

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad



**Identificación de los principales hongos
asociados a la caída prematura de la fruta
en cítricos y evaluación de cuatro
fungicidas para su manejo en una finca
productora de naranja ubicada en Brasilia,
Alajuela, Costa Rica.**

Estudiante:

María José Guillén Carvajal

Tutora

Dra. Gerardina Umaña Rojas

2023

Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad



Identificación de los principales hongos asociados a la caída prematura de la fruta en cítricos y evaluación de cuatro fungicidas para su manejo en una finca productora de naranja ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica.

Candidato

Ing. Agr. María José Guillén Carvajal

Asesor

Mtr. Hugo Segnini Polo

Tutora

Dra. Gerardina Umaña Rojas

Asesor

Dra. Ingrid Varela Benavides

Febrero, 2023

Maestría en Ciencia y Tecnología para la Sostenibilidad

Eje temático de *Gestión Ambiental*.

“Identificación de los principales hongos asociados a la caída prematura de la fruta en cítricos y evaluación de cuatro fungicidas para su manejo en una finca productora de naranja ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica.”

Tesis sometida a consideración del tribunal evaluador como requisito para optar al grado de Magister Scientiae en Ciencia y Tecnología Sostenible, bajo el eje temático de Gestión Ambiental.

El Tribunal evaluador está compuesto por:

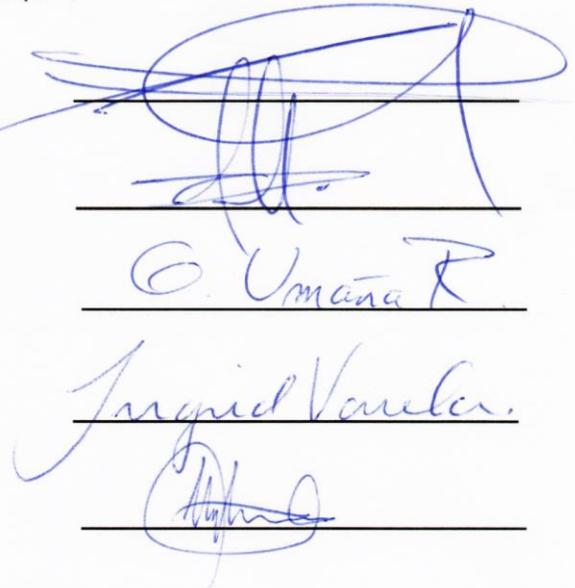
Dr. Cristian Moreira Segura
Coord. Área Académica (Preside)

Dr. José Pablo Jiménez Madrigal
Área Temática

Dra. Gerardina Umaña Rojas
Tutora

Dra. Ingrid Varela Benavides
Asesora

M.Sc. Hugo Segnini Polo
Asesor



Febrero, 2023

Agradecimientos

Inicialmente, quisiera agradecer a mi directora de tesis, Gerardina Umaña Rojas, por guiarme en la propuesta de dos proyectos de investigación en cultivos distintos a lo largo de la maestría. Muchas gracias por todo el conocimiento compartido y el apoyo en los momentos necesarios. Seguidamente a mi asesora, Ingrid Varela, por todo el acompañamiento y capacitación en este proceso. Especialmente por atenderme siempre con la mayor prontitud posible y por la paciencia. A mi asesor, Hugo Segnini, por guiarme en mis primeros pasos en el cultivo y por la confianza brindada en este proyecto. A los funcionarios del Campus Tecnológico local San Carlos, especialmente a los profesores Ingrid Varela, Cristian Moreira y Fabian Echeverria. A la estudiante Chiara Consumi Tubito, por las horas de ayuda en el laboratorio. A mi compañero Eliecer Aragón, por su ayuda en logística durante toda la etapa de campo. A César Canales Reyes y Audin Medina Herrera por ayudarme siempre con una sonrisa bajo el sol.

Dedicatoria

Este proyecto está dedicado a mi madre, por todos los sacrificios que implicó darme las herramientas necesarias para ser la persona que soy hoy. A mami Flory, por ser mi pilar y demostrarme siempre su cariño y a hacer las cosas con amor y para el bien. A mi hermana, por ser mi apoyo siempre y una fuente de amor y cariño inagotable.

Índice de contenido

ÍNDICE DE CONTENIDO	6
ÍNDICE DE CUADROS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	12
OBJETIVOS	14
OBJETIVO GENERAL	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
MARCO TEÓRICO	15
CULTIVO DE CÍTRICOS EN COSTA RICA.....	15
ENFERMEDADES FUNGOSAS DE LOS CÍTRICOS	16
<i>COLLETOTRICHUM</i> EN CÍTRICOS.....	18
FUNGICIDAS USADOS PARA EL COMBATE DE LA CAÍDA PREMATURA DE LA FRUTA EN CÍTRICOS.....	20
ESTRATEGIAS DE PREVENCIÓN DE RESISTENCIA DENTRO DEL DISEÑO DE PLANES DE MANEJO INTEGRADO DE CULTIVO.....	20
METODOLOGÍA.....	21
ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS MÁS FRECUENTES.....	21
1.1 <i>Localización y periodo del estudio:</i>	21
1.2 <i>Obtención de aislamientos</i>	22
1.3 <i>Identificación de hongos</i>	23
ETAPA 2. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA <i>IN VITRO</i> DE FUNGICIDAS.....	25
2.1 <i>Primer Ensayo: Inhibición del crecimiento micelial por medio de la técnica del medio enmendado</i>	25
2.2 <i>Segundo Ensayo: Determinación % efectividad mediante el método de difusión en agar</i>	26
2.3 <i>Análisis de datos</i>	27

ETAPA 3. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD EN CAMPO PARA EL CONTROL DE LA CAÍDA PREMATURA DE LA FRUTA (<i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.).	27
3.1 Localización y periodo de las evaluaciones:	27
3.2 Diseño experimental:	27
3.3 Variables evaluadas:	29
3.4 Análisis de datos:	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
ETAPA 1. CARACTERIZACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS MÁS FRECUENTES.	30
ETAPA 2. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA <i>IN VITRO</i> DE PRODUCTOS DE CONTROL.	33
<i>Primer Ensayo: Inhibición del crecimiento micelial por medio de la técnica del medio enmendado</i>	33
<i>Segundo Ensayo: Determinación % efectividad mediante el método de difusión en agar.</i>	34
ETAPA 3. EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD EN CAMPO PARA EL CONTROL DE LA CAÍDA PREMATURA DE LA FRUTA (<i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.).	39
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	43

Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género <i>Colletotrichum</i> (Rojo-Báez et al., 2017).	17
Cuadro 2. Fungicidas seleccionados para evaluación in vitro de la inhibición de hongos aislados de tejidos florales colectados en una plantación de naranja en Brasilia, Alajuela, Costa Rica, 2021.	25
Cuadro 3. Concentraciones de los fungicidas utilizados para la evaluación de su actividad por el método de enmendado sobre aislamientos fúngicos obtenidos de cultivo de naranja. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.	26
Cuadro 4. Tratamientos evaluados para control de <i>Colletotrichum</i> sp en una finca productora de naranja ubicada en la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.	28
Cuadro 5. Hongos aislados de tejido de flores de naranja de la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.	30
Cuadro 6. Grado de inhibición del crecimiento micelial de cuatro fungicidas a distintas concentraciones sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum abscissum</i> aislados de flores de naranja. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.	34
Cuadro 7. Efectividad in vitro de cuatro fungicidas a distintas concentraciones sobre reducción del diámetro de colonia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> y <i>Colletotrichum abscissum</i> aislados de flores de naranja. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021. o.	37
Cuadro 8. Porcentajes de cuaje y de cálices persistentes obtenidos con diferentes tratamientos en una finca productora de naranja ubicada en la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.	39

Índice de figuras

Figura 1. Tejidos recolectados para el aislamiento de hongos: pétalos sin síntomas (a), pétalos con síntomas iniciales (b), pétalos con síntomas avanzados (c), cálices y pedicelos (d) Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.	22
Figura 2. Estados de desarrollo de la floración (modificado de Silva-Junior et al, 2014).....	28
Figura 3. Aislamientos de <i>Colletotrichum abscissum</i> obtenidos de pétalos con síntomas iniciales (A) y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> a partir de cáliz (B) en una plantación de naranja ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica.	33

Resumen

El cultivo de naranja es uno de los de mayor relevancia a nivel mundial. En el caso de Costa Rica, es un cultivo de importancia económica y social al ser una de las principales fuentes de trabajo y sostén de las familias en la región Chorotega del país. Además, al ser un cultivo perenne ofrece diversas ventajas como control de la erosión, mejora el microclima, captura y almacena carbono. Enfrenta diversos retos dentro de los cuales destaca el control de la caída prematura de la fruta, ocasionada por el hongo *Colletotrichum*. Esta enfermedad es de gran relevancia porque reduce la productividad desde las primeras etapas. Actualmente, debido al cambio climático, se producen diversas floraciones al año ocasionando un aumento de inóculo en campo lo que dificulta el control de la enfermedad; aunado a una limitación en fungicidas disponibles aprobados para el cultivo. El manejo de enfermedades debe ir más allá de cuidar la salud de la plantación, debe además buscar proteger los intereses en el futuro. En el diseño de planes de manejo se debe considerar el impacto de las prácticas a implementar en la sostenibilidad del negocio incluyendo la rentabilidad y el ambiente. Por lo tanto, es necesario dirigir esfuerzos en investigación que promuevan diseñar planes de manejo que permitan ajustarse para enfrentar las condiciones actuales en aras de lograr una producción sostenible. El objetivo del presente trabajo fue identificar los hongos asociados a la caída prematura de la fruta (*Colletotrichum* spp.) en una finca productora de cítricos ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica y evaluar su control a través de fungicidas. La investigación se llevó a cabo en tres etapas. En una primera etapa se obtuvieron aislamientos de diferentes tejidos florales de naranja, de los cuales seis aislamientos de hongos fueron identificados vía PCR. Posteriormente, en una segunda etapa se evaluó la eficacia *in vitro*, mediante dos ensayos, de los fungicidas tebuconazol, pyraclostrobin, difenoconazol y ferbam sobre dos aislamientos de *Colletotrichum*. Se realizó un primer ensayo en placas multipozo evaluando el grado de inhibición del crecimiento micelial y un segundo ensayo en placas Petri determinando el porcentaje de efectividad de cada fungicida. En una tercera etapa se evaluó la efectividad en campo durante los meses junio-agosto del 2021 de los fungicidas solos y en mezcla. Los resultados obtenidos fueron los siguientes. Se identificó *Colletotrichum abscissum* en pétalos con síntomas de la enfermedad de la caída prematura de la fruta y *C. gloeosporoides* en cálices persistentes. La predominancia de *C. abscissum* tiene implicaciones directas en el manejo de la enfermedad debido a que la agresividad es mayor al ser causada por *C. abscissum*, en relación con *C. gloeosporoides*. No se obtuvo crecimiento micelial en pétalos sin síntomas, esto podría deberse a que *Colletotrichum* presenta únicamente una fase necrotrófica en pétalos de flores de naranja. Se identificó *Fusarium* en pedicelos que permanecieron tras la caída de flores, con dos coincidencias; *F. incarnatum* y *F. keratoplasticum*. Los fungicidas con mejor efectividad *in vitro* fueron los triazoles, tebuconazol y difenoconazol, en ese orden. El pyraclostrobin demostró poca eficacia sobre la inhibición de ambos aislados; se recomienda realizar una evaluación de efectividad *in vitro* empleando inhibidores de la enzima oxidasa alternativa (AOX) como enmienda para valorar su efectividad. El pyraclostrobin mostró el mejor combate de la enfermedad, determinado en el mayor porcentaje de cuaje y presentando menor incidencia de cálices persistentes. El ferbam resultó poco eficaz en las pruebas *in vitro*. En la evaluación en campo al ser aplicado en mezcla con fungicidas sistémicos permitió aumento en porcentaje de cuaje y una disminución en incidencia de cálices persistentes. Estos resultados, validan el ferbam como alternativa de control a incluir en el diseño de planes de manejo de *Colletotrichum* spp asociado a caída prematura de la fruta. Se recomienda realizar una evaluación de distintas mezclas de sistémicos en comparación a las mezclas de sistémicos con ferbam, para establecer el correcto sistema de rotación a emplear, junto con evaluaciones de residuos para determinar el número de ciclos a incluir.

Palabras clave: inhibición del crecimiento micelial, *Colletotrichum*, caída prematura de la fruta, cítricos, PCR.

Abstract

Orange cultivation is one of the most relevant worldwide. In the case of Costa Rica, it is a crop of economic and social importance as it is one of the main sources of work and support for families in the Chorotega region of the country. In addition, being a perennial crop, it offers several advantages such as controlling erosion, improving the microclimate, capturing and storing carbon. It faces several challenges within which it highlights the control of the premature fall of the fruit, caused by the fungus *Colletotrichum*. This disease is of great relevance because it reduces productivity from the first stages. Currently, due to climate change, several blooms are produced each year, causing an increase in inoculum in the field, which makes it difficult to control the disease; combined with a limitation on approved fungicides for cultivation. The management of diseases must go beyond taking care of the health of the plantation, it must also seek to protect the interests in the future. In the design of management plans, the impact of the practices to be implemented on the sustainability of the business, including profitability and the environment, must be considered. Therefore, it is necessary to direct research efforts that promote the design of management plans that allow adjustment to face current conditions to achieve sustainable production (Rangel & González, 2022). The objective of this work was to identify the fungi associated with premature fruit drop (*Colletotrichum* spp.) in a citrus producing farm located in Brasilia, Alajuela, Costa Rica and to evaluate their control through fungicides. The investigation was carried out in three stages. In a first stage, isolates of different orange floral tissues were obtained, of which six fungal isolates were identified via PCR. Subsequently, in a second stage, the in vitro efficacy of the fungicides tebuconazole, pyraclostrobin, difenoconazole and ferbam on two *Colletotrichum* isolates was evaluated by means of two trials. A first test was carried out in multiwell plates, evaluating the degree of mycelial growth inhibition, and a second test in Petri dishes, determining the percentage of effectiveness of each fungicide. In a third stage, the effectiveness in the field was evaluated during the months of June-August 2021 of the fungicides alone and in mixture. The results obtained were the following. *Colletotrichum abscissum* was identified in petals with symptoms of premature fruit drop disease and *C. gloeosporioides* in persistent calyxes. The predominance of *C. abscissum* has direct implications in the management of the disease since its aggressiveness is greater when it is caused by *C. abscissum*, in relation to *C. gloeosporioides*. No mycelial growth was obtained in petals without symptoms, this could be since *Colletotrichum* only presents a necrotrophic phase in orange flower petals. Fusarium was identified in pedicels that remained after flower fall, with two coincidences: *F. incarnatum* and *F. keratoplasticum*. The fungicides with the best in vitro effectiveness were the triazoles, tebuconazole and difenoconazole, in that order. Pyraclostrobin showed little efficacy on the inhibition of both isolates; It is recommended to carry out an in vitro effectiveness evaluation using inhibitors of the alternative oxidase enzyme (AOX) as an amendment to assess its effectiveness. Pyraclostrobin showed the best fight against the disease, determined in the highest percentage of fruit set and presenting a lower incidence of persistent calyxes. Ferbam was poorly effective in in vitro tests. In the field evaluation, when applied in a mixture with systemic fungicides, it allowed an increase in the percentage of fruit set and a decrease in the incidence of persistent calyxes. These results validate ferbam as a control alternative to include in the design of management plans for *Colletotrichum* spp associated with premature fruit drop. It is recommended to carry out an evaluation of different systemic mixtures compared to systemic mixtures with ferbam, to establish the correct rotation system to be used, together with residue evaluations to determine the number of cycles to include.

Keywords: mycelial growth inhibition, *Colletotrichum*, premature fruit drop, citrus, PCR.

Introducción

La producción de cítricos excede los 140 millones de toneladas por año globalmente y se ha registrado en más de 100 países diferentes en todo el mundo (Khamsaw et al., 2022). En Costa Rica, el desarrollo de la citricultura inició desde la década de los ochenta (Jiménez, 2012). Actualmente su producción se concentra en los cantones de San Carlos, Sarapiquí, Los Chiles, Upala y La Cruz y está destinada a la industrialización para jugo concentrado de exportación (Molina & Rojas, 2005).

La producción de cítricos se ve afectada por plagas y enfermedades que ocasionan pérdidas económicas importantes (Sáenz et al., 2019), siendo el principal reto el Huanglongbing (HLB) ocasionado por la bacteria *Liberibacter asiaticus*. Seguido se encuentran los hongos, que representan la mayoría de los agentes fitopatógenos en el género *Citrus* (Sáenz et al., 2019). Dentro de los cuales destaca *Colletotrichum*, que ocasiona la caída prematura de la fruta, una de las principales causas de la pérdida de productividad en áreas comerciales (Khamsaw et al., 2022). Actualmente, el control de la caída prematura de la fruta enfrenta diversos retos ambientales y agronómicos. Se sabe que las condiciones de cambio climático tienen como efecto potencial la disminución de productividad en cultivos agrícolas debido al incremento de eventos que aumenten el estrés o la presencia de enfermedades (Ghini et al., 2011). En el caso específico de los cítricos, el cambio climático ha ocasionado el aumento de ciclos de floración durante el año; incrementando la presión de inóculo en campo y haciendo necesarios más ciclos de protección con fungicidas (Peres et al., 2004).

Sumado a esto, existe una limitación en la cantidad de productos fungicidas para control de *Colletotrichum* disponibles en el mercado que tengan distintos modos de acción y estén avalados para el uso en cítricos (Silva, 2011). Este tema es de especial importancia porque existen reportes de que el uso continuo de fungicidas sintéticos para controlar *Colletotrichum* ha provocado que el hongo genere resistencia (Alvarez et al, 2020). Por lo tanto, es útil incluir herramientas de monitoreo de sensibilidad a fungicidas de las cepas patogénicas en las plantaciones; no solo para la selección de los productos de mejor control sino también para tomar medidas que prevengan la selección de poblaciones resistentes que puedan dificultar el control a largo plazo (Salazar et al., 2012).

En Costa Rica, se han identificado especies de *Colletotrichum* asociadas a cítricos. Peres et al. (2008) identificaron a *C. acutatum* en flores de naranja. También, Barquero et al. (2013) determinaron la presencia de *C. acutatum* en muestras de tejidos foliares, flores o inflorescencias

de limón criollo (*Citrus aurantifolia*) en las regiones Atlántica, Central y Brunca del país. Sin embargo, no existen estudios que incluyan, posterior a la identificación, herramientas de monitoreo de sensibilidad y efectividad en campo; así como tampoco existen estudios específicos para la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica.

El manejo de enfermedades debe ir más allá de cuidar la salud de la plantación, debe además buscar proteger los intereses en el futuro. En el diseño de planes de manejo se debe considerar el impacto de las prácticas a implementar en la sostenibilidad del negocio incluyendo la rentabilidad y el ambiente. Ya que, si bien la rentabilidad es el principal interés de los productores, el ambiente regula las condiciones de la plantación y su viabilidad en el tiempo y las prácticas de manejo pueden ayudar o afectar estas condiciones influyendo así en la sostenibilidad de la citricultura (Timmer & Duncan, 1999). Es debido a la situación descrita anteriormente que se requiere dirigir esfuerzos en investigación que permitan diseñar planes de manejo de la enfermedad; pero más importante aún, que brinden herramientas de monitoreo al sector productivo, ya que la información de que disponen los productores influye profundamente en las decisiones sobre estrategias de manejo integrado de enfermedades (Arauz, 2011). El escenario actual es un reto para el sector citrícola, pero este escenario está en constante cambio y se requiere diseñar sistemas de producción sostenibles que permitan ajustarse para enfrentar las condiciones actuales (Rangel & Gonzáles, 2022).

La producción de una alimentación sostenible se plantea como una de las metas para el 2030 desde los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) (Rodrigo-Cano et al., 2019). En el programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD) se considera la agricultura sostenible como uno de los ejes centrales de la Agenda 2030, siendo el aumento de la superficie agrícola donde se practica agricultura productiva y sostenible el eslabón fundamental para lograr el hambre cero (Rangel & Gonzáles, 2022). Es por esto, que la planificación de la investigación en agricultura sostenible y el manejo de los recursos naturales son esenciales en esta tarea. Más específicamente, el desarrollo del manejo integrado de cultivos (Morera, 2000; Rangel & Gonzáles, 2022). El manejo integrado de cultivos es una filosofía afín al desarrollo sostenible, ya que busca integrar el costo directo del manejo y el costo indirecto ambiental; con el fin de mejorar la productividad y calidad (Timmer & Duncan, 1999).

Con el fin de aportar al sector citrícola de herramientas e información que ayuden al diseño de planes de manejo integrado para el control de *Colletotrichum* asociado a la caída prematura de la fruta se llevó a cabo el presente proyecto de investigación con el objetivo de identificar los hongos asociados a la caída prematura de la fruta (*Colletotrichum* spp.) en una finca productora de cítricos ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica y evaluar su control a través de fungicidas.

Objetivos

Debido a la falta de información específica de *Colletotrichum* en cítricos para la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica; así como evaluaciones de efectividad de productos fungicidas disponibles para su control; se llevó a cabo el presente trabajo de investigación para cumplir con los siguientes objetivos:

Objetivo general

Identificar los hongos asociados a la caída prematura de la fruta (*Colletotrichum* spp.) en una finca productora de cítricos ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica y evaluar su control a través de fungicidas.

Objetivos específicos

- Caracterizar los aislamientos más frecuentes de *Colletotrichum* provenientes de una finca productora de cítricos ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica.
- Establecer la eficacia *in vitro* de tres fungicidas sistémicos y un fungicida protectante en el control de los aislamientos más frecuentes encontrados.
- Determinar la efectividad en campo de tres fungicidas sistémicos y un fungicida protectante, solos y en mezcla, para el control de la caída prematura de la fruta (*Colletotrichum* spp.) en una finca productora de cítricos ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica
- Emitir una recomendación de uso de los productos evaluados dentro de una estrategia de control.

Marco teórico

Cultivo de cítricos

El cultivo de los cítricos es una de las actividades de mayor importancia económica a nivel mundial (Artavia, 2019). Estos pertenecen a la familia Rutaceae y se encuentran agrupados en la subfamilia Aurantioideae. Los géneros más importantes son: Citrus, Poncirus y Fortunela; siendo las especies del género Citrus las más importantes desde el punto de vista agronómico (Mateus Cagua & Ordúz Rodríguez, 2012).

Un total de 140 países se dedican a su producción, siendo los principales China, Brasil, India, Estados Unidos y México (Sáenz et al., 2019; Liu et al., 2012). La demanda es muy estable, por esa razón y a pesar de la situación de crisis económica derivada de la pandemia de COVID-19, el consumo de cítricos en mercados como la Unión Europea aumentó; debido al interés de los consumidores por fortalecer su sistema inmune (United States Department of Agriculture, 2020). En el año 2021 se exportaron un total de \$ 15 955 644 000 en cítricos, frescos o deshidratados y hubo un crecimiento anual en valor del 4% con respecto al 2017 (International Trade Center, 2022).

Cultivo de cítricos en Costa Rica

En Costa Rica, el desarrollo de la citricultura inicia en la década de los ochenta con financiamiento del proyecto denominado CORENA 032, que pretendía darle cobertura al suelo con frutales. Sin embargo, fue hasta los años noventa que aumentó su desarrollo debido a diversos factores; entre ellos la caída de los precios del café, el proyecto Comunidad Económica Europea CEE que incluía el financiamiento de frutales y el desarrollo de las plantas agroindustriales procesadoras de jugo concentrado de naranja en la zona Norte del país (Jimenez, 2012).

Debido a estos factores el cultivo de la naranja sufre un gran desarrollo pasando de unas 4.000 hectáreas en 1985, a 20.000 hectáreas en solo siete años y se crea el programa nacional de naranja y cítricos (Jimenez, 2012). El 90 % de las áreas dedicadas a cítricos en el país corresponden a naranja (*Citrus sinensis*) y un 10% a limón ácido (*Citrus reticulata*) (Elizondo Solís, 2002). Un 75% del área sembrada de cítricos en el país se ubica en la Zona Norte y La Cruz de Guanacaste, concentrándose en los cantones de San Carlos, Sarapiquí, Los Chiles, Upala y La Cruz. El 90% de la producción está destinada a la industrialización de la fruta para producir jugo concentrado de exportación (Molina & Rojas, 2005).

Para el año 2018, en Costa Rica la estimación de área sembrada fue de 16 721,6 ha, de las cuales se cosecharon 11 842 con una producción estimada de 255 729,3 toneladas métricas (INEC, 2018).

Enfermedades fungosas de los cítricos

La producción de cítricos se ve afectada por plagas y enfermedades que ocasionan pérdidas económicas importantes (Sáenz et al., 2019). El principal reto de los cítricos es el Huanglongbing (HLB) ocasionado por la bacteria *Liberibacter asiaticus* y transmitido por dos especies de psílidos *Diaphorina citri* en Asia y *Trioza erythrae* en África. Seguido se encuentran los hongos, que representan la mayoría de los agentes fitopatógenos en el género *Citrus* con afectaciones en raíces, troncos, ramas, hojas y frutos (Sáenz et al., 2019).

Dentro de los hongos transmitidos por el suelo, destacan *Phytophthora* y *Fusarium* asociados a pudriciones secas de raíz (Naqvi, 2004). En la parte aérea se presentan enfermedades como mancha grasienta causada por *Mycosphaerella citri*, mancha marrón por *Alternaria alternata* y caída prematura de la fruta por *Colletotrichum* (Timmer et al., 2004).

Powell y Lindquis (1992) citados por Arauz (2011) sugieren que existen tres categorías para las enfermedades de un cultivo: 1) la enfermedad es un problema si no se realizan medidas de control, 2) la enfermedad es poco común por lo que no se requiere incluir medidas dentro del plan de manejo y 3) la enfermedad es poco común, pero se deben tener medidas para responder en caso de que aparezca debido a su agresividad. Dentro de estas, *Colletotrichum* pertenece a la categoría uno, debido a la cantidad de inóculo presente en plantaciones comerciales, a las condiciones climáticas favorables para su desarrollo y a su impacto directo sobre la producción. Es por esto por lo que *Colletotrichum* se considera uno de los principales problemas fitosanitarios en cítricos y las aplicaciones de fungicidas anuales para su control son parte de todo plan de manejo en el cultivo.

Esta enfermedad afecta la producción de manera directa al disminuir la cantidad de flores y, por lo tanto, frutos cuajados (Gama et al., 2020); se sabe que puede ocasionar pérdidas de hasta un 93% si las condiciones la favorecen (Peres et al., 2004). Aunado a esto, las condiciones de cambio climático han dificultado el diseño de planes de manejo de la enfermedad.

El Panel intergubernamental sobre Cambio Climático (IPPC) define el cambio climático como una modificación en el estado del clima que puede identificarse como cambios en la media y/o la variabilidad de sus propiedades y que persiste en un periodo prolongado, generalmente décadas (Rangel & Gonzáles, 2022). En el caso específico de los cítricos, las condiciones de cambio

climático han ocasionado el aumento de floraciones en el año; lo cual aumenta la presión de inóculo en campo dificultando aún más el control (Peres et al., 2004).

Es por esto, que se requiere investigación que permita diseñar planes de manejo de la enfermedad y que brinden herramientas de monitoreo al sector productivo que provean al productor la información necesaria para la toma de decisiones (Arauz, 2011).

Generalidades de *Colletotrichum*

Colletotrichum es un género de importancia mundial, ampliamente distribuido en zonas tropicales y subtropicales (Sharma et al., 2017; MacKenzie et al., 2009). En 1790 se reportó como *Vermicularia* y el nombre *Colletotrichum* se introdujo hasta 1831 (Mongkolporn et al., 2018).

Colletotrichum es el estado asexual (anamorfo) de *Glomerella* (teleomorfo), cuya clasificación taxonómica se detalla en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica del género *Colletotrichum* (Rojo-Báez et al., 2017).

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Hypocreomycetidae
Orden	Glomerellales
Familia	Glomerellaceae
Género	<i>Colletotrichum</i>

En el año 2012 el género se clasificó dentro del top 10 de patógenos en plantas debido a su diversidad de hospederos y agresividad (Dowling et al., 2020). Actualmente se enlistan un total de 257 especies pertenecientes al género, agrupadas en un total de 15 complejos con base en un análisis filogenético que considera la similitud entre las secuencias de genes de cada una de ellas (Talhinhas & Baroncelli, 2021).

La identificación tradicional de *Colletotrichum*, anteriormente, se basa en características morfológicas a saber: la forma de los conidios, color de la colonia, tasa de crecimiento, secreciones de pigmentos, entre otros (Barquero et al., 2013). *Colletotrichum* presenta distintos morfotipos, pero a nivel general se mencionan características como micelio algodonoso de color gris, a menudo con anillos concéntricos, margen circular, acérvulos negros con masas conidiales anaranjadas (Rojo-Báez et al., 2017; Álvarez et al., 2020). Sin embargo, debido a que las formas y tamaños de las esporas son similares entre especies del género y se puede observar diversidad de colonias bajo

diferentes condiciones de crecimiento, se considera que la identificación morfológica es imprecisa (Wu et al., 2020). Por ejemplo, no es posible diferenciar entre *C. acutatum sensu lato (s.l.)* y *C. gloeosporioides (s.l.)* únicamente por características morfológicas, dado a que existen muchas cepas intermedias que se han desarrollado por influencias ambientales y múltiples hospederos (Peres et al., 2008; Damm et al., 2012; Ruiz-Campos et al., 2021).

Otra característica empleada ha sido la evaluación de la sensibilidad a benomil (Barquero et al., 2013), con la limitante de que algunos aislamientos de especies consideradas sensibles al benomil, presentan resistencia a este fungicida, por lo que estas características resultan insuficientes (Ruiz-Campos et al., 2021).

Debido a las limitaciones de la identificación tradicional, el análisis molecular se considera una herramienta confiable (Rojo-Báez et al., 2017). Actualmente, se sabe que las características morfológicas deben complementarse con el análisis filogenético multigénico para desarrollar diagnósticos confiables y eficaces (Mongkolporn et al., 2018, Rojo-Báez et al., 2017).

El primer reporte de análisis moleculares para determinación de *Colletotrichum* se dio en 1992 y desde estos primeros informes, se han utilizado secuencias de genes para la revisión de la taxonomía de las especies de *Colletotrichum*. Un inconveniente importante es la identificación de una pequeña porción del genoma para comprender las relaciones filogenéticas entre cepas, por lo que se ha empleado la filogenética de múltiples genes para caracterizar sistemáticamente relaciones entre especies de *Colletotrichum*. En la actualidad se emplean regiones génicas conservadas o códigos de barras genéticos para la identificación y se emplean dos o más regiones por análisis (Rojo-Báez et al., 2017). Los genes empleados para el análisis de *Colletotrichum* dependen del complejo, sin embargo, en términos generales dentro de los genes utilizados se incluyen: ITS rDNA (espaciador transcrito interno ribosomal), GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), CHS1 (quitina sintasa 1), ACT (proteína similar a la actina), HIS3 (histona 3), TUB2 (b-tubulina) GS (glutamina sintetasa), CAL (calmodulina), SOD2 (superóxido dismutasa de manganeso), APN2 (ADN liasa 2) y gen de tipo de apareamiento parcial (Mat1-2) (Mongkolporn et al., 2018).

Colletotrichum en cítricos

La caída prematura de la fruta ocasionada por *Colletotrichum* fue reportada por primera vez en 1979 en Belice (Peres et al., 2004) y descrita posteriormente en 1983 (Da Silva, 2011). Se ha registrado en Brasil, Florida, Argentina, República Dominicana, Colombia, Panamá, México, Jamaica (Da Silva, 2011).

Históricamente las dos especies asociadas a la antracnosis floral de cítricos son *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc y *C. acutatum* Simmonds (Ramos et al., 2016). Si bien ambas especies han sido asociadas a la caída prematura de la fruta, Lima et al (2011) aseguran que *C. acutatum* es más agresivo y por lo tanto, predominante en daños a la flor (Peres et al., 2004).

Con respecto al proceso de infección, el hongo produce sus esporas en acérvulos, las cuales se dispersan mediante salpique de agua (Peres et al., 2004). Existen estudios que aseguran que la aplicación de azúcares en las hojas aumenta los propágulos de *Colletotrichum* evidenciando que los procesos de infección del hongo se dan en respuesta a los extractos de la flor (MacKenzie et al., 2010). Durante la floración, las salpicaduras inducen la germinación de apresorios en las hojas para la formación de conidios secundarios, los cuales a través de salpique llegan a flores sanas e inician el proceso de infección (Da Silva, 2011). La infección de *C. acutatum* en flores puede darse en 48 horas y en cinco días presentar acérvulos en la superficie de flores infectadas que se dispersan fácilmente (Timmer y Peres, 2015).

Existen otros medios de dispersión como insectos, máquinas o personal de campo (Timmer y Peres, 2015; Da Silva, 2011). En un estudio realizado para validar el efecto de algunos insectos en la diseminación del hongo, se describió que es transportado al adherirse al exterior del cuerpo de los insectos predominando las familias Drosophilidae, Apidae y Formicidae (Peña y Duncan, 1989).

Colletotrichum tiene la capacidad de estar presente sin ocasionar síntomas en espera de las condiciones óptimas (Dowling et al., 2020). Es decir, los conidios que son depositados en hojas y otros tejidos forman apresorios que sirven como estructuras de sobrevivencia en los periodos entre floraciones y son considerados el inóculo primario (Da Silva, 2011). Cuando la siguiente floración sucede estas estructuras germinan y producen conidios que son transportados por salpique a las flores (Peres et al., 2004).

Cuando se desarrolla la infección el hongo ocasiona lesiones de color naranja-café en pétalos (Peres et al., 2004). También puede evidenciarse en pistilos con formación de lesiones marrones o negras (Da Silva, 2011). Finalmente, el hongo ocasiona la abscisión de frutos jóvenes y retención de cálices (Peres et al., 2004). Los cálices pueden permanecer más de 12 meses después de la caída del fruto y son característicos de esta enfermedad (Da Silva, 2011).

Esta enfermedad se desarrolla con mayor facilidad en clima tropicales húmedos (Peres et al., 2002), debido a que las temperaturas óptimas para germinación de conidios están entre 22 y 27°C y se ve favorecido por la humedad (Gama et al., 2020). Además, se considera agresivo ya que la infección de los pétalos se da entre 12 y 18 horas a 19-30°C (Gama et al., 2020).

En Costa Rica, Peres et al. (2008) identificaron a *C. acutatum* en flores de naranja; provenientes de plantaciones comerciales; mediante la amplificación de la región ITS. También, Barquero et al. (2013) determinaron la presencia de *C. acutatum* en muestras de tejidos foliares, flores o inflorescencias de limón criollo (*Citrus aurantifolia*) en las regiones Atlántica, Central y Brunca del país; mediante PCR con los iniciadores específicos Calnt2 (5'-GGG-GAAGCCTCTCGCGG-3') (Sreenivasaprasad et al. 1996) y el ITS4 (5'-CCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al., 1990). A pesar de que existe información acerca de *Colletotrichum* spp. en Costa Rica asociado a cítricos, no existen publicaciones específicas para la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica; así como evaluaciones de efectividad de productos fungicidas disponibles para su control.

Fungicidas usados para el combate de la caída prematura de la fruta en cítricos

Las estrategias de control varían entre los países, pero a nivel general el manejo de plantaciones comerciales se ha basado en aplicaciones de fungicidas, con un total de dos a tres ciclos cada siete o catorce días durante la época de floración (Peres et al., 2004; Gama et al., 2020).

Actualmente, la cantidad de productos disponibles en el mercado, con distintos modos de acción, y avalados para el uso en cítricos, es baja (Silva, 2011). Se encuentran disponibles inhibidores de la dimetilación (IDMs) como el difenoconazole y tebuconazol; multisitios como el folpet, y ferbam, e inhibidores externos de quinona (Qols) como trifloxystrobin, azoxistrobin o pyraclostrobin (Gama et al., 2020).

Como ya se ha mencionado, el manejo de las patologías causadas por *Colletotrichum* se dificultan debido a la diversidad biológica de este género y a que existe una relación estrecha entre distintos grupos de especies (Rojo-Báez et al., 2017). De manera que, para lograr un manejo integrado efectivo, es útil evaluar frecuentemente la sensibilidad a fungicidas de las cepas patogénicas en las plantaciones (Salazar et al., 2012), para evitar que generen resistencia o tolerancia a los fungicidas que se utilizan para su control (Alvarez et al, 2020).

Estrategias de prevención de resistencia dentro del diseño de planes de manejo integrado de cultivo

La presencia de cepas resistentes, la limitación de productos disponibles y las condiciones de cambio climático han incrementado el interés por el desarrollo de planes de manejo que incluyan herramientas de monitoreo y estrategias de prevención de resistencia para asegurar la sostenibilidad

La resistencia a los fungicidas da como resultado una reducción de la sensibilidad a ciertos compuestos y es causada por una modificación genética del hongo que es heredable, si bien los fungicidas controlan eficazmente las cepas sensibles, las cepas resistentes se vuelven dominantes con el tiempo debido a la presión de selección por el uso continuo de fungicidas (Sánchez-Torres, 2021). Existen diversas medidas para el manejo de la resistencia tales como la rotación de las moléculas, el monitoreo de sensibilidad para la toma de decisiones, aplicación de dosis efectivas y el uso de productos multisitio (Dowling et al., 2020).

El principio del uso de productos multisitio como estrategia para prevenir la resistencia, consiste en que al afectar al hongo en diversos sitios la probabilidad de que genere resistencia disminuye. Esta práctica es común en diversos cultivos y es utilizada por los mayores productores de cítricos, en Brasil se emplean protectantes multisitio como folpet y mancozeb; en Florida y Estados Unidos se emplea ferbam (Gama et al., 2020). La incorporación de productos multisitio permite además una mejor rotación de moléculas por lo que puede disminuir la cantidad de ciclos de un mismo producto; permitiendo disminuir la carga química de cada ingrediente activo y siendo así una alternativa para prevenir la presencia de residuos; la cual es una de las preocupaciones de los consumidores debido a su potencial dañino a la salud (Sánchez-Torres, 2021).

Metodología

Debido a la poca información disponible en el país acerca de la identificación de especies de *Colletotrichum* asociadas a plantaciones de naranja y evaluaciones específicas para su control, se decidió llevar a cabo esta investigación dividida en tres etapas. Una primera etapa, con la finalidad de identificar las especies de *Colletotrichum* asociadas al daño específicamente para la zona de estudio ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica; una segunda etapa para evaluar la efectividad *in vitro* de los fungicidas disponibles actualmente sobre los aislamientos obtenidos y finalmente, una tercera etapa para evaluar el control de los fungicidas en campo para complementar los resultados obtenidos.

Etapas 1. Caracterización de los aislamientos más frecuentes

1.1 Localización y periodo del estudio:

La recolección de las muestras se realizó en una finca productora de naranja ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica (10°58'59.7" N -85°20'50.0" O) a 381 msnm, con una precipitación anual promedio de 3858 mm, una temperatura media anual de 23 °C, temperatura mínima de 15 °C, temperatura máxima de 39 °C y una humedad relativa de 90%. Se seleccionó esta finca debido a

que presenta una alta incidencia de la enfermedad y a que, por sus condiciones climáticas, caracterizadas por diversas floraciones al año y alta humedad relativa, representa un escenario de difícil control para la enfermedad.

Las muestras se tomaron de un área sembrada en el año 2014, variedad Valencia injertada sobre el patrón Flying Dragon y una densidad de siembra de 1000 árboles/ha. Las muestras se recolectaron en junio de 2021.

1.2 Obtención de aislamientos

Las muestras se recolectaron entre junio-julio del 2021 en la época de floración. Se consideraron cinco tipos de tejidos con diferente grado de sintomatología: pétalos sin síntomas, pétalos con síntomas iniciales, pétalos con síntomas avanzados, cálices y pedicelos que permanecieron tras la caída de flores(Figura 1). Para cada uno se recolectó tres muestras de árboles distintos, cada muestra consistió en cinco ejemplares del tejido floral correspondiente. El material se empacó en bolsa de papel y se transportó en una hielera hasta el laboratorio en un lapso máximo de 24 horas. La obtención de aislamientos y evaluación de fungicidas se realizó en los laboratorios del Instituto Tecnológico de Costa Rica, campus Tecnológico local San Carlos, ubicado en Santa Clara de Florencia, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

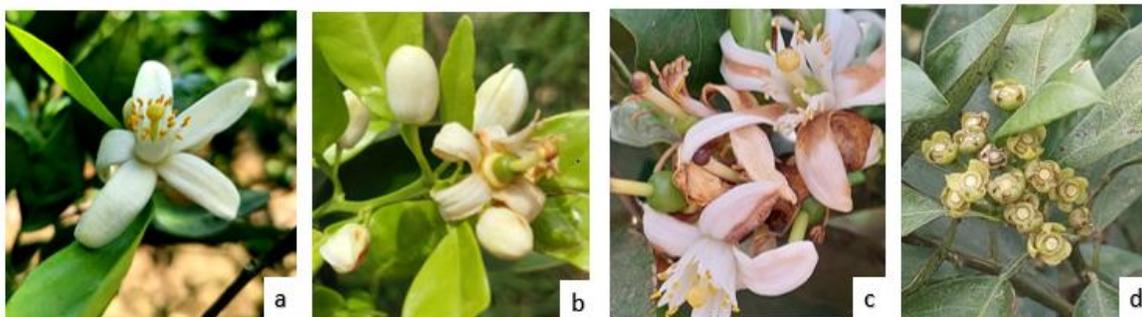


Figura 1. Tejidos recolectados para el aislamiento de hongos: pétalos sin síntomas (a), pétalos con síntomas iniciales (b), pétalos con síntomas avanzados (c), cálices y pedicelos (d) Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Todas las muestras se remojaron en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% durante un minuto (min); seguidamente se sumergieron en agua destilada estéril durante un min y se colocaron en papel filtro estéril para su secado, previo a su ingreso a la cámara de flujo laminar. Posteriormente, dentro de la cámara de flujo laminar en el caso de los pétalos y los cálices se

cortaron trozos de aproximadamente 0.5 x 0.5 cm de la zona de avance de los síntomas. Para los pedúnculos se cortaron trozos de 0,5 cm de largo. Se colocaron cinco trozos por plato Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) enmendado y se incubaron a 25-30 °C durante siete días en oscuridad. Una vez que se inició el crecimiento del hongo se tomaron trozos de micelio cortados con un bisturí y se colocaron en una placa Petri nueva. Se realizaron dos aislamientos por cada original y se incubaron a 25-30°C durante ocho días.

A partir de los aislamientos obtenidos se elaboraron cultivos monospóricos. Para lo cual, se elaboró una suspensión de esporas de cada uno en un tubo Eppendorf al cual se agregó un ml de la solución dispersante (Tween 80 al 0.1%) y una pequeña porción de PDA con crecimiento del hongo y se agitó levemente para separar las esporas durante 30 segundos. Se realizó el conteo de esporas bajo el microscopio en la cámara Neubauer y se calcularon las diluciones necesarias con base en la metodología descrita por Cañedo y Ames (2004). Posteriormente, se sembró en un plato Petri la suspensión final elaborada y se distribuyó homogéneamente por toda la placa con ayuda de un asa de Drigalsky estéril. Se incubó a 25-30 °C durante siete días en oscuridad. Transcurrido este periodo, se cortó con una hoja de bisturí una colonia en formación y se transfirió a una nueva placa con PDA.

Los aislamientos obtenidos se almacenaron en platos Petri con PDA y en refrigeración a una temperatura de 2-4 °C.

1.3 Identificación de hongos

Se realizó una identificación morfológica preliminar, en donde se consideraron las características de color y forma de la colonia, aspecto del micelio, tamaño, segmentación y esporulación. Después, se seleccionaron seis aislamientos de hongos fitopatógenos con base en su predominancia en las detecciones. Estos fueron enviados al laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Universidad de Costa Rica. La extracción de ADN del micelio de los aislamientos se realizó según el protocolo descrito por Rogers & Bendich (1988). El ADN obtenido se utilizó para amplificar, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la región del espaciador interno transcrito, (ITS) del ADN ribosomal, utilizando los imprimadores ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White et al., 1990).

Adicionalmente se realizaron dos amplificaciones más para cada aislamiento, una de la región β -Tubulin 2 (TUB) y otro de Glyceraldehyde-3-phosphate (GAPDH), ambas regiones empleadas para la identificación de especies de *Colletotrichum* (Guerber et al., 2003). Para TUB se emplearon los imprimadores T1 (5'AACATGCGTGAGATTGTAAGT3') y Bt2b

(5'ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC3') (O'Donnell & Cigelnik, 1997) y para GAPDH los imprimadores GDF (5'GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA3') y GDR (5'GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT3') (Guerber et al., 2003).

Las secuencias de ADN de cada una de las regiones para cada aislamiento se depuraron en el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.5.3 y la identidad de cada cepa se determinó mediante comparación de las secuencias publicadas en la base de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica en USA (National Center for Biotechnology Information) y EPPO Global Database (European and Mediterranean Plant Protection Organization).

Etapa 2. Evaluación de la eficiencia *in vitro* de fungicidas

La evaluación *in vitro* de fungicidas en los aislamientos seleccionados se inició con la obtención de los aislamientos en junio de 2021 y se finalizó en febrero de 2022.

2.1 Primer Ensayo: Inhibición del crecimiento micelial por medio de la técnica del medio enmendado

Para la evaluación se seleccionaron cuatro fungicidas disponibles a nivel comercial en Costa Rica (Cuadro 2).

Cuadro 2. Fungicidas seleccionados para evaluación *in vitro* de la inhibición de hongos aislados de tejidos florales colectados en una plantación de naranja en Brasilia, Alajuela, Costa Rica, 2021.

Nombre común	Nombre químico	Grupo Químico	Grupo FRAC*
Difenoconazol	1H-1,2,4-Triazole,1-[[2-[2-chloro-4-(4-chlorophenoxy) phenyl)-4-methyl-1,3-dioxolan-2-yl) methyl]	Triazol	3
Pyraclostrobin	Metil N-{2-[1-(4-Clorofenil)-1H-Pirazol-3-il] oximetil} (N-metoxi)carbamato	Methoxy-carbamato	11
Tebuconazol	1-(4-Chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-3-pentanol	Triazol	3
Ferbam	Dimetilditiocarbamato de hierro (III)	Ditiocarbamato	-

*(Fungicide resistance action committee, 2022).

Se realizaron ensayos de inhibición por medio de la técnica del medio enmendado. Se empleó placas multipozos; cada placa tenía veinticuatro pozos de 1,7 cm de diámetro cada uno. En cada pozo se colocó 1 ml de PDA al que se le agregó uno de los fungicidas, esto de acuerdo con la metodología empleada por Arce-Araya et al. (2019). Se evaluaron cinco concentraciones diferentes de cada fungicida, además de un testigo que consistió en PDA sin fungicida. Las concentraciones fueron elegidas y calculadas a partir de la dosis comercial recomendada del producto (Cuadro 3). Se utilizó cuatro repeticiones por concentración para cada aislamiento.

Cuadro 3. Concentraciones de los fungicidas utilizados para la evaluación de su actividad por el método de enmendado sobre aislamientos fúngicos obtenidos de cultivo de naranja. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Nombre químico	Concentración (mg i.a L ⁻¹)					
	1	2	3	4	5	6
	-	D.C/1000	D.C/100	D.C/10	D.C	2(D.C)
Difenoconazol	0	0,05	0,5	5	50	100
Pyraclostrobin	0	0,04	0,38	3,8	38	75
Tebuconazole	0	0,08	0,75	7,5	75	150
Ferbam	0	1,52	15,2	152	1520	3040

*D.C: Dosis comercial.

Una vez preparado el medio enmendado, en cada pozo se colocaron 50 µL de suspensión de esporas con una concentración de 1×10^5 conidios.ml⁻¹. Las placas se incubaron a 25-30 °C, en oscuridad. Se evaluó el grado de inhibición del crecimiento micelial por parte del fungicida a los tres y cinco días después de la inoculación. Se empleó una escala subjetiva en la cual se consideró control nulo cuando el crecimiento micelial fue igual al testigo, control parcial cuando el crecimiento de micelio inferior al testigo y control total cuando no se obtuvo crecimiento de micelio.

2.2 Segundo Ensayo: Determinación % efectividad mediante el método de difusión en agar

Se seleccionaron cuatro fungicidas a evaluar (Cuadro 2) mediante la técnica de difusión en agar, con base en la metodología empleada por Arce-Araya et al. (2019). Para cada fungicida se evaluaron seis concentraciones detalladas en el Cuadro 2. Se realizaron cuatro repeticiones por concentración, siendo una repetición una placa Petri de 8,5 cm de diámetro con PDA que se inoculó con 150 µl de suspensión de esporas a una concentración de 1×10^6 conidios.ml⁻¹. La suspensión se distribuyó homogéneamente por toda la placa con ayuda de un asa de Drigalsky estéril. Seguidamente, se colocó en el centro de la placa un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, impregnado con fungicida a una concentración determinada (Cuadro 3). En el tratamiento testigo se colocó un papel filtro con agua esterilizada.

Las placas se incubaron a temperatura ambiente (25-28 °C) durante cinco días. Se realizaron dos evaluaciones a los tres y cinco días después de establecido el ensayo, midiendo con ayuda de una regla el diámetro de crecimiento radial del hongo. Con la información generada, se estimó el

porcentaje de crecimiento del hongo, de acuerdo con Salazar et al. (2012), para lo cual se calculó la diferencia entre el diámetro en PDA con fungicida con respecto al diámetro en PDA sin fungicida. El resultado se dividió entre el diámetro en PDA sin fungicida y se multiplicó por 100. Con base en esto, se calculó el porcentaje de efectividad, que se consideró el inverso del porcentaje de crecimiento del hongo.

2.3 Análisis de datos

Con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de efectividad de cada fungicida y dosis evaluadas. Se realizó análisis de varianza, previamente se comprobó la normalidad (Prueba de Shapiro-Wilks) y homocedasticidad (Prueba de Levene) de los datos. Se determinó la diferencia estadística entre las medias de los tratamientos para cada variable mediante la prueba LSD de Fisher con 95 % de confiabilidad, utilizando el programa Infostat Versión 2020.

Etapas 3. Evaluación de la efectividad en campo para el control de la caída prematura de la fruta (*Colletotrichum* spp.).

3.1 Localización y periodo de las evaluaciones:

La evaluación de campo se llevó a cabo durante los meses junio-agosto del 2021, en la finca productora de naranja descrita en la sección 1.1.

3.2 Diseño experimental:

Se evaluaron un total de ocho tratamientos (Cuadro 4) con un diseño de bloques completos al azar. Se realizó cuatro réplicas de cada tratamiento. Una réplica se conformó por veinte árboles (cuatro hileras de cinco árboles). Entre cada repetición se dejó una hilera de barrera.

Cuadro 4. Tratamientos evaluados para control de *Colletotrichum* sp en una finca productora de naranja ubicada en la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Tratamiento	Ingrediente activo	Concentración (mg i.a L ⁻¹)
1	Tebuconazole	75
2	Pyraclostrobin	38
3	Difenoconazole	50
4	Ferbam	3040
5	Tebuconazole + Ferbam	75 + 1520
6	Pyraclostrobin + Ferbam	38 + 1520
7	Difenoconazole + Ferbam	50 + 1520
8	Testigo absoluto	-

*Volumen de aplicación empleado de 1250 L/ha.

Las aplicaciones de los tratamientos se realizaron con una motobomba Carpi de presión constante CPC-25 calibrada para aplicar 1250 L/ha, el volumen empleado comercialmente. Se marcaron un total de 50 brotes por repetición tomando las dos caras opuestas de los árboles de segunda y tercera hilera, 25 brotes por cara, cinco brotes por árbol. Todos los brotes se marcaron en el segundo tercio superior del árbol, en estado de R1-R3 al iniciar las pruebas (Figura 2) Se realizaron tres ciclos consecutivos de cada tratamiento, con un intervalo de siete días entre aplicaciones (7, 14, 21 días).

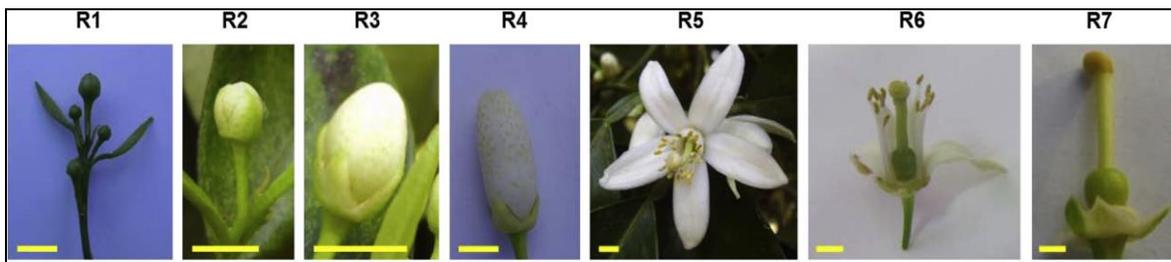


Figura 2. Estados de desarrollo de la floración (modificado de Silva-Junior et al, 2014).

3.3 Variables evaluadas:

Previo a la aplicación se registró el número de flores por brote y se identificó cada brote con un código. Se realizaron evaluaciones a los 7, 15, 30, 45 y 90 días después de aplicado; en cada una se registró número de flores sanas, número de flores con síntomas, número de frutos cuajados y cálices persistentes.

Durante todo el periodo de evaluación se registraron datos de temperatura y precipitación en las estaciones más cercanas.

3.4 Análisis de datos

Con los datos obtenidos se determinó el porcentaje de cuaje a los 45 días después de aplicados los tratamientos y porcentaje de cálices persistentes a los 90 días después de aplicado, con respecto a la cantidad de flores iniciales de cada brote. Se realizó análisis de varianza, previamente se comprobó la normalidad (Prueba de Shapiro-Wilks) y homocedasticidad (Prueba de Levene) de los datos. Se determinó la diferencia entre los tratamientos para cada variable por la prueba LSD de Fisher con 95 % de confiabilidad, utilizando el programa Infostat Versión 2020.

Resultados y discusión

Etapa 1. Caracterización de los aislamientos más frecuentes

Todos los organismos obtenidos a partir de pétalos con síntomas de la enfermedad fueron identificados como *Colletotrichum abscissum*. El aislamiento obtenido en cáliz correspondió a *Colletotrichum gloeosporioides*. Por su parte, en las muestras de pedicelos que permanecieron tras la caída de flores se encontró un aislamiento perteneciente al género *Fusarium* (Cuadro 5).

Cuadro 5. Hongos aislados de tejido de flores de naranja de la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Aislamiento fúngico	Tipo de muestra	Regiones	Identificación	Similitud
1	Pétalo con síntomas iniciales	ITS/TUB/GAPDH	<i>Colletotrichum abscissum</i>	99,46
2	Pétalo con síntomas iniciales	ITS/TUB/GAPDH	<i>Colletotrichum abscissum</i>	99,73
3	Pétalo con síntomas iniciales	ITS/TUB/GAPDH	<i>Colletotrichum abscissum</i>	99,87
4	Pétalo con síntomas iniciales	ITS/TUB/GAPDH	<i>Colletotrichum abscissum</i>	99,87
5	Pétalo con síntomas avanzados	ITS/TUB/GAPDH	<i>Colletotrichum abscissum</i>	99,11
6	Cáliz	ITS/TUB/GAPDH	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	98,00
7	Pedicelo	ITS	<i>Fusarium incarnatum</i>	99,81
		TUB	<i>Fusarium incarnatum</i>	98,09
		GAPDH	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	100,00

Colletotrichum abscissum, pertenece al complejo de *C. acutatum* (Guarnaccia et al., 2019) y fue reclasificado por Pinho et al. (2015). El complejo de especies acutatum consiste en 39 especies incluyendo a *C. acutatum* y sus parientes cercanos como *C. abscissum* (Jayawardena et al., 2021).

Por lo tanto, su detección en pétalos con síntomas iniciales y avanzados asociados a la caída prematura de la fruta coincide con lo reportado en literatura; con *Colletotrichum acutatum* como principal agente causal de esta enfermedad (Savi et al., 2019; Timmer & Peres, 2015).

La predominancia de *C. abscissum* en todos los aislamientos obtenidos en pétalos se puede deber a lo descrito por Lima et al (2011), en donde la incidencia de la enfermedad es menor en plantas inoculadas con *C. gloeosporioides*, limitando así su predominancia, lo que también coincide con lo reportado por Timmer & Peres (2015) quienes aseguran que la agresividad de la enfermedad es mayor al ser causada por *C. acutatum*, en relación con *C. gloeosporioides*. Por lo tanto, la confirmación de la presencia de *Colletotrichum abscissum*, tiene implicaciones directas en el manejo de la enfermedad. Las afectaciones severas por *C. abscissum* se dan en periodos de lluvias prolongadas; por lo que se pueden adoptar estrategias de manejo que ayuden a reducir la presión de selección que incluyan restringir las aplicaciones de fungicidas al período crítico de infección (Gama et al., 2020).

Por su parte, la presencia de *C. gloeosporioides* en cálices, coincide también con la literatura, al ser el segundo agente causal asociado a este daño (Silva et al., 2017; Marques et al., 2013) y concuerda con la descripción de Dowling et al. (2020) quienes señalan que *C. gloeosporioides* es más eficiente colonizando e infectando tejidos vegetativos; mientras *C. acutatum* es más frecuente infectando frutas o tejidos reproductivos.

Ambos patógenos ya habían sido descritos en el país para diversos cultivos como papaya, carambola, mango, helecho hoja, hoja de cuero, fresa (Schiller et al., 2006; Barquero et al., 2013). En el caso específico de cítricos, *C. acutatum* se encontró en flores de naranja provenientes de Costa Rica (Peres et al., 2008) y en tejidos foliares, flores o inflorescencias de limón criollo (Barquero et al., 2013). Sin embargo, no existían reportes en cítricos para la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica. La identificación de ambas especies asociadas al daño de caída prematura de la fruta en la zona de estudio abre una ventana para investigación en alternativas de control que permitan la incorporación de distintas opciones dentro de planes de manejo específicos y así favorecer el desarrollo de una agricultura productiva y sostenible.

En el caso de pétalos sin síntomas, no se obtuvo crecimiento micelial en ninguna de las repeticiones; esto se puede deber a que si bien *Colletotrichum* presenta una breve etapa biotrófica sin generar lesiones; seguida de una fase necrotrofica (Savi et al., 2019), este patógeno puede presentar únicamente una fase necrotrofica en pétalos, según se observó en un estudio sobre la colonización de *C. acutatum* en pétalos de flores de cítricos (Marques et al. (2013). Aunque se necesita más investigación, este comportamiento permitiría evaluar de forma más precisa la

incidencia de la enfermedad en las plantaciones, su relación con condiciones climáticas y establecer más certeramente estrategias de control.

Con respecto a los aislamientos pertenecientes a *Fusarium*, este género se ha reportado desde el inicio de la detección de la enfermedad en botones florales, pero no en pétalos (Fagan, 1979). En cítricos, *Fusarium* spp. se encuentra asociado a daños como pudrición seca de la raíz, muerte súbita, marchitez vascular y pudrición de tallo (Ezrari et al, 2021). En la identificación realizada, se obtuvieron dos coincidencias. *Fusarium incarnatum*, ha sido detectado en raíces de cítricos asociado específicamente a pudrición seca de raíz (Ezrari et al, 2021). Esta especie se ha encontrado en regiones tropicales, subtropicales y del mediterráneo; además ha sido asociada a pudriciones postcosecha en diversos cultivos (Hernández, 2016). En el caso de *F. keratoplasticum* es un hongo con plasticidad ecológica amplia y se ha encontrado como patógeno en cultivos como el guisante (*Pisum sativum*), pero está asociado principalmente a infecciones oculares en humanos (Šišić et al., 2018).

Para las evaluaciones de inhibición del crecimiento micelial y porcentaje de efectividad de los fungicidas se seleccionaron el aislamiento de *Colletotrichum gloeosporioides*, proveniente de cálices y el aislamiento tres de *Colletotrichum abscissum* proveniente de pétalos con síntomas (Figura 3).

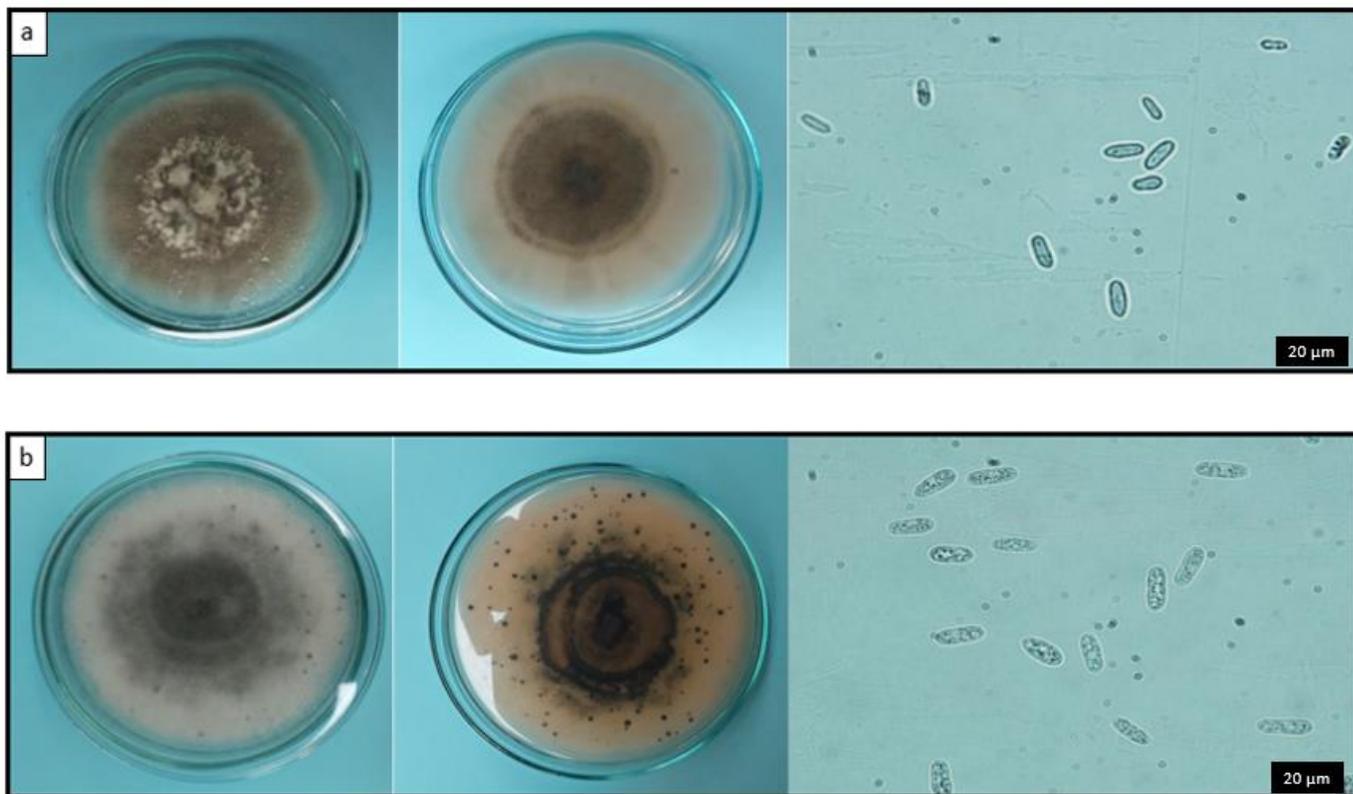


Figura 3. Aislamientos de *Colletotrichum abscissum* obtenidos de pétalos con síntomas iniciales (a) y *Colletotrichum gloeosporioides* a partir de cáliz (b) en una plantación de naranja ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica.

Etapa 2. Evaluación de la eficiencia *in vitro* de productos de control

Primer Ensayo: Inhibición del crecimiento micelial por medio de la técnica del medio enmendado

Los triazoles, difenoconazol y tebuconazol, presentaron los mejores resultados al ser los únicos en lograr un control total del crecimiento de los dos aislados (Cuadro 6). Siendo el mejor el tebuconazol, ya que mantuvo su eficacia a los cinco días después, contrario al difenoconazol en el que la inhibición no fue constante.

El pyraclostrobin presentó para ambos aislamientos un control parcial a partir de 3,8 mg i.a L⁻¹; sin embargo, no mostró un efecto de disminución total con ninguna de las concentraciones evaluadas (Cuadro 6), evidenciando un control deficiente del producto.

Para *Colletotrichum gloeosporioides* el ferbam presentó un control parcial a partir de 15,2 mg i.a L⁻¹ y a partir de 1520 mg i.a L⁻¹ para *Colletotrichum abscissum*. En la evaluación a los cinco días en todas las concentraciones se obtuvo crecimiento de ambos aislamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Grado de inhibición del crecimiento micelial de cuatro fungicidas a distintas concentraciones sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum abscissum* aislados de flores de naranja. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Producto	Concentración (mg i.a L ⁻¹)	Grado de inhibición del crecimiento micelial *	
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum abscissum</i>
Tebuconazol	0	Nulo	Nulo
	0,08	Nulo	Nulo
	0,75	Parcial	Parcial
	7,5	Total	Total
	75	Total	Total
	100	Total	Total
Difenoconazol	0	Nulo	Nulo
	0,05	Nulo	Nulo
	0,5	Parcial	Parcial
	5	Total	Total
	50	Total	Total
	100	Total	Total
Pyraclostrobin	0	Nulo	Nulo
	0,04	Nulo	Nulo
	0,38	Nulo	Nulo
	3.8	Parcial	Parcial
	38	Parcial	Parcial
	75	Parcial	Parcial
Ferbam	0	Nulo	Nulo
	1,52	Nulo	Nulo
	15,2	Parcial	Nulo
	152	Parcial	Nulo
	1520	Parcial	Parcial
	3040	Parcial	Parcial

* Considerando como control nulo un crecimiento micelial igual al testigo, parcial el crecimiento de micelio inferior al testigo y control total cuando no se obtuvo crecimiento de micelio.

Segundo Ensayo: Determinación % efectividad mediante el método de difusión en agar

Con esta otra técnica, se verificó la efectividad de la dosis empleada con tebuconazol y difenoconazol al presentar control sobre *C. gloeosporoides* y *C. abscissum* a partir de la décima parte de la dosis comercial (7,5 y 5 mg i.a L⁻¹, respectivamente) (Cuadro 7). Lo anterior coincide con lo obtenido en el primer ensayo, esto se ve favorecido porque estas moléculas inhiben principalmente la biosíntesis de esteroides; por lo que son efectivos en la reducción del crecimiento del micelio (Gao et al., 2017).

El pyraclostrobin, para *Colletotrichum gloeosporioides*, no resultó estadísticamente diferente del testigo en ninguna de las concentraciones evaluadas, efecto diferente al encontrado en el primer ensayo en que se obtuvo un control parcial a una concentración de 3,8 mg i.a L⁻¹. Cuando el porcentaje de inhibición fue muy bajo, la evaluación en placas multipozo no permitió detectar diferencias entre las concentraciones, debido, probablemente, al área de los pozos en donde se dificulta detectar diferencias pequeñas en crecimiento, siendo esto una limitante de la técnica.

Para *Colletotrichum abscissum*, el pyraclostrobin a partir de 3,8 mg i.a L⁻¹ presentó control sobre el desarrollo del hongo (Cuadro 7). Sin embargo, a diferencia del tebuconazol y difenoconazol, el pyraclostrobin presentó un crecimiento de micelio menor al testigo evidenciando un efecto, pero no una inhibición del crecimiento. La diferencia en control evidenciada entre ambos aislados coincide con lo reportado por Han et al. (2018) en donde especies de *Colletotrichum* pueden tener respuestas de sensibilidad distintas a grupos de fungicidas; además existen estudios que demuestran diferencias relacionadas con la agresividad de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en flor (Lima et al., 2011).

El control deficiente del pyraclostrobin sobre *C. gloeosporoides* podría deberse a diversos motivos. Los fungicidas inhibidores externos de quinona (Qols) han reportado control de *Colletotrichum* spp. y se encuentran dentro de la recomendación de la guía de producción de cítricos de Florida 2021-2022 (Piccirillo et al., 2018; Peres & Dewdney, 2021). Sin embargo, los Qol tienen alto riesgo de generar resistencia, además de presentar resistencia cruzada entre todos los miembros de este grupo (Fungicide Resistance Action Committee, n.d.). Al no tener evaluaciones previas de sensibilidad de este hongo, no se puede hablar de pérdida de sensibilidad, por lo que nuevamente los resultados obtenidos evidencian la importancia de realizar evaluaciones periódicas de resistencia a fungicidas como una de las claves para un control efectivo de *Colletotrichum* (Torres-Calzada et al., 2015). Estos resultados también pueden deberse a un efecto de la metodología, ya que se han descrito dos mecanismos de resistencia para este grupo de fungicidas, uno de estos solo implica a la enzima oxidasa alternativa (AOX) que activa un mecanismo alternativo más corto que la respiración normal y puede conducir a resultados erróneos en ensayos *in vitro*. La respiración alternativa parece proporcionar energía para contrarrestar el

efecto de Qols. En el campo, su impacto no es relevante, ya que la producción limitada de ATP no provee la demanda de energía requerida para la germinación de esporas y penetración del huésped. Por lo tanto, los inhibidores de AOX son empleados como enmiendas en pruebas de sensibilidad a Qols (Piccirillo et al., 2018).

El ferbam, presentó para *C. abscissum* resultados consistentes en ambas metodologías, teniendo un efecto parcial de disminución a una concentración de 1520 mg i.a L⁻¹ (Cuadro 6 y 7). Sin embargo, el control observado fue inferior en comparación a todos los fungicidas evaluados. Esto coincide con lo reportado por Santamaría et al. (2011) en donde la inhibición del diámetro de *Colletotrichum* obtenido con ferbam fue aproximadamente una tercera parte del observado con otros fungicidas evaluados como prochloraz. A pesar de mostrar un control parcial de *C. gloeosporoides* a partir de 15,2 mg i.a L⁻¹ no se logró determinar un porcentaje de efectividad en ninguna de las concentraciones evaluadas; esto coincide con lo obtenido para pyraclostrobin, en donde evaluaciones de productos con poco efecto los resultados no son consistentes entre ambas metodologías.

Cuadro 7. Efectividad *in vitro* de cuatro fungicidas a distintas concentraciones sobre reducción del diámetro de colonia de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum abscissum* aislados de flores de naranja. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021. Los valores presentados son el promedio de las cuatro repeticiones. El análisis estadístico debe interpretarse verticalmente, para cada producto por separado.

Producto	Concentración (mg i.a. L ⁻¹)	% Efectividad <i>in vitro</i>	
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum abscissum</i>
Tebuconazol	0	0 (a)	0 (a)
	0,08	0 (a)	0 (a)
	0,75	0 (a)	0 (a)
	7,5	12,5 ± 7,2 (a)	21,9 ± 3,1 (b)
	75	33,8 ± 2,9 (b)	45 ± 3,1 (c)
Difenoconazol	0	0 (a)	0 (a)
	0,05	0 (a)	0 (a)
	0,5	0 (a)	0 (a)
	5	10,6 ± 3,7 (b)	30 ± 3,1 (b)
	50	39,4 ± 1,2 (c)	37,5 ± 0 (c)
Pyraclostrobin	0	0 (a)	0 (a)
	0,04	0 (a)	0 (a)
	0,38	0 (a)	0 (a)
	3,8	0 (a)	46,9 ± 3,1 (b)
	38	3,1 ± 3,1 (a)	43,8 ± 3,6 (b)
Ferbam	0	0 (a)	0 (a)
	1,52	0 (a)	0 (a)
	15,2	0 (a)	0 (a)
	152	0 (a)	0 (a)
	1520	0 (a)	10,6 ± 1,2 (b)

*Medias con una letra diferente en la misma columna para cada producto son significativamente diferentes según prueba LSD de Fisher ($p < 0.05$).

Una herramienta clave para lograr un manejo integrado efectivo de *Colletotrichum* es el monitoreo de la sensibilidad a fungicidas (Salazar et al., 2012). Especialmente, porque se ha

reportado para *Colletotrichum* que el uso continuo de fungicidas sintéticos ha generado resistencia (Alvarez et al, 2020). Sin embargo, no se encontraron estudios previos de sensibilidad en la población de patógenos evaluada, por lo que este estudio puede servir como línea de base para futuros ensayos de monitoreo dirigidos en los aislamientos obtenidos de *C. abscissum* y *C. gloeosporioides*.

Etapa 3. Evaluación de la efectividad en campo para el control de la caída prematura de la fruta (*Colletotrichum* spp.).

En la evaluación en campo, todos los fungicidas sistémicos presentaron un aumento en porcentaje de cuaje y una disminución en incidencia de cálices persistentes al ser aplicados en mezcla con ferbam. Con respecto a los fungicidas sistémicos solos, los mejores resultados se obtuvieron con el pyraclostrobin (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentajes de cuaje y de cálices persistentes obtenidos con diferentes tratamientos en una finca productora de naranja ubicada en la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021. El análisis estadístico debe interpretarse verticalmente, para cada momento de evaluación por separado.

Tratamiento	Descripción	Cuaje (%)	Cálices persistentes (%)
1	Tebuconazole	41,2 ± 3,1 (ab)	51,1 ± 3,2 (c)
2	Pyraclostrobin	56,2 ± 2,6 (de)	41,2 ± 2,6 (ab)
3	Difenoconazole	45,3 ± 3,1 (bc)	53,8 ± 3,2 (c)
4	Ferbam	50,1 ± 2,7 (cd)	46,3 ± 2,7 (bc)
5	Tebuconazole + Ferbam	60,7 ± 3,0 (e)	41,9 ± 3,0 (ab)
6	Pyraclostrobin + Ferbam	60,6 ± 2,6 (e)	35,2 ± 2,6 (a)
7	Difenoconazole + Ferbam	59,2 ± 3,0 (e)	37,5 ± 2,9 (a)
8	Testigo absoluto	35,7 ± 2,8 (a)	63,0 ± 3,2 (d)

*Medias con una letra diferente en la misma columna para cada producto son significativamente diferentes según prueba según prueba LSD de Fisher ($p < 0.05$).

La mejora obtenida en efectividad de los fungicidas sistémicos en mezcla con ferbam, concuerdan con lo descrito por Guillén-Sánchez et al. (2017) quienes aseguran que los productos multisitio, a pesar de obtener baja eficacia en ensayos *in vitro*, pueden mejorar la efectividad del control en evaluaciones en campo.

El pyraclostrobin mostró el mejor resultado en comparación a los demás sistémicos evaluados, superando al tebuconazol y difenoconazol en porcentaje de cuaje y presentando menor incidencia de cálices persistentes; contrario a los resultados obtenidos *in vitro*. Esto evidencia la importancia de complementar las evaluaciones *in vitro* con ensayos de campo para la correcta toma de

decisiones. Este resultado se puede deber, como se mencionó en la sección anterior, a un efecto de la metodología, debido a la actividad de la enzima oxidasa alternativa activa (AOX) que impulsa un mecanismo más corto que la respiración normal y puede conducir a resultados erróneos en ensayos *in vitro* (Piccirillo et al., 2018). Por lo tanto, se recomienda una siguiente evaluación de efectividad *in vitro* empleando inhibidores de AOX como enmienda.

Estos resultados, validan el ferbam como alternativa de control a incluir en el diseño de planes de manejo de *Colletotrichum* sp. asociado a caída prematura de la fruta. Se recomienda realizar una evaluación de distintas mezclas de sistémicos en comparación a las mezclas de sistémicos con ferbam, para establecer el correcto sistema de rotación a emplear. Además, deben incluirse análisis de residuos en producto final para determinar el número de ciclos a incluir.

Conclusiones

- Se identificó *Colletotrichum abscissum* en pétalos con síntomas iniciales y avanzados asociados con la caída prematura de la fruta y *C. gloeosporoides* en cálices persistentes, lo que tiene implicaciones directas en el manejo de la enfermedad debido a la mayor agresividad asociada con *C. abscissum* en relación con *C. gloeosporoides*.

- La identificación de ambas especies asociadas al daño de caída prematura de la fruta en la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica abre una ventana para investigación en alternativas de control específicas para la zona que permitan la incorporación de distintas opciones dentro de planes de manejo.

- No se recuperó ningún organismo en pétalos sin síntomas, esto se podría deber a que *Colletotrichum* presente únicamente una fase necrotrófica en pétalos de flores de naranja. Aunque se necesita más investigación, este comportamiento permitiría evaluar de forma más precisa la incidencia de la enfermedad en las plantaciones, su relación con condiciones climáticas y establecer más certeramente estrategias de control.

- Se identificó *Fusarium* spp. en pedicelos, con dos coincidencias; *Fusarium incarnatum* y *F. keratoplasticum*.

- Los fungicidas con mejor efectividad *in vitro* fueron los triazoles, tebuconazol y difenoconazol, en ese orden. El pyraclostrobin demostró poca eficacia sobre la inhibición de ambos aislados.

- En campo el pyraclostrobin mostró el mejor combate de la enfermedad, determinado en el mayor porcentaje de cuaje y presentando menor incidencia de cálices persistentes.

- El ferbam resultó poco eficaz en las pruebas *in vitro*. Sin embargo, en la evaluación en campo al ser aplicado en mezcla con fungicidas sistémicos permitió aumento en porcentaje de cuaje y una disminución en incidencia de cálices persistentes. Estos resultados, validan el ferbam como alternativa de control a incluir en el diseño de planes de manejo de *Colletotrichum* sp asociado a caída prematura de la fruta.

- Este trabajo brinda información y herramientas para la incorporación de medidas de monitoreo y control de la enfermedad; como un aporte para el diseño de planes de manejo integral que permitan desarrollar un sistema productivo sostenible.

Recomendaciones

- Esta evaluación puede ser usada como línea de base para futuros ensayos de monitoreo dirigidos en los aislamientos obtenidos de *C. abscissum* y *C. gloeosporioides* en la zona específica de estudio ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica.
- Ante las condiciones de cambio climático y aumento de presión de la enfermedad, la incorporación de monitoreo de sensibilidad anual de los aislamientos a los distintos fungicidas empleados es recomendable para el correcto diseño de planes de manejo integrado.
- Una vez generada una línea base de sensibilidad de cada fungicida, el uso de placas multipozos puede ser una herramienta de utilidad para el monitoreo práctico.
- Para valorar la efectividad del pyraclostrobin, se recomienda realizar una evaluación de efectividad *in vitro* empleando inhibidores de AOX como enmienda.
- Este proyecto se enfocó en validar el efecto de cada fungicida sistémico individualmente con el objetivo de servir como línea de partida. Por lo tanto, se recomienda realizar una evaluación de distintas mezclas de sistémicos en comparación a las mezclas de sistémicos con ferbam, para establecer el correcto sistema de rotación a emplear.
- Con el objetivo de evaluar el aporte de un producto multisitio dentro del diseño de planes de manejo de *Colletotrichum* se seleccionó el producto Ferbam, pero es recomendable evaluar diversas alternativas de productos multisitio, químicos y orgánicos, que podrían ser incorporados dentro de programas de rotación.
- Debido al mercado de jugo concentrado de exportación es importante validar toda estrategia de manejo con evaluaciones de residuos para determinar el número de ciclos a incluir.

Referencias

- Alvarez, L. V., Hattori, Y., Deocarís, C. C., Mapanao, C. P., Bautista, A. B., Cano, M. J. B, Nakashima, C. (2020). *Colletotrichum asianum* causes anthracnose in Philippine mango cv. Carabao. *Australasian Plant Disease Notes*, 15(1), 1-5.
- Arauz, L. F. (2011). Fitopatología. Un enfoque agroecológico. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 514 p.
- Arce-Araya, C., Varela-Benavides, I., & Torres-Portuguez, S. (2019). Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 381–393. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.32653>
- Artavia, J. (2019). *Efecto de la poda de fructificación por ventanas sobre la brotación, floración y fructificación del limón Mesina (Citrus latifolia Tan.) en Finca Artaca S.A., Heredia, Sarapiquí, Costa Rica*. [Tesis de licenciatura, Instituto Tecnológico de Costa Rica]. Repositorio TEC. <https://hdl.handle.net/2238/11146>
- Barquero, M., Peres, N., & Arauz, L. (2013). Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense*, 37(1), 23–38. <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/10710>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP). <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73, 37–113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>
- Dowling, M., Peres, N., Villani, S., & Schnabel, G. (2020). Managing *Colletotrichum* on fruit crops. A “complex” challenge. *Plant Disease*, 104(9), 2301–2316. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2378-FE>
- Elizondo Solís, J. M. (2002). Inventario y fluctuación poblacional de insectos y arañas asociadas con *Citrus sinensis* en la región Huetar Norte de Costa Rica. *Manejo integrado de plagas y Agroecología*, 64, 88-98.
- Ezrari, S., Lahlali, R., Radouane, N., Tahiri, A., Asfers, A., Boughalleb-M'Hamdi, N., & Lazraq, A. (2021). Characterization of *Fusarium* species causing dry root rot disease of citrus trees in Morocco. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 128(2), 431-447.
- Fagan, H. J. (1979). Postbloom fruit drop, a new disease of citrus associated with a form of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annals of Applied Biology*, 91(1), 13–20.

- Fungicide Resistance Action Committee. (2022). Fungal control agents sorted by-cross resistance pattern and mode of action (including coding for FRAC Groups on product labels). Consultado el 12 de julio, 2022, de https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2022--final.pdf?sfvrsn=b6024e9a_2
- Fungicide Resistance Action Committee. (n.d.). FRAC-Recommendations for Resistance Management for QoI Fungicides. Consultado en junio 06, 2022, de <https://www.frac.info/frac-teams/working-groups/qol-fungicides/recommendations-for-qoi>
- Gama, A., Baggio, J., Rebello, C., Lourenço, S., de Gasparoto, M., da Silva, G., Peres, N., & Amorim, L. (2020). Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* isolates from citrus to carbendazim, difenoconazole, tebuconazole, and trifloxystrobin. *Plant Disease*, 104(6), 1621–1628. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-19-2195-RE>
- Gao, Y. Y., He, L. F., Li, B. X., Mu, W., Lin, J., & Liu, F. (2017). Sensitivity of *Colletotrichum acutatum* to six fungicides and reduction in incidence and severity of chili anthracnose using pyraclostrobin. *Australasian Plant Pathology*, 46(6), 521–528. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0518-8>
- Ghini, R., Bettioli, W., & Hamada, E. (2011). Diseases in tropical and plantation crops as affected by climate changes: current knowledge and perspectives. *Plant pathology*, 60(1), 122–132.
- Guarnaccia, V., Gilardi, G., Martino, I., Garibaldi, A., & Lodovica-Gullino, M. (2019). Species diversity in *Colletotrichum* causing anthracnose of aromatic and ornamental *Lamiaceae* in Italy. *Agronomy*, 9(10), 613. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100613>
- Guerber, J., Liu, B., Correll, J. & Johnston, P. (2003). Characterization of diversity in *Colletotrichum acutatum* sensu lato by sequence analysis of two gene introns, mtDNA and Intron RFLPs, and mating compatibility. *Mycologia*, 95(5), 872–895.
- Guillén-Sánchez, D., Cadenas-Vásquez, C., Alia-Tejaca, I., López-Martínez, V., Andrade-Rodríguez, M., & Juárez-Lopez, P. (2017). Inhibición colonial *in vitro* de un aislado de *Colletotrichum acutatum* Simmonds a tratamientos con fungicidas. *Revista Centro Agrícola*, 44(4), 11–16.
- Han, Y., Zeng, X., Xiang, F., Zhang, Q., Guo, C., Chen, F., & Gu, Y. (2018). Carbendazim sensitivity in populations of *Colletotrichum gloeosporioides* complex infecting strawberry and yams in Hubei Province of China. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(6), 1391–1400. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61854-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61854-9)
- Hernández, C. (2016). Especies de *Fusarium* y *Penicillium* asociadas a frutales en los departamentos del Cauca y Valle de Cauca, Colombia. [Tesis de maestría, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio institucional. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56918>
- Instituto Internacional de Estadísticas y Censos (INEC). (2018). Encuesta nacional agropecuario 2018. Resultados generales de la actividad agrícola y forestal. Consultado en agosto, 2022 de

<https://www.inec.go.cr/documento/ena-2018-resultados-generales-de-la-actividad-agricola-y-forestal>

- International Trade Center. (2022). Trade Map. Trade statistics for international business development. Consultado en junio 06, 2022 de <https://www.trademap.org/Index.aspx>
- Jayawardena, R. S., Bhunjun, C. S., Hyde, K. D., Gentekaki, E., & Itthayakorn, P. (2021). *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species.
- Jiménez J. (2012). Cadena agroalimentaria de los cítricos. Ministerio de Agricultura y Ganadería. Consultado en junio 06, 2022 de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-11054.pdf>
- Khamsaw P., Sangta J., Chaiwan P., Rachtanapun P., Sirilun S., Sringarm K., Thamakkasaranee S., Sommano S. (2022). Bio-Circular Perspective of Citrus Fruit Loss Caused by Pathogens: Occurrences, Active Ingredient Recovery and Applications. *Horticulturae*, 8(8), 748.
- 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(1), 157–165. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9795-1>
- Liu Y., Heying E., Tanumihardjo S. 2012. History, global distribution and Nutritional Importance of Citrus Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11.
- MacKenzie S, Peres N, Timmer L. (2010). Colonization of citrus leaves and secondary conidiation response to citrus flower extracts by non-postbloom fruit drop strains of *Colletotrichum acutatum*. *Tropical Plant Pathology*. 35(6), 333-342.
- MacKenzie S., Peres N., Barquero M., Arauz L., Timmer L. (2009). Host range and genetic relatedness of *Colletotrichum acutatum* isolates from fruit crops and leatherleaf fern in Florida. *Phytopathology*. 99, 620-631.
- Marques, J., Amorim, L., Spósito, M., & Appezzato-da-Glória, B. (2013). Histopathology of postbloom fruit drop caused by *Colletotrichum acutatum* in citrus flowers. *European Journal of Plant Pathology*, 135(4), 783–190.
- Mateus Cagua, D & Ordúz Rodríguez, J. (2012). Generalidades de los cítricos y recomendaciones agronómicas para su cultivo en Colombia. En *Cítricos. Cultivo, poscosecha e industrialización*. Corporación Universitaria Lasallista, 48-87 p.
- Molina, E., & Rojas, A. (2005). Efecto del encalado en el cultivo de naranja valencia en la Zona Norte de Costa Rica. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 29(3), 81-95.
- Mongkolporn, O., & Taylor, P. W. J. (2018). Chili anthracnose: *Colletotrichum* taxonomy and pathogenicity. *Plant Pathology*, 67(6), 1255-1263.

- Morera, J. A. (2000). Agricultura, recursos naturales, medio ambiente y desarrollo sostenible en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 11(1), 179-185.
- Naqvi, S. A. M. H. (2004). Diagnosis and management of certain important fungal diseases of citrus. *En Diseases of Fruits and Vegetables*, 1, 247-290. Springer, Dordrecht.
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7(1), 103–116.
- Peña, J. E., & Duncan, R. (1989). Role of arthropods in the transmission of postbloom fruit drop. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, 102, 249-251.
- Peres, N. & Dewdney, M. (2021). 2021–2022 Florida Citrus Production Guide: Postbloom Fruit Drop. CG007/PP-45, rev. 4/2021. *EDIS*, 2021(CPG). <https://doi.org/10.32473/edis-cg007-2021>
- Peres, N., MacKenzie, S., Peever, T., & Timmer, L. (2008). Postbloom fruit drop of citrus and key lime anthracnose are caused by distinct phylogenetic lineages of *Colletotrichum acutatum*. *Phytopathology*, 98(3), 345–352. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-3-0345>
- Peres, N., Souza, N., Furtado, E., & Timmer, L. (2004). Evaluation of systems for timing of fungicide sprays for control of postbloom fruit drop of citrus in Brazil. *Plant disease*, 88(7), 731–735. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.7.731/>
- Piccirillo, G., Carrieri, R., Polizzi, G., Azzaro, A., Lahoz, E., Fernández-Ortuño, D., & Vitale, A. (2018). *In vitro* and *in vivo* activity of QoI fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing fruit anthracnose en *Citrus sinensis*. *Scientia Horticulturae*, 236, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.044>
- Pinho, D., Lopes, U., Pereira, O., Silveira, A., & Goes, A. (2015). Fungal planet description sheets: 320–370, *Colletotrichum abscissum*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 34(1), 236. <https://doi.org/10.3767/003158515X688433>
- Ramos A., Talhinhos P., Sreenivasaprasad S., Oliveira H. (2016). Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides*, as the main causal agent of citrus anthracnose, and *C. karstii* as species preferentially associated with lemon twig dieback in Portugal. *Phytoparasitic*, 44, 549-561.
- Rangel, B. C. S., & González, F. H. V. (Eds.). (2022). *Buenas prácticas para el cumplimiento de los Objetivos del Desarrollo Sostenible* (Vol. 4). Cuvillier Verlag.
- Rodrigo-Cano, D., Picó, M. J., & Dimuro, G. (2019). Los Objetivos de Desarrollo Sostenible como marco para la acción y la intervención social y ambiental. *RETOS. Revista de Ciencias de la Administración y Economía*, 9(17), 25-36.
- Rogers, S., & Bendich, A. (1988). Extraction of DNA from plant tissues. In S. Gelvin, R. Schilperoort, & D. Verma (Eds.), *Plant molecular biology manual* (Springer, Dordrecht, pp. 73–83).

- Rojo-Báez I., Álvarez-Rodríguez B., García-Estrada R., León-Felix J., Saludos-Barajas A., Allende-Mollar R. (2017). Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México. Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 549-570.
- Ruiz-Campos, C., Umaña-Rojas, G., & Gómez-Alpizar, L. (2021). Identificación multilocus de especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis de papaya. *Agronomía Mesoamericana*, 33(1), 1–18. <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.45495>
- Sáenz, C., Osorio, E., Estrada, B., Poot, W., Delgado, R., & Rodríguez, R. (2019). Principales enfermedades en cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(7), 1653–1665.
- Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A., & Gómez-Alpizar, L. (2012). Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agronomía Costarricense*, 36(1), 53–68.
- Sánchez-Torres P. (2021). Molecular mechanisms underlying fungicide resistance in citrus postharvest green mold. *Journal of Fungi*, 7(9), 783. DOI: 10.3390/jof7090783.
- Santamaría, F., Días, R., Gutiérrez, O., Santamaría, J., & Larqué, A. (2011). Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya maradol. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(5), 631–643.
- Savi, D., Rossi, B., Rossi, G., Ferreira-Maba, L., Bini, I., Trindade, E., Goulin, E., Machado, M., & Glienke, C. (2019). Microscopic analysis of colonization of *Colletotrichum abscissum* in citrus tissues. *Microbiological Research*, 226, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.05.005>
- Schiller, M., Lübeck, M., Sundelin, T., Melendez, L. F. C., Danielsen, S., Jensen, D. F., & Ordenana, K. M. (2006). Two subpopulations of *Colletotrichum acutatum* are responsible for anthracnose in strawberry and leatherleaf fern in Costa Rica. *European Journal of Plant Pathology*, 116(2), 107–118.
- Sharma, G., Maymon, M., & Freeman, S. (2017). Epidemiology, pathology, and identification of *Colletotrichum* including a novel species associated with avocado (*Persea americana*) anthracnose in Israel. *Scientific Reports*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15946-w>
- Silva, A., Savi, D., Gomes, F., Gos, F., Silva, G., & Glienke, C. (2017). Identification of *Colletotrichum* species associated with postbloom fruit drop in Brazil through GAPDH sequencing analysis and multiplex PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 147(4), 731-748.
- Silva, G. (2011). Podridão floral dos citros: dinâmicas temporal e espacial, sensibilidade de *Colletotrichum acutatum* a fungicidas e controle da doença [Tesis de doctorado, Universidade de São Paulo]. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP. <https://doi.org/10.11606/T.11.2011.tde-13092011-095157>

- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Al-Hatmi, A., Karlovsky, P., Ahmed, S. A., Maier, W., & Finckh, M. R. (2018). The 'forma specialis' issue in Fusarium: a case study in *Fusarium solani* f. sp. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-17.
- Sreenivasaprasad, S., Sharada, K., Brown, A. E., & Mills, P. R. (1996). PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *Plant pathology*, *45*(4), 650-655.
- Talhinhas, P., & Baroncelli, R. (2021). *Colletotrichum* species and complexes: Geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity*, *110*(1), 109-198.
- Tamayo, C. V., & Alegre, J. C. (2022). Asociación de cultivos, alternativa para el desarrollo de una agricultura sustentable. *Siembra*, *9*(1).
- Timmer, L.W., Duncan, L. W. 1999. *Citrus Health Management*. APS Press. 221 p.
- Timmer, L. W., Mondal, S. N., Peres, N. A. R., & Bhatia, A. (2004). Fungal diseases of fruit and foliage of citrus trees. En *Diseases of Fruits and Vegetables*, *1*, 191-227. Springer, Dordrecht.
- Timmer, L., & Peres, N. (2015). Where have all the flowers gone? Postbloom fruit drop of citrus in the Americas. *Journal of Citrus Pathology*, *2*(1), 1–6. <https://doi.org/10.5070/C421028302>
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I., Martin-Mex, R., Nexticapan-Garcez, A., & Perez-Brito, D. (2015). Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four Arce-Araya, C., Varela-Benavides, I., & Torres-Portuguez, S. (2019). Inhibition of mycelial growth of fungi associated with anthracnose in yam (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, *30*(2), 381–393. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.32653>
- United States Department of Agriculture. (2020). *Citrus Annual*. Consultado en julio 11, 2022 de <https://www.fas.usda.gov/>
- Wharton, P. & Diéguez-Urbeondo, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, *61*(1), 3–22. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61>
- White, T., Bruns, T., Lee, S & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*, *18*(1), 315–322.
- Wu, C. J., Chen, H. K., & Ni, H. F. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with mango anthracnose in Taiwan. *European journal of plant pathology*, *157*(1), 1-15.