

Figura 8

Evolución del diámetro de las colonias de origen monospórico



Respecto al tamaño de conidios los aislamientos A y D presentaron un largo de conidios mayor $18,2 \mu$ mientras que E, F y G presentaron un largo promedio de $17,5 \mu$ (Tabla 3 y Figura 9). En el ancho los valores estuvieron entre $5,3$ y $5,7 \mu$ no presentando tendencias que permitan diferenciarlos. El aislamiento E no solo fue el de más lento crecimiento, sino que también presentó los valores mínimos de largo y ancho de conidios. Las dimensiones de los conidios caracterizados coincidieron con las dimensiones obtenidas por Alvarado (2015) y se encuentran dentro del rango de dimensiones características de *Colletotrichum gloeosporioides* descrito por Von Arx (1981) $10-21 \times 4-6 \mu$ largo y ancho respectivamente. La forma de los conidios alargados con extremos redondeados (Figura 9) (Timmer & Tuset, 2000).

Tabla 3

Caracterización morfológica de los aislamientos

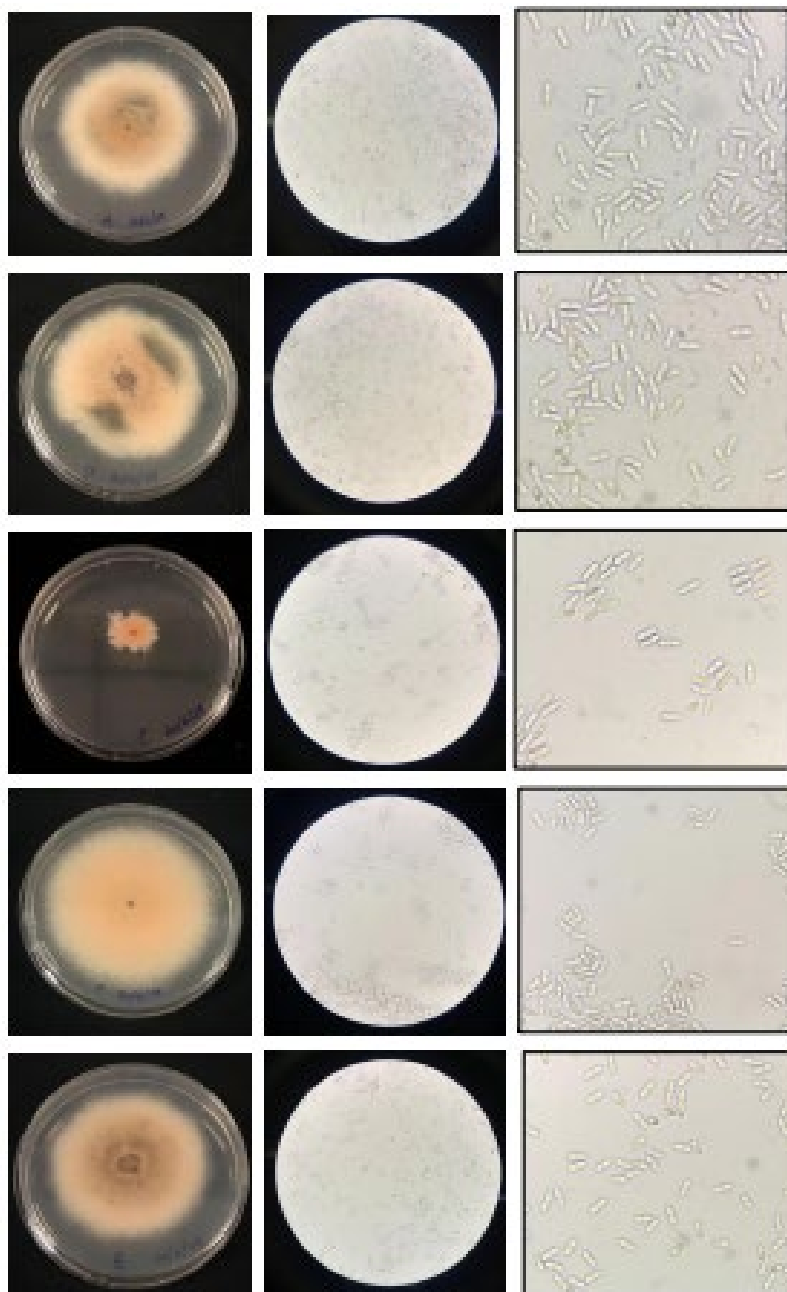
Tipos morfológicos	Dimensiones de conidios		Intensidad de esporulación (conidios/ml)	Tasa de crecimiento (mm/día)
	largo (μ m)	ancho (μ m)		
A	18,2	5,46	88,3	19,2
D	18,2	5,67	82,0	20,7
E	17,3	5,33	25,8	13,0
F	17,7	5,57	3,75	22,4
G	17,3	5,49	72,5	21,0
$\bar{x}$	17,7	5,5	54,5	19,3
DE	0,5	0,1	37,5	3,7
CV	2,5	2,3	68,8	19,1

Los aislamientos A, D y G presentaron una intensidad de esporulación de 88,3 conidios/ml, 82 conidios/ml y 72,5 conidios/ml respectivamente. El aislamiento E presentó un valor intermedio de 25,8 conidios/ml, además de haber mostrado el menor

crecimiento in vitro. El aislamiento F presentó la intensidad de esporulación más baja con 3,75 conidios/ml (Tabla 3).

Figura 9

Características de las colonias y conidios de los diferentes aislamientos obtenidos



Nota. Colonias de 7 días de edad, de superior a inferior: aislamientos A, D, E, F y G y sus respectivos conidios en microscopio Olympus cx23 a 40X.

5.3 Identificación molecular

Según el producto de PCR de las regiones génicas GAPDH y ApMat secuenciadas los 5 aislamientos tipo A, D, E, F y G con los que se trabajó, corresponden en su totalidad a *Colletotrichum gloeosporioides* s.s. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en las investigaciones de Riolo et al. (2021) y Camilleti et al. (2022).

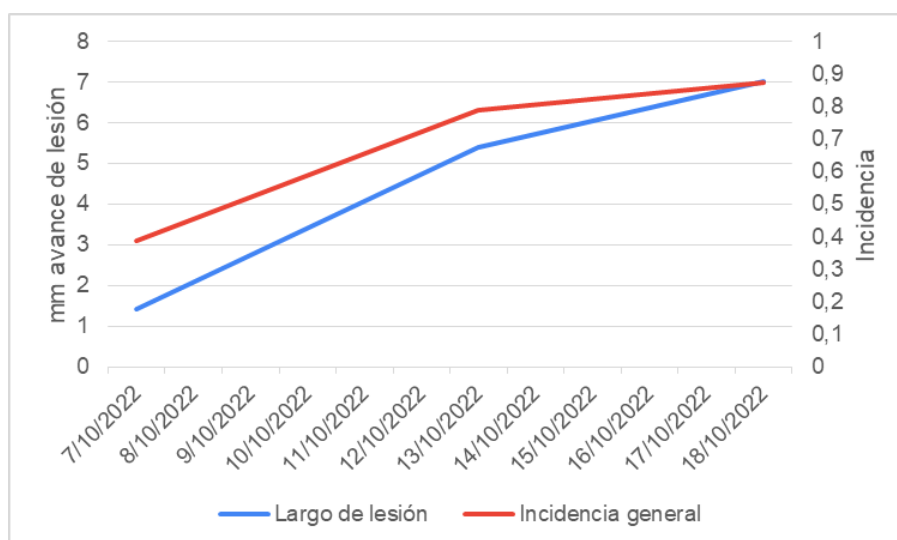
Los aislamientos de *C.gloeosporioides* produjeron necrosis tanto en ramas como en flores, aunque la mayoría de la bibliografía de enfermedades de cítricos atribuyen la necrosis de flores a *C. acutatum* (Orozco, 2006; Timmer et al., 1998). En este experimento el *C.gloeosporioides* causó necrosis en flor, coincidiendo con los resultados obtenidos por P. Mondino (comunicación personal, 2024).

5.4 Pruebas de patogenicidad en ramas

La incidencia máxima promedio obtenida fue de 0,9 y el largo máximo de lesión promedio de 7 mm (Figura 10) en las condiciones de este experimento e independientemente de los tratamientos (ensayo 1). Los aislamientos probados dieron distintos grados de incidencia y largo de lesión (Figura 11).

Figura 10

Evolución de incidencia y largo de lesión de la totalidad las ramas inoculadas



El tratamiento G fue el que manifestó mayor largo de lesión de síntomas (12,2 mm) superando significativamente a los tratamientos D, F y A que no mostraron diferencias significativas entre sí (Figura 11). Los mismos desarrollaron una necrosis de 6,5 mm, 4,85 mm y 4,5 mm respectivamente. Las ramas testigo cicatrizaron la herida de inoculación y no presentaron necrosis. Riolo et al. (2021) en pruebas de patogenicidad en ramas de cítricos de diversas edades inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides* obtuvieron lesiones más severas (longitud media de la lesión 24mm). Estos autores

asocian la mayor cantidad de enfermedad al estrés provocado por la exposición de los árboles inoculados a vientos fuertes, lo que podría favorecer la entrada del hongo.

Solo los tratamientos G, A y D desarrollaron el signo característico color salmón (Allende-Molar et al., 2019) en la zona inoculada. El tratamiento G presentó 65% de ramas con signo seguido por el A con 25% y el D con 15% de ramas con signo. El F no presentó signo salmón en ninguna de las ramas inoculadas.

Figura 11
Evolución de la zona necrosada (mm) por aislamiento

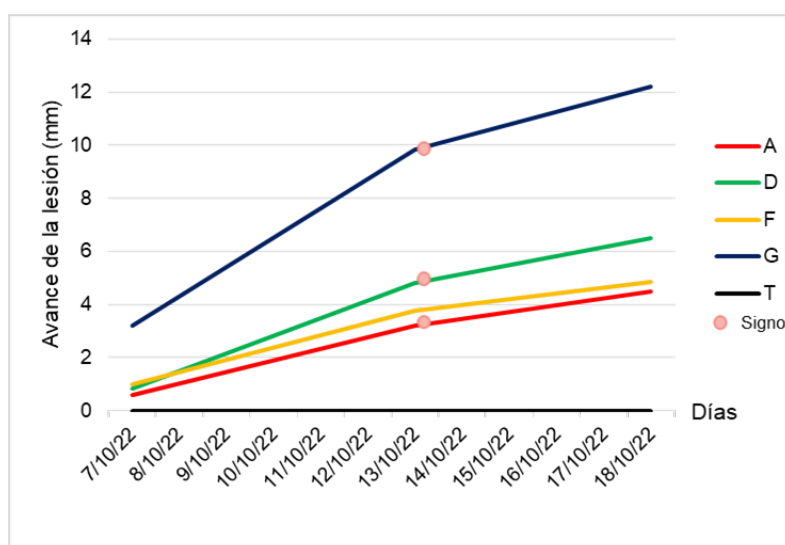


Tabla 4
Variables analizadas V máx., r y AUDPC por aislamiento en ramas

Aislamientos	Valor máx		r	AUDPC	
A	4,5	b	0,25	32,75	b
D	6,5	b	0,36	48,18	c
F	4,85	b	0,27	39,25	bc
G	12,2	c	0,68	105,48	d
T	0	a	0,00	0,00	a

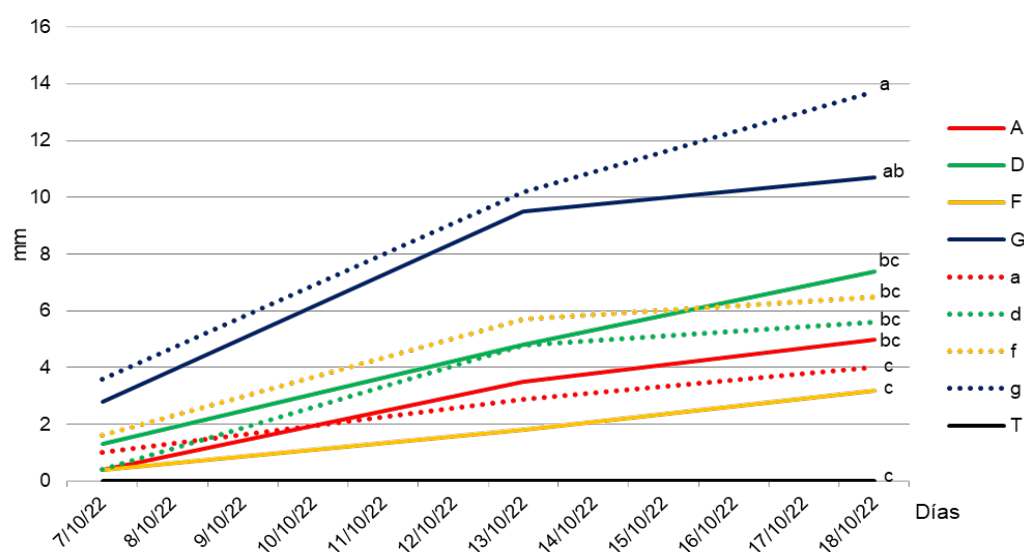
Nota. Las letras indican diferencias significativas por test de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). V max. es el valor máximo de necrosis, r es la tasa de desarrollo de la enfermedad y AUDPC es el área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad.

La mayor tasa de desarrollo de la enfermedad (r) fue la del aislamiento G con un valor de 0,68, seguido por el aislamiento D con un 0,36. Los que presentaron menores tasas de desarrollo de la enfermedad fueron los aislamientos F y A con valores de 0,27 y 0,25 respectivamente (Tabla 4).

Con respecto al grosor de las ramas se observó que los tratamientos G y F presentaron mayor avance de necrosis en las ramas finas que en las ramas gruesas al igual que lo que se observó en el ajuste metodológico. Por el contrario, en los tratamientos D y A la necrosis fue mayor en las ramas gruesas (Figura 12). En la comparación de necrosis en ramas finas y gruesas sólo el tratamiento F presentó diferencias significativas. Por lo tanto, no se puede afirmar que las ramas de menor grosor son más susceptibles a la necrosis por *Colletotrichum* spp.

Figura 12

Evolución de necrosis en ramas de vivero de distintos grosor



Nota. Letras mayúsculas indican inoculaciones en ramas gruesas y letras minúsculas inoculaciones en ramas finas con los aislamientos A, D, F y G.

El aislamiento G presentó mayor avance de la lesión necrótica en ramas finas alcanzando un máximo de 14 mm y en las gruesas 10,7 mm al igual que el aislamiento F que presentó 6,5 mm de lesión de ramas finas y 3,2 mm en las gruesas. Contrariamente el D presentó una necrosis mayor en ramas gruesas 7,4 mm que en las de menor grosor 5,6 mm. Por último, el A mostró un avance máximo de lesión similar entre ramas finas y gruesas de 4 mm y 5 mm respectivamente. Por lo tanto, los aislamientos G y F fueron más agresivos en ramas de menor grosor, al contrario que D y A que fueron más agresivos en ramas gruesas. Las diferencias en agresividad entre los aislamientos de *C. gloeosporioides* son similares con los resultados de Campo-Arana et al. (2015) en otros frutales comerciales.

Por otra parte, en el ajuste metodológico realizado en ramas poco vigorosas de árboles adultos, las de menor diámetro sin lignificar también presentaron mayor severidad de necrosis que las ramas de mayor diámetro, aunque estas últimas mostraron mayor esporulación.

Figura 13

Ramas necrosadas del aislamiento G



En los cortes en bisel se observó que las ramas inoculadas con el aislamiento G presentaron avance de necrosis en profundidad color marrón claro en contraste con los tratamientos A, D y F que no lo presentaron. De los re-aislamientos se confirmó que las colonias corresponden al hongo inoculado: *Colletotrichum gloeosporioides* cumpliendo los postulados de Koch.

Cuando se repitió el ensayo con los 5 aislamientos (ensayo 2) no se observó necrosis en ninguno de los grupos de ramas inoculadas, ni en el tratamiento testigo, lo que no permite confirmar los resultados obtenidos previamente. Probablemente se deba a la capacidad de este hongo de producir infecciones latentes cuando el huésped no está susceptible (Camiletti et al., 2022).

5.5 Prueba de patogenicidad en flores

Cuando las flores comenzaron a dar síntomas rápidamente llegaron todos los tratamientos al 100% de incidencia, pero no con la misma severidad por lo que se analizó el % de flores con necrosis de 50% o más considerándolas como % de flores ya totalmente necrosadas.

Con esa aclaración, se acuñó a los efectos de este trabajo el término incidencia de flores muertas. En los resultados se constató que los tratamientos G, D, F y E al final del ensayo presentaron una incidencia de 1, mientras que el A y el testigo presentaron una incidencia de 0,7 y 0,6 respectivamente (Figura 14). La tasa de desarrollo de la enfermedad (r) presentada por G, D, F y E fueron iguales entre sí y mayor que el tratamiento A y Testigo. En el tratamiento Testigo las necrosis estuvieron asociadas a *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. y *Cladosporium* spp., que también se registraron en los otros tratamientos. Otros autores también detectaron presencia conjunta de diversos hongos con *C. gloeosporioides* s.s. en flores (Arias Rivas et al., 2006; Fagan, 1979) (Figura 15).

Figura 14

Evolución de la proporción de flores con 50% o más de tejido afectado

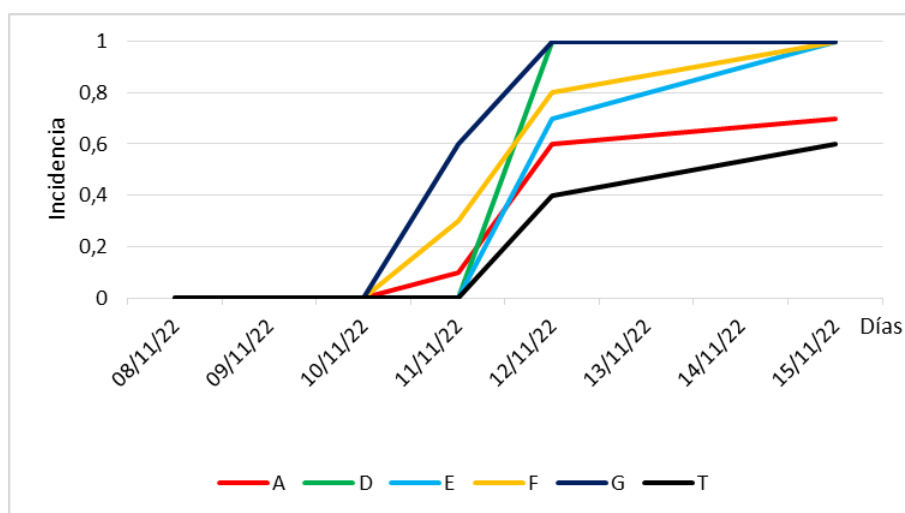
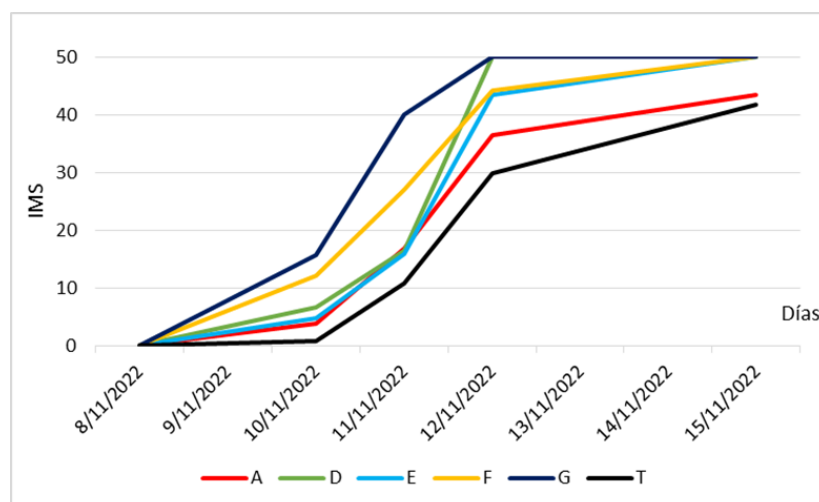


Figura 15*Evolución del índice medio de severidad (IMS) en flores***Tabla 5***Variables analizadas V máx., r y AUDPC por aislamiento en flores*

15-nov	IMSmáx	r	AUDPC	
A	1,66	6,19	158,2	b
D	8,33	7,14	196,9	bc
E	8,33	7,14	181,6	b
F	8,33	7,14	200,2	c
G	8,33	7,14	228,2	d
T	0	5,9	133,8	a

12-nov	IMSmáx	r	AUDPC	
A	6,66	9,13	38,4	ab
D	20,13	12,5	46,9	bc
E	13,46	10,83	41,6	ab
F	14,26	11,03	59,1	c
G	20,13	12,5	78,2	d
T	0	7,47	26,5	a

Nota. Las letras indican diferencias significativas por test de Tukey ($\alpha \leq 0.05$). V max. es el Valor máximo de necrosis, r es la tasa de desarrollo de la enfermedad y AUDPC es el área bajo la curva de desarrollo de la enfermedad).

La mayor necrosis observada en el tratamiento G probablemente se deba a la acción conjunta de éste, -que fue el más agresivo en ramas- con los otros hongos detectados, que fueron más abundantes que en los otros tratamientos. Se realizó una corrección de IMSmáx restando el IMSmáx del testigo al IMSmáx de cada tratamiento. Resultando que el tratamiento G siguió mostrando el valor más alto de IMS y AUDPC con valores de 20,13 y 78,2 respectivamente en la penúltima evaluación. Por el contrario, el tratamiento A fue el que presentó menor valor de IMS y AUDPC en la

penúltima evaluación con valores de 6,66 y 38,4 respectivamente y fue el único que se diferenció en la última evaluación (Tabla 5).

Las flores inoculadas con el aislamiento E fueron las únicas que expresaron el signo color salmón de *Colletotrichum gloeosporioides* s.s. sobre el tejido colonizado (Figura 17). Este aislamiento presentó la mínima tasa de crecimiento y baja intensidad de esporulación in vitro. Esto puede estar indicando mayor capacidad competitiva frente a los otros hongos que se desarrollaron y también su mayor carácter parasítico que saprofítico. Por otro lado, su desempeño in vitro podría estar explicado por la presencia de algún virus micoparásito dado que éstos pueden afectar el desarrollo vegetativo, reproductivo y el comportamiento patogénico (Casas et al., 2023).

Figura 16

Prueba de patogenicidad en flores a los 3 días de inoculadas

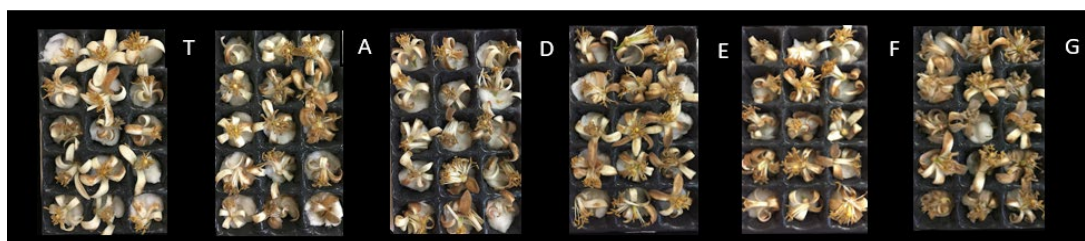


Figura 17

Esporulación en aislamiento E



6 Conclusiones

Los resultados obtenidos en las condiciones de este experimento permitirían afirmar que *Colletotrichum gloeosporioides* s.s. podría causar necrosis regresiva de ramas al haberse cumplido con los postulados de Koch.

También se podría asociar *Colletotrichum gloeosporioides* s.s. a la necrosis en flores de limón tipo Lisbon.

Existe una tendencia a que las ramas de menor grosor y estresadas se comporten como más susceptibles al ataque por *Colletotrichum gloeosporioides* s. s.

Los *C. gloeosporioides* s.s. analizados demostraron diferencias entre sí: el G fue el más agresivo y el A fue el menos agresivo tanto en prueba de patogenicidad en ramas como en flores.

7 Bibliografía

- Ackermann, M. (2023). Fruticultura: Situación y perspectivas de la citricultura y los frutales de hoja caduca. En *Anuario OPYPA 2023* (pp. 2-32). MGAP.
<https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuarioopypa2023/CP/12/CP12web/C12Fruticulturaycitricultura.pdf>
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (5th ed.). Elsevier.
- Agustí, M. (2020). *Citricultura* (3^a ed.). Mundi-Prensa.
- Allende-Molar, R., Alarcón-Pulido, S., Hernández-Sánchez, M., González-Cárdenas, J., & Elorza-Martínez, P. (2019). Morphological characterization of *Colletotrichum* isolates associated to citrus anthracnose in Tuxpan, Veracruz. *Revista Biológico Agropecuaria Tuxpan*, 7(2), 53-60.
<https://doi.org/10.47808/revistabioagro.v7i2.29>
- Alvarado, C. (2015). *Caracterización morfológica y molecular de Colletotrichum spp. asociado al complejo de la antracnosis de los cítricos en México* [Tesis de maestría, Colegio de Postgraduados]. Colpos digital.
http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/10521/2614/Alvarado_Utrera_C_MC_Fisiologia_Vegetal_2015.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Arias Rivas, B., Yáñez, V., Carrizales, L., & Sánchez, M. (2006). Hongos asociados a la caída prematura de frutos en lima persa (*Citrus latifolia* Tan.) y evaluación de su control químico. *Bioagro*, 18(1), 31-39.
https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612006000100004
- Bové, J. M. (2006). Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. *Journal of Plant Pathology*, 88(1), 7-37.
<https://www.jstor.org/stable/41998278>
- Camiletti, B., Lichtemberg, P., Paredes, J., Carraro, T., Velascos, J., & Michailides, T. J. (2022). Characterization of *Colletotrichum* isolates causing *Colletotrichum* dieback of citrus in California. *Phytopathology*, 112(7), 1454-1466.
<https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-21-0434-R>
- Campo-Arana, R. O., Escobar-López, F. M., & Segura-Cepeda, L. E. (2015). Patogenicidad de cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aisladas en distintos

órganos de la planta de maracuyá amarillo (*Pasiflora edulis* F. *flavicara* O. Deg). *Fitopatología Colombiana*, 39(2), 41-44.

https://www.researchgate.net/profile/Rodrigo-Campo-Arana/publication/309735681_PATOGENICIDAD_DE_CEPAS_DE_Colletotrichum_gloeosporioides_AISLADAS_EN_DISTINTOS_ORGANOS_DE_LA_PLANTA_DE_MARACUYA_AMARILLO_Pasiflora_edulis_F_flavicara_O_Deg/links/5820c2f608ae12715afbcfe0/PATOGENICIDAD-DE-CEPAS-DE-Colletotrichum-gloeosporioides-AISLADAS-EN-DISTINTOS-ORGANOS-DE-LA-PLANTA-DE-MARACUYA-AMARILLO-Pasiflora-edulis-F-flavicara-O-Deg.pdf

Casas, L., Azevedo, J., Almeida, L., Costa-Neto, P., Bianco, R., & Pereira, J. (2023). Mycoviruses infecting *Colletotrichum* spp.: A comprehensive review. *Brazilian Journal of Biology*, 83, Artículo e248975. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.248975>

Castaño, J., Giménez, A., Ceron, M., Furest, J., & Aunchayna, R. (2011). *Caracterización agroclimática del Uruguay 1980-2009*. INIA. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2538/1/18429021211104157.pdf>

Chung, P., Wu, H., Wang, Y., Ariyawansa, H., Hu, H., Hung, T., & Chung, C. (2020). Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species: *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. *Scientific Reports*, 10(1), Artículo e14664. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70878-2>

Contreras, C. (2006). *Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de Colletotrichum spp., obtenidos de frutos de Lulo (Solanum quitoense), Tomate de árbol (Solanum Betacea), granadilla (Passiflora ligularis), Mango (Mangifera indica) y tallos de Mora (Rubus glaucus) con síntomas de antracnosis* [Trabajo final de grado, Pontificia Universidad Javeriana]. Repositorio Institucional Javeriano. <http://hdl.handle.net/10554/8253>

Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73(1), 37-113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>

Danós, E. (1996). Enfermedades y su control: Enfermedades causadas por hongos: sarna de los cítricos. En A. Fabiani, R. Mika, L. Larocca, & C. Anderson (Eds.), *Manual para productores de naranjas y mandarinas de la región del Río*

Uruguay (pp. 7-10). INTA. <https://es.scribd.com/document/177269523/Inta-Manual-Para-Productores-de-Naranja-y-Mandarina-de-La-Region-Del-Rio-Uruguay-Cap12>

Del Rivero, J. M. (1990). La enfermedad de la caída de la fruta en cítricos. *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 16(1), 723-731.
<https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-16-04-723-731.pdf>

Fagan, H. J. (1979). Postbloom fruit drop: A new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Citrus Research Station*, 91(1), 13-20.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1979.tb07408.x>

French, E., & Herbert, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. IICA.

Graham, J., & Menge, J. (2002). Enfermedades de etiología incierta o compleja: Muerte súbita de ramas y ramillas. En L. Timmer, S. Garnsey, & J. Graham (Eds.), *Plagas y enfermedades de los cítricos* (pp. 71-72). Mundi-Prensa.

Gravina, A. (2014). *Fisiología de citrus*. Universidad de la República.

Hernández, J. (2016). *Elaboración y validación de escala diagramática de severidad de la antracnosis (Colletotrichum spp.) en lima ácida Tahití y su aplicación bajo condiciones de campo* [Trabajo final de grado, Universidad de los Llanos]. Unillanos.
<https://repositorio.unillanos.edu.co/server/api/core/bitstreams/a5fae97b-c702-4ca8-adbe-a356471a5160/content>

Lima, W., Spósito, M., Amorim, L., Gonçalves, F., & de Filho, P. (2011). *Colletotrichum gloeosporioides*: A new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 157-165. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9795-1>

López, M. (2000). Enfermedades producidas por bacterias: Cancrosis de los cítricos. En N. Durán & P. Moreno (Eds.), *Enfermedades de los cítricos* (pp. 47-50). Mundi-Prensa.

Martínez, A., Abreu, A., Montelongo, M. J., Mondino, P., & Alaniz, S. (2015, setiembre). *Resultado preliminar indica que la sarna de los cítricos en Uruguay es causada*

por *Elsinoë australis* [Contribución]. III Jornada Nacional de Fitopatología y I Jornada Nacional de Protección Vegetal, Montevideo, Uruguay.

- McGovern, R., Seijo, T., Hendricks, K., & Roberts, P. (2012). New report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing postbloom fruit drop on citrus in Bermuda. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 34(2), 187-194.
<https://doi.org/10.1080/07060661.2012.670137>
- Moreira, V., Mondino, P., & Alaniz, S. (2021). Olive anthracnose caused by *Colletotrichum* in Uruguay: Symptoms, species diversity and pathogenicity on flowers and fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 160(3), 663-681.
<https://doi.org/10.1007/s10658-021-02274-z>
- Oficina de Estadísticas Agropecuarias. (2024). *Encuesta citrícola "Primavera 2023"*. MGAP. <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2024-02/2023PUBLICACION%20CITRICOLA%20PRIM.pdf>
- Orozco, S. (2006). *Patogenicidad, variabilidad morfológica y genética de Colletotrichum acutatum Simmonds de cítricos en México* [Disertación doctoral, Universidad de Colima]. Bvirtual.
<http://bvirtual.ucol.mx/consultaxcategoria.php?categoria=3&id=7471>
- Otero, A., Grasso, R., Goñi, C., Pérez, E., Rubio, L., Maeso, D., Bertalmío, A., Buenahora, J., Giambiasi, M., Arruabarrena, A., Lado, J., Moltini, A., Fasiolo, C., Espino, M., & Rivas, F. (2020). Desafíos de la citricultura en Uruguay y el aporte de INIA a su competitividad. *Revista INIA*, (61), 67-68.
<http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/14496/1/Rev-INIA-61-Junio-2020-p-55-68.pdf>
- Peres, N., Timmer, L., Adaskaveg, J., & Correll, J. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant Disease*, 89(8), 784-796. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0784>
- Pereyra, F., Vázquez, F., & Scattolini, A. (2023, 6-10 de noviembre). *Agente causal de la necrosis de rama en cítricos* [Póster]. Congresso Brasileiro de Fruticultura, Pelotas, Brasil.
- Polanco, L., Alvarado, O., Pérez, O., González, R., & Olivares, E. (2019). Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas,

- México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrarias*, 10(4), 757-764.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1417>
- Reuther, W., Calaban, E., & Carman, G. (Eds.). (1978). *The citrus industry*. University of California.
- Riolo, M., Aloï, F., Pane, A., Cara, M., & Cacciola, S. (2021). Twig and shoot dieback of citrus: A new disease caused by *Colletotrichum* species. *Cells*, 10(2), Artículo e449. <https://doi.org/10.3390/cells10020449>
- Robles, M., Velázquez, J., Manzanilla, M., Orozco, M., Medina, V., López, J., & Flores, R. (2013). Síntomas del Huanglongbing (HLB) en árboles de limón mexicano [*Citrus aurantifolia* (Christm) Swingle] y su dispersión en el estado de Colima, México. *Revista Chapingo*, 19(1), 15-31.
<https://doi.org/10.5154/r.rchsh.2012.01.005>
- Ruiz, A., Parra, C., da Graça, J., Salas, B., Malik, N., & Kunta, M. (2014). Caracterización molecular y de ensayos de patogenicidad de *Colletotrichum acutatum*: Agente causal de la antracnosis del limón en Texas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32(1), 52-61.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61232999005>
- Scattolini, A. (2009). *Seguimiento de variables epidemiológicas de cancro cítrico producido por Xanthomonas axonopodis pv. citri en limón (Citrus limón), tipo Lisbon* [Tesis de maestría, Universidad de la República]. Colibri.
<https://hdl.handle.net/20.500.12008/27771>
- Timmer, L. W. (2002). Enfermedades de las hojas y de los frutos: Antracnosis de la lima. En L. Timmer, S. Garnsey, & J. Graham (Eds.), *Plagas y enfermedades de los cítricos* (p. 23). Mundi-Prensa.
- Timmer, L. W., Brown, G., & Zitko, S. (1998). The role of *Colletotrichum* spp. in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. *Plant Disease*, 82(4), 415-418. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.4.415>
- Timmer, L. W., & Peres, N. A. (2015). Where have all the flowers gone? Postbloom fruit drop of citrus in the Americas. *Journal of Citrus Pathology*, 2(1), Artículo e28302. <https://doi.org/10.5070/C421028302>

Timmer, L. W., & Tuset, J. (2000). Enfermedades producidas por hongos: Antracnosis de los cítricos. En N. Durán & P. Moreno (Eds.), *Enfermedades de los cítricos* (pp. 27-29). Mundi-Prensa.

Von Arx, J. (1981). *The genera of fungi sporulating in pure culture*. Cramer.