



## Especies de *Colletotrichum* asociados a la antracnosis en naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y su control *in vitro* con fungicidas<sup>1</sup>

### *Colletotrichum* species associated with anthracnose in orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) and its *in vitro* control with fungicides

María José Guillén-Carvajal<sup>2</sup>, Gerardina Umaña-Rojas<sup>3</sup>, Ingrid Varela-Benavides<sup>4</sup>

- <sup>1</sup> Recepción: 22 de agosto, 2022. Aceptación: 8 de noviembre, 2022. Este trabajo formó parte de los resultados de la tesis de maestría “Identificación de los principales hongos asociados a la antracnosis en cítricos y evaluación de cuatro fungicidas para su manejo en una finca productora de naranja ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica”, realizado en Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico local San Carlos. Apartado 159-7050, Florencia, Alajuela, Costa Rica.
- <sup>2</sup> Del Oro S. A. La Cruz, La Cruz, Guanacaste. Tel. (506) 2679-5800. [mguillen@delorocr.com](mailto:mguillen@delorocr.com) (autor para correspondencia, <https://orcid.org/0000-0002-2164-9795>).
- <sup>3</sup> Universidad de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Centro de Investigaciones Agronómicas. San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica. [gerardina.umana@ucr.ac.cr](mailto:gerardina.umana@ucr.ac.cr) (<https://orcid.org/0000-0002-6368-5225>).
- <sup>4</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Escuela de Agronomía, Campus Tecnológico local San Carlos. Apartado 159-7050, Florencia, Alajuela, Costa Rica. [invarela@itcr.ac.cr](mailto:invarela@itcr.ac.cr) (<https://orcid.org/0000-0003-1210-2664>).

## Resumen

**Introducción.** El cultivo de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) es uno de los de mayor importancia a nivel mundial. Dentro de las principales limitantes en su producción está la caída de flores ocasionada por *Colletotrichum*. **Objetivo.** Determinar las especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en naranja y estimar la efectividad *in vitro* de cuatro fungicidas sobre su control. **Materiales y métodos.** Este estudio se llevó a cabo entre junio del 2021 y febrero del 2022. Seis aislamientos de hongos, obtenidos de tejidos florales de naranja, fueron identificados vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se evaluó la eficacia de los fungicidas tebuconazol, pyraclostrobin, difenoconazol y ferbam sobre dos aislamientos de *Colletotrichum*. Se realizaron dos ensayos para determinar el grado de inhibición del crecimiento micelial y el porcentaje de efectividad de cada fungicida. **Resultados.** *Colletotrichum abscissum* se identificó en pétalos con síntomas y *Colletotrichum gloeosporioides* en cálices. Se verificó la efectividad de la dosis empleada de los fungicidas tebuconazol y difenoconazol, al presentar inhibición del crecimiento micelial a partir de la décima parte de la dosis comercial evaluada. El pyraclostrobin demostró poco control sobre ambos aislados. El ferbam no presentó un control eficiente en ninguna de las dosis evaluadas en ambas cepas. **Conclusión.** Los hongos asociados a la antracnosis en naranja, en la finca estudiada, fueron *C. abscissum*, presente en pétalos con síntomas iniciales y avanzados, y *C. gloeosporioides* presente en cálices persistentes. La efectividad de los fungicidas evaluados fue mayor para los triazoles, tebuconazol y difenoconazol, en ese orden. El pyraclostrobin evidenció un control deficiente sobre ambos aislados. El ferbam resultó poco eficaz en las pruebas *in vitro*.

**Palabras clave:** enfermedades fúngicas, cítricos, plaguicidas.



## Abstract

**Introduction.** Orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) cultivation is one of the most important worldwide. Among the main limitations in its production is the fall of flowers caused by *Colletotrichum*. **Objective.** To determine the species of *Colletotrichum* associated with anthracnose in orange and to estimate the *in vitro* effectiveness of four fungicides on its control. **Materials and methods.** This study was carried out between June 2021 and February 2022. Six fungal isolates, obtained from orange floral tissues, were identified via polymerase chain reaction (PCR). The efficacy of the fungicides tebuconazole, pyraclostrobin, difenoconazole, and ferbam on two *Colletotrichum* isolates was evaluated. Two tests were carried out to determine the degree of inhibition of mycelial growth and the percentage of effectiveness of each fungicide. **Results.** *Colletotrichum abscissum* was identified on petals with symptoms and *Colletotrichum gloeosporioides* on calyxes. The effectiveness of the doses used of the fungicides tebuconazole and difenoconazole was verified by presenting inhibition of mycelial growth from a tenth of the commercial dose evaluated. Pyraclostrobin showed little control over both isolates. Ferbam did not present an efficient control in any of the doses evaluated in both strains. **Conclusion.** The fungi associated with anthracnose in orange, on the farm studied, were *C. abscissum*, present on petals with initial and advanced symptoms, and *C. gloeosporioides* present on persistent calyxes. The effectiveness of the fungicides evaluated was higher for triazoles, tebuconazole, and difenoconazole, in that order. Pyraclostrobin showed a poor control on both isolates. Ferbam was not effective in *in vitro* tests.

**Keywords:** fungal diseases, citrus, pesticides.

## Introducción

El cultivo de los cítricos es una de las actividades de mayor importancia económica a nivel mundial (Artavia Mejía, 2019). La demanda es muy estable, pero el consumo de cítricos en mercados como la Unión Europea, aumentó por el interés de los consumidores por fortalecer su sistema inmune debido a la enfermedad COVID 19 (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, n.d).

La producción de los cítricos enfrenta diversos retos. Entre los principales problemas fitosanitarios está la caída prematura de la fruta, la cual es causada por *Colletotrichum* (Sáenz Pérez et al., 2019; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Esta enfermedad fue reportada en Belice en el año 1979 (Fagan, 1979). Se ha detectado en muchas áreas tropicales húmedas, donde se considera un factor limitante a la producción, en especial en Centroamérica y Brasil (Rodrigues Marques et al., 2020; Timmer & Peres, 2015), esto porque el hongo ocasiona la abscisión de frutos jóvenes y retención de cálices, lo que a su vez genera pérdidas de hasta un 93 % (Peres et al., 2004).

Las especies del género *Colletotrichum*, considerado el agente causal de la caída prematura de la fruta, son hongos ascomicetos de importancia mundial, distribuidos en zonas tropicales y subtropicales (Sharma et al., 2017; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Antes, su identificación se basaba en características morfológicas como la forma de los conidios, el color de la colonia, la tasa de crecimiento, entre otros (Barquero Quiros et al., 2013); pero con base en estudios posteriores, se determinó que, por ejemplo, no es posible diferenciar entre *C. acutatum sensu lato* (*s.l.*) y *C. gloeosporioides* (*s.l.*) solo por características morfológicas, dado a que existen muchas cepas intermedias que se han desarrollado por influencias ambientales y múltiples hospederos (Damm et al., 2012; Peres et al., 2008; Ruiz-Campos et al., 2021).

*Colletotrichum* está conformado por al menos once complejos de especies y cada complejo agrupa varias especies indistinguibles a nivel morfológico, pero diferentes a nivel genético (Ruiz-Campos et al., 2021). Otra

característica empleada para la identificación ha sido la evaluación de la sensibilidad a benomil (Barquero Quiros 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). Mediante las técnicas moleculares, se ha encontrado que, en el caso específico de *Colletotrichum*, se han identificado diversas cepas con el uso de PCR con imprimadores especie-específicos y secuenciación de la región ITS (Ruiz-Campos et al., 2021).

En Costa Rica, *C. acutatum* se identificó en naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y limón criollo (*Citrus aurantifolia*), con presencia en flores de naranja (Peres et al., 2008) y en tejidos foliares, flores o inflorescencias de limón criollo (Barquero Quiros et al., 2013). El manejo de la enfermedad en plantaciones comerciales se ha basado en aplicaciones de fungicidas (Peres et al., 2004). El carbendazim, perteneciente a la familia de los benzimidazoles, se empleó a nivel comercial hasta el año 2012, cuando Estados Unidos implementó restricciones debido a la presencia de residuos en el jugo concentrado de naranja (Gama et al., 2020).

La cantidad de fungicidas disponibles en el mercado, con distintos modos de acción y avalados para el uso en cítricos, es baja (da Silva Junior, 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 (QoIs) como trifloxystrobin, azoxistrobin o pyraclostrobin (Gama et al., 2020). Sumado a esto, las condiciones de cambio climático con diversas floraciones en el año, aumentan la presión de inóculo en campo lo que dificulta aún más el control (Peres et al., 2004).

El objetivo del presente trabajo fue determinar las especies de *Colletotrichum* asociadas a la antracnosis en naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) y estimar la efectividad *in vitro* de cuatro fungicidas sobre su control.

## Materiales y métodos

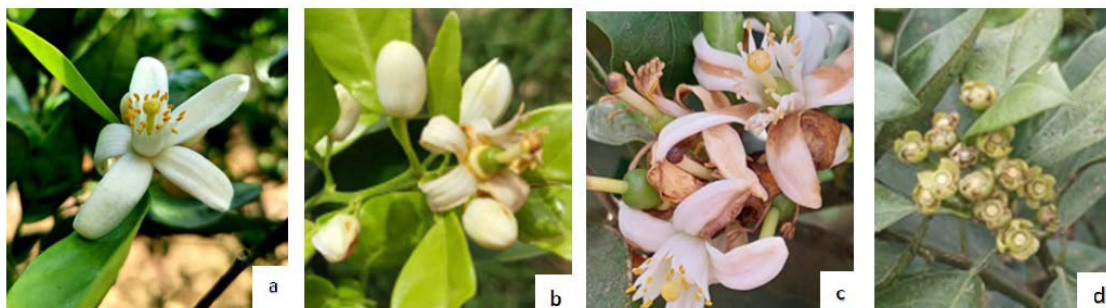
### Localización del estudio, muestreo y aislamiento de los hongos

La recolección de las muestras de tejidos de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osb.), sanas y enfermas, 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 m s. n. m., con una precipitación anual promedio de 3858 mm, una temperatura media anual de 23 °C y una humedad relativa de 90 %. Se seleccionó un área sembrada en el año 2014, con la variedad Valencia injertada sobre el patrón Flying Dragon y una densidad de siembra de 1000 árboles/ha. Las muestras se recolectaron entre junio-julio del 2021 en la época de floración.

Se colectaron tres tipos de tejidos florales con diferente grado de sintomatología: pétalos sin síntomas, pétalos con síntomas iniciales, pétalos con síntomas avanzados, cálices y pedicelos (Figura 1). Se consideró como síntoma inicial, la presencia de lesiones pequeñas de color naranja claro y como síntoma avanzado lesiones alargadas de color café en los pétalos.

Para cada tipo de tejido se recolectaron tres muestras, cada muestra de un árbol seleccionado al azar dentro de la plantación, del cual se tomaron 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 h. A partir de los tejidos recolectados, se realizaron aislamientos de hongos, los cuales se reprodujeron para obtener cultivos monospóricos, según la metodología descrita por Cañedo y Ames (2004). Los aislamientos se almacenaron en cajas Petri con PDA y en refrigeración a una temperatura entre 2 °C y 4 °C.

El trabajo 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. Se inició en junio de 2021 y se finalizó en febrero de 2022.



**Figura 1.** Tejidos de naranja (*Citrus sinensis*) 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.

**Figure 1.** Harvested orange tissues (*Citrus sinensis*) for fungi isolation: petals without symptoms (a), petals with early symptoms (b), petals with advanced symptoms (c), calyx and pedicel (d). Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

### Identificación molecular de los aislamientos

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 recuperados a partir de los síntomas que 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 y Bendich (1989). 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, con los imprimadores ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (White et al., 1990). Además, se realizaron dos amplificaciones más para cada aislamiento, una de la región  $\beta$ -Tubulin 2 (TUB) y otro de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), ambas regiones empleadas para la identificación de especies de *Colletotrichum* (Guerber et al., 2003). Para TUB se utilizaron los imprimadores T1 (5'AACATGCGTGAGATTGTAAGT3') y Bt2b (5'ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC3') (O'Donnell & Cigelnik, 1997), y para GAPDH los imprimadores GDF (5'GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA3') y GDR (5'GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT3') (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 (Hall, 1999) 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).

### Efectividad *in vitro* de cuatro fungicidas sobre el control de los aislamientos de especies de *Colletotrichum*

Se llevaron a cabo dos ensayos de evaluación *in vitro*, el primero mediante la técnica del medio enmendado y el segundo mediante el método de difusión en agar, con el objetivo de comparar los resultados obtenidos con ambas metodologías y verificar la viabilidad del uso de placas multipozos como herramienta de monitoreo de sensibilidad.

### 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 1).

**Cuadro 1.** Fungicidas seleccionados para evaluación *in vitro* de la inhibición de hongos aislados de tejidos florales de naranja (*Citrus sinensis*) colectados en una plantación de naranja en Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

**Table 1.** Selected fungicides for *in vitro* evaluation of the inhibition of fungi isolated from floral tissues collected in an orange (*Citrus sinensis*) plantation in Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Nombre común	Nombre químico	Grupo químico	Modo de acción	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	Sistémico	3
Pyraclostrobin	Metil N-{2-[1-(4-Clorofenil)-1H-Pirazol-3-il]oximetil}(N-metoxi)carbamato	Methoxy-carbamato	Sistémico	11
Tebuconazol	1-(4-Chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-3-pentanol	Triazol	Sistémico	3
Ferbam	Dimetilditiocarbamato de hierro (III)	Ditiocarbamato	De contacto	-

\* Tomado de: / Taken from: Fungicide Resistance Action Committee (2020).

Se realizaron ensayos de inhibición por medio de la técnica del medio enmendado. Se emplearon 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 de cada fungicida, además de un testigo. Las concentraciones fueron elegidas y calculadas a partir de la dosis comercial recomendada del producto (Cuadro 2). Para cada aislamiento se realizó un total de cuatro repeticiones por concentración.

**Cuadro 2.** Concentraciones de los fungicidas utilizados para la evaluación de su actividad por el método de enmendado sobre aislamientos fúngicos obtenidos de cultivo de naranja (*Citrus sinensis*). Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

**Table 2.** Concentrations of the fungicides used for the evaluation of their activity by the amended method on fungal isolates obtained from orange (*Citrus sinensis*) plantation. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Nombre químico	Concentración (mg i.a L <sup>-1</sup> )					
	1	2	3	4	5	6
	-	D.C/1000	D.C/100	D.C/10	D.C	2(D.C)
Difenoconazol	0	0,05	0,50	5,0	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	15,20	152,0	1520	3040

\*D.C: dosis comercial. / \*D.C: commercial doce.

Una vez preparado el medio enmendado, en cada pozo se colocaron 50  $\mu\text{L}$  de suspensión de esporas con una concentración de  $1 \times 10^5$  conidios/mL. Las placas se incubaron a 25 °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 en el medio de cultivo daba una turbidez igual al testigo, control parcial si el crecimiento de micelio presentó una turbidez inferior al testigo y control total en los casos en los cuales no se obtuvo crecimiento de micelio.

### **Segundo ensayo: determinación del porcentaje de efectividad mediante el método de difusión en agar**

Se seleccionaron cuatro fungicidas a evaluar (Cuadro 1) mediante la técnica de difusión en agar, con base en la metodología empleada por Arce-Araya et al. (2019). Para cada fungicida se consideraron las concentraciones de uno a cinco detalladas en el Cuadro 2. Se realizaron cuatro repeticiones por concentración, donde una repetición fue una caja Petri de 8,5 cm de diámetro con PDA, la cual se inoculó con 150  $\mu\text{L}$  de suspensión de esporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL. La suspensión se distribuyó de forma homogénea por toda la caja con ayuda de un asa de Drigalsky estéril. Luego, se colocó en el centro de la caja un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, impregnado con fungicida a una concentración determinada (Cuadro 2). En el tratamiento testigo se colocó un papel filtro con agua esterilizada.

Las cajas 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, en las cuales se midió 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.

### **Análisis de datos**

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

## **Resultados**

### **Identificación de aislamientos fúngicos**

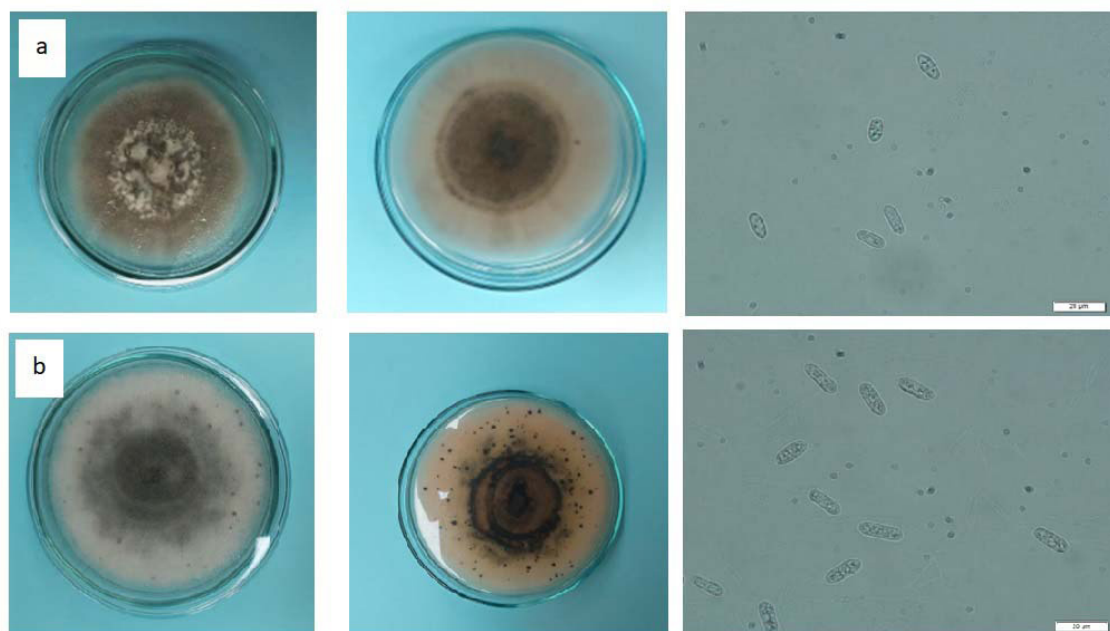
Los aislamientos obtenidos a partir de pétalos con síntomas iniciales y avanzados, se identificaron como *Colletotrichum abscissum*. Mientras el aislamiento obtenido en cálices correspondió a *Colletotrichum gloeosporioides*. En las muestras de pedicelos se encontró un aislamiento perteneciente al género *Fusarium* (Cuadro 3). En el caso de pétalos sin síntomas, no se obtuvo crecimiento micelial en ninguna de las repeticiones.

Para las evaluaciones de inhibición del crecimiento micelial y porcentaje de efectividad de los fungicidas, se seleccionaron el aislamiento de *C. gloeosporioides*, proveniente de cálices y el aislamiento tres de *C. abscissum* proveniente de pétalos con síntomas (Figura 2).

**Cuadro 3.** Aislamientos fúngicos obtenidos en una finca productora de naranja (*Citrus sinensis*) ubicada en la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

**Table 3.** Fungal isolates obtained in an orange (*Citrus sinensis*) producing farm located in 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



**Figura 2.** Aislamientos de *Colletotrichum abscissum* obtenido de pétalos con síntomas iniciales (A) y *Colletotrichum gloeosporioides* a partir de cáliz (B) en una plantación de naranja (*Citrus sinensis*) ubicada en Brasilia, Alajuela, Costa Rica.

**Figure 2.** Isolates of *Colletotrichum abscissum* obtained from petal with initial symptoms (A) and *Colletotrichum gloeosporioides* from calyx (B) in an orange (*Citrus sinensis*) producing farm located in Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

**Primer ensayo: inhibición del crecimiento micelial por medio de la técnica del medio enmendado**

El mejor control se obtuvo con el tebuconazol, el cual a los tres días de establecido el ensayo, inhibió por completo el crecimiento de micelio para ambos aislamientos, a partir de una concentración de 7,5 mg L<sup>-1</sup> i.a y se mantuvo en la evaluación a los cinco días. El difenoconazol mostró inhibición del crecimiento de *C. abscissum* y *C. gloeosporioides* a partir de 5 mg L<sup>-1</sup> i.a. Sin embargo, a los cinco días de establecido el ensayo presentó un efecto parcial sobre el crecimiento del hongo en dichas concentraciones (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Evaluación del grado de inhibición del crecimiento micelial con cuatro fungicidas a distintas concentraciones sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum abscissum* aislados de flores de naranja (*Citrus sinensis*). Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

**Table 4.** Evaluation of the degree of inhibition of mycelial growth with four fungicides at different concentrations on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum abscissum* isolated from orange (*Citrus sinensis*) flowers. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Producto	Concentración (mg L <sup>-1</sup> i.a)	Grado de inhibición del crecimiento micelial	
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum abscissum</i>
<b>Tebuconazol</b>	0,00	Nulo	Nulo
	0,08	Nulo	Nulo
	0,75	Parcial	Parcial
	7,50	Total	Total
	75,00	Total	Total
	100,00	Total	Total
<b>Difenoconazol</b>	0,00	Nulo	Nulo
	0,05	Nulo	Nulo
	0,50	Parcial	Parcial
	5,00	Total	Total
	50,00	Total	Total
	100,00	Total	Total
<b>Pyraclostrobin</b>	0,00	Nulo	Nulo
	0,04	Nulo	Nulo
	0,38	Nulo	Nulo
	3,80	Parcial	Parcial
	38,00	Parcial	Parcial
	75,00	Parcial	Parcial
<b>Ferbam</b>	0,00	Nulo	Nulo
	1,52	Nulo	Nulo
	15,20	Parcial	Nulo
	152,00	Parcial	Nulo
	1520,00	Parcial	Parcial
	3040,00	Parcial	Parcial

Se consideró 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. / Null control was considered a mycelial growth equal to the control, partial mycelial growth less than the control, and total control when no mycelial growth was obtained.

El pyraclostrobin no presentó un control total de los aislamientos con ninguna de las concentraciones evaluadas. A los tres días, se obtuvo una eficacia parcial a partir de 3,8 mg i.a L<sup>-1</sup>. En la evaluación a los cinco días después de establecido el ensayo, en todas las concentraciones se obtuvo crecimiento total de ambos aislamientos (Cuadro 4).

Para *C. gloeosporioides* el ferbam presentó un control parcial a partir de 15,2 mg L<sup>-1</sup> i.a y a partir de 1520 mg L<sup>-1</sup> i.a para *C. abscissum*. En la evaluación a los cinco días en todas las concentraciones se obtuvo crecimiento total de ambos aislamientos (Cuadro 4).

### Segundo ensayo: Determinación del porcentaje de efectividad mediante el método de difusión en agar

El tebuconazole presentó control sobre el crecimiento de los aislados a partir de 7,5 mg L<sup>-1</sup> i.a, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el primer ensayo. No se registró efecto en relación con el testigo con concentraciones menores. El difenoconazol fue eficaz a partir de 5 mg L<sup>-1</sup> i.a, lo que coincide de igual manera con los resultados del primer ensayo (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Porcentaje de efectividad *in vitro* de cuatro fungicidas a distintas concentraciones sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum abscissum* aislados de flores de naranja (*Citrus sinensis*). Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

**Table 5.** *In vitro* effectiveness percentage of four fungicides at different concentrations on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum abscissum* isolated from orange (*Citrus sinensis*) flowers. Brasilia, Alajuela, Costa Rica. 2021.

Producto	Concentración (mg L <sup>-1</sup> i.a)	% efectividad <i>in vitro</i>	
		<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum abscissum</i>
<b>Tebuconazol</b>	0,00	0,0 (a)	0,0 (a)
	0,08	0,0 (a)	0,0 (a)
	0,75	0,0 (a)	0,0 (a)
	7,50	12,5±7,2 (a)	21,9±3,1 (b)
	75,00	33,8±2,9 (b)	45,0±3,1 (c)
<b>Difenoconazol</b>	0,00	0,0 (a)	0,0 (a)
	0,05	0,0 (a)	0,0 (a)
	0,50	0,0 (a)	0,0 (a)
	5,00	10,6±3,7 (b)	30,0±3,1 (b)
	50,00	39,4±1,2 (c)	37,5±0,0 (c)
<b>Pyraclostrobin</b>	0,00	0,0 (a)	0,0 (a)
	0,04	0,0 (a)	0,0 (a)
	0,38	0,0 (a)	0,0 (a)
	3,80	0,0 (a)	46,9±3,1 (b)
	38,00	3,1±3,1 (a)	43,8±3,6 (b)
<b>Ferbam</b>	0,00	0,0 (a)	0,0 (a)
	1,52	0,0 (a)	0,0 (a)
	15,20	0,0 (a)	0,0 (a)
	152,00	0,0 (a)	0,0 (a)
	1520,00	0,0 (a)	10,6±1,2 (b)

Los valores presentados son el promedio de las cuatro repeticiones. El análisis estadístico debe interpretarse verticalmente, para cada producto por separado. Medias con una letra diferente en la misma columna para cada producto son significativamente diferentes según prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). / The values presented are the average of the four repetitions. The statistical analysis must be interpreted vertically, for each product separately. Means with a different letter in the same column for each product are significantly different according to Tukey's test ( $p < 0,05$ ).

En el caso del pyraclostrobin, para *C. gloeosporioides*, no resultó estadísticamente diferente del testigo, con un 95 % de confiabilidad, en ninguna de las concentraciones evaluadas. Mientras que para *C. abscissum*, a partir de 3,8 mg L<sup>-1</sup> i.a se obtuvo control sobre el desarrollo del hongo (Cuadro 5). Sin embargo, a diferencia del tebuconazol y difenoconazol, el pyraclostrobin presentó un crecimiento de micelio menor al testigo, lo que evidencia un efecto, pero no una inhibición del crecimiento.

El ferbam solo presentó control en el tratamiento de 1520 mg L<sup>-1</sup> i.a para el aislamiento *C. abscissum* (Cuadro 5).

## Discusión

*Colletotrichum abscissum* se identificó en pétalos con síntomas iniciales y avanzados asociados a la caída prematura de la fruta de naranja, lo cual coincide con lo reportado en literatura, con *C. acutatum* como principal agente causal de esta enfermedad (Guerreiro Lima et al., 2011; Savi et al., 2019; Timmer & Peres, 2015), ya que *C. abscissum* pertenece al complejo de *C. acutatum* (Guarnaccia et al., 2019) y fue reclasificado por Crous et al. (2015). La identificación 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 señalaron que *C. gloeosporioides* es más eficiente en colonizar e infectar tejidos vegetativos, mientras *C. acutatum* infecta con más frecuencia las frutas o tejidos reproductivos.

La menor presencia de *C. gloeosporioides* con relación a *C. abscissum* en los aislamientos obtenidos, se pudo deber a lo descrito por Guerreiro Lima et al. (2011), en donde la incidencia de la enfermedad fue menor en plantas inoculadas con *C. gloeosporioides*, lo que limita así su predominancia; lo obtenido también coincide con lo reportado por Timmer & Peres (2015), quienes aseguraron que la agresividad de la enfermedad es mayor al ser causada por *C. acutatum* en relación con *C. gloeosporioides*. La confirmación de la presencia de *C. 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). Ambos patógenos ya habían sido descritos en Costa Rica para diversos cultivos como papaya, carambola, mango, helecho hoja, hoja de cuero y fresa (Barquero Quiros et al., 2013; Schiller et al., 2006). En el caso específico de cítricos, *C. acutatum* se identificó en flores de naranja provenientes de Costa Rica (Peres et al., 2008) y se identificó en tejidos foliares, flores o inflorescencias de limón criollo (Barquero Quiros et al., 2013). Sin embargo, no existían reportes en cítricos para la zona de Brasilia, Alajuela, Costa Rica.

Con respecto a las muestras procesadas de pétalos sin síntomas, no se obtuvo crecimiento micelial en ninguna de las repeticiones, esto se pudo deber a que si bien *Colletotrichum* presenta una breve etapa biotrófica sin generar lesiones, seguida de una fase necrotrófica (Savi et al., 2019), este patógeno puede presentar solo una fase necrotrófica 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 de forma certera las estrategias de control.

Desde el inicio de la aparición de la enfermedad, se han reportado aislamientos de *Fusarium* spp. 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). Si bien falta investigación, esta identificación podría ser un indicio de su relación con alguna otra enfermedad en el cultivo evaluado. *F. incarnatum*, ha sido identificado en raíces de cítricos asociado a la 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 Medina, 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 a infecciones oculares en humanos (Šišić et al., 2018).

En las evaluaciones *in vitro* los triazoles, difenoconazol y tebuconazol, presentaron un control total del crecimiento de los dos aislados. El tebuconazol, mantuvo este control a los cinco días después, contrario al difenoconazol en el que la inhibición no fue constante. Ambos fungicidas presentaron control sobre *C. gloeosporioides* y *C. abscissum* a partir de la décima parte de la dosis comercial (7,5 y 5 mg L<sup>-1</sup> i.a, respectivamente). Se obtuvieron resultados consistentes con ambas metodologías, esto se ve favorecido porque estas moléculas inhiben la biosíntesis de esteroides, por lo que son efectivos en la reducción del crecimiento del micelio (Gao et al., 2017).

El pyraclostrobin presentó para *C. abscissum* control parcial a partir de 3,8 mg L<sup>-1</sup> i.a con ambas metodologías; sin embargo, no mostró un efecto de disminución total con ninguna de las concentraciones evaluadas, lo que evidencia un control deficiente del hongo. Para *C. gloeosporioides* se obtuvo control parcial en el primer ensayo a una concentración de 3,8 mg i.a L<sup>-1</sup>, pero solo se logró determinar un porcentaje de efectividad de 3,1 con 38 mg i.a L<sup>-1</sup>. En este caso, en el que el porcentaje de inhibición fue muy bajo, se considera que la técnica de evaluación en placas multipozo es limitada, ya que no permitió detectar diferencias entre las concentraciones, una causa pudo ser la concentración de conidios empleada, en la que se evidenció que la inhibición fue menor a la menor concentración evaluada en las placas. La diferencia en control evidenciada entre ambos aislados coincide con lo reportado por Han et al. (2018), quienes indicaron que las especies de *Colletotrichum* pueden tener respuestas de sensibilidad distintas a grupos de fungicidas; además existen estudios que han demostrado diferencias conforme a la agresividad de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* en flor (Guerreiro Lima et al., 2011).

El control deficiente del pyraclostrobin sobre *C. gloeosporioides* podría deberse a diversos motivos. Los fungicidas inhibidores externos de quinona (QoIs) han presentado 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 QoI tienen alto riesgo de generar resistencia, además de presentar resistencia cruzada entre todos los miembros de este grupo (Fungicide Resistance Action Committee, 2020). Al no tener evaluaciones previas de sensibilidad de este hongo, no se puede hablar de pérdida de sensibilidad, por lo que de nuevo 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 pudieron deberse a un efecto de la metodología, ya que existen un mecanismo de resistencia para este grupo de fungicidas que implica la actividad de la enzima oxidasa alternativa activa (AOX), que activa un mecanismo alternativo, más corto que la respiración normal, que proporciona la energía necesaria para contrarrestar el efecto de los fungicidas QoIs, lo que ocasiona resultados erróneos en ensayos *in vitro*. 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 la penetración del huésped. Por lo tanto, incluir el uso de inhibidores de AOX como enmiendas en pruebas de sensibilidad a QoIs, es una medida para descartar este efecto en los resultados (Piccirillo et al., 2018). Para complementar esta evaluación se recomienda realizar pruebas *in vitro* e incluir estos inhibidores y complementar con evaluaciones de efectividad en campo.

El ferbam presentó para *C. abscissum* resultados consistentes en ambas metodologías, tuvo un efecto parcial a una concentración de 1520 mg i.a L<sup>-1</sup>. Sin embargo, el control observado fue inferior en comparación a todos los fungicidas evaluados. Esto coincide con lo reportado por Santamaría Basulto et al. (2011) quienes señalaron que el diámetro de inhibición de *Colletotrichum* obtenido con ferbam fue una tercera parte del observado con otros fungicidas evaluados como prochloraz. Este fungicida mostró un control parcial de *C. gloeosporioides* a partir de 15,2 mg i.a L<sup>-1</sup>, pero no se logró determinar un porcentaje de efectividad en ninguna de las concentraciones evaluadas; esto coincide con lo obtenido para pyraclostrobin, en donde productos con bajo control dificultan obtener resultados consistentes entre ambas metodologías debido a la precisión de estas.

Aún con los resultados obtenidos con ferbam, no se puede descartar el aporte de este producto en el control de *Colletotrichum*, ya que a pesar de obtener baja eficacia en ensayos *in vitro* con productos protectantes multisitio, estos pueden mejorar la efectividad del control en evaluaciones en campo (Guillén Sánchez et al., 2017). Se debe además considerar el aporte en prevención de la selección de poblaciones resistentes de los fungicidas multisitio y la importancia de implementar estrategias de prevención, debido a las pocas moléculas disponibles y el impacto directo de la enfermedad sobre la producción (Gama et al., 2020; Gaviria-Hernández et al., 2013).

El seguimiento del estado de sensibilidad de los aislamientos es importante para proporcionar información sobre la eficacia de los principales grupos de fungicidas aplicados de manera comercial. Sin embargo, debido a que no se encontraron estudios previos de sensibilidad en la población de patógenos evaluada, este estudio puede servir como línea de base para futuros ensayos de monitoreo dirigidos en los aislamientos obtenidos de *C. abscissum* y *C. gloeosporioides*.

## Conclusiones

Se determinó que los hongos asociados a la antracnosis en naranja, en la finca estudiada, fueron *Colletotrichum abscissum*, presente en pétalos con síntomas iniciales y avanzados, y *C. gloeosporioides* presente en cálices persistentes.

La efectividad de los fungicidas evaluados fue mayor para los triazoles, tebuconazol y difenoconazol, en ese orden, con control sobre *C. gloeosporioides* y *C. abscissum* a partir de la décima parte de la dosis comercial (7,5 y 5 mg L<sup>-1</sup> i.a, respectivamente).

El pyraclostrobin evidenció un control deficiente del producto sobre ambos aislados. Para complementar esta evaluación se recomienda realizar pruebas *in vitro* que incluya inhibidores de la enzima oxidasa alternativa activa (AOX) y complementar los resultados obtenidos con evaluaciones de efectividad en campo. El ferbam resultó poco eficaz en las pruebas *in vitro*, sin embargo, al ser un protectante multisitio su desempeño en campo podría mejorar respecto a las pruebas *in vitro*.

Con respecto a las metodologías de evaluación *in vitro*, 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.

## Referencias

- 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 Mejía, J. D. (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 del Instituto Tecnológico de Costa Rica. <https://hdl.handle.net/2238/11146>
- Barquero Quiros, M., Peres, N. A., & Arauz, L. F. (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://doi.org/10.15517/rac.v37i1.10710>

- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa. <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
- Crous, P. W., Wingfield, M. J., Guarro, J., Hernández-Restrepo, M., Sutton, D. A., Acharya, K., Barber, P. A., Boekhout, T., Dimitrov, R. A., Dueñas, M., Dutta, A. K., Gené, J., Gouliamova, D. E., Groenewald, M., Lombard, L., Morozova, O. V., Sarkar, J., Smith, M. T. H., Stchigel, A. M., ... Groenewald, J. Z. (2015). Fungal planet description sheets: 320–370, *Colletotrichum abscissum*. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, *34*, 167–226. <https://doi.org/10.3767/003158515X688433>
- da Silva Junior, G. J. (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 Universidade de São Paulo. <https://doi.org/10.11606/T.11.2011.tde-13092011-095157>
- Damm, U., Cannon, P. F., Woudenberg, J. H. C., & Crous, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, *73*(1), 37–113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>
- 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>
- Ezrari, S., Lahlali, R., Radouane, N., Tahiri, A., Asfers, A., Boughalleb-M’Hamdi, N., Amiri, S., & Lazraq, A. (2021). Characterization of *Fusarium* species causing dry root rot disease of citrus trees in Morocco. *Journal of Plant Diseases and Protection*, *128*, 431–447. <https://doi.org/10.1007/s41348-020-00392-0>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1979.tb07408.x>
- Fungicide Resistance Action Committee. (2020, June). *FRAC Recommendations for Resistance Management for Qol Fungicides*. <https://bit.ly/3K3YOr3>
- Gama, A. B., Baggio, J. S., Rebello, C. S., de Afonseca Lourenço, S., de G. Gasparoto, M. C., da Silva Junior, G. J., Peres, N. A., & 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*, 521–528. <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0518-8>
- Gaviria-Hernández, V., Patiño-Hoyos, L. F., & Saldarriaga-Cardona, A. (2013). Evaluación *in vitro* de fungicidas comerciales para el control de *Colletotrichum* spp., en mora de castilla. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *14*(1), 67–75. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol14\\_num1\\_art:344](https://doi.org/10.21930/rcta.vol14_num1_art:344)
- Guarnaccia, V., Gilardi, G., Martino, I., Garibaldi, A., & Gullino, M. L. (2019). Species diversity in *Colletotrichum* causing anthracnose of aromatic and ornamental *Lamiaceae* in Italy. *Agronomy*, *9*(10), Article 613. <https://doi.org/10.3390/agronomy9100613>
- Guerber, J. C., Liu, B., Correll, J. C., & Johnston, P. R. (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. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833047>

- Guerreiro Lima, W., Bellato Spósito, M., Amorim, L., Packer Gonçalves, F., & Albuquerque Melo de Filho, P. (2011). *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *European Journal of Plant Pathology*, 131, 157–165. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9795-1>
- Guillén Sánchez, D., Cadenas Vásquez, C. I., Alia Tejada, 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. <https://bit.ly/3x13AzU>
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Han, Y. -C., Zeng, X. -G., Xiang, F. -Y., Zhang, Q. -H., Guo, C., Chen, F. -Y., & Gu, Y. -C. (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 Medina, C. A. (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 de la Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/56918>
- Infostat. (2020). *Infostat versión 2020*. Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.infostat.com.ar>
- International Trade Center. (n.d.). *Trade Map. Trade statistics for international business development*. Retrieved June, 2022 from <https://www.trademap.org/Index.aspx>
- 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), 783–790. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0120-4>
- 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. <https://doi.org/10.1006/mpev.1996.0376>
- Peres, N. A., & Dewdney, M. M. (2021). *2021–2022 Florida citrus production guide: Postbloom fruit drop: CG007/PP-45, rev. 4/2021. EDIS 2021(CPG)*. University of Florida. <https://doi.org/10.32473/edis-cg007-2021>
- Peres, N. A., MacKenzie, S. J., Peever, T. L., & Timmer, L. W. (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/PHYTO-98-3-0345>
- Peres, N. A. R., Souza, N. L., Furtado, E. L., & Timmer, L. W. (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 in *Citrus sinensis*. *Scientia Horticulturae*, 236, 90–95. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.044>
- Rodrigues Marques, J. P., Bellato Spósito, M., Amorim, L., Sgarbiero Montanha, G., Silva Junior, G. J., Pereira de Carvalho, H. W., & Appezzato-da-Glória, B. (2020). Persistent calyxes in postbloom fruit drop: A microscopy and microanalysis perspective. *Pathogens*, 9(4), Article 251. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040251>

- Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1989). Extraction of DNA from plant tissues. In S. B. Gelvin, R. S. Schilperoort, & D. P. S. Verma (Eds.), *Plant molecular biology manual* (pp. 73–83). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-94-009-0951-9_6)
- 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), Artículo 45495. <https://doi.org/10.15517/am.v33i1.45495>
- Sáenz Pérez, C. A., Osorio Hernández, E., Estrada Drouaillet, B., Poot Poot, W. A., Delgado Martínez, R., & Rodríguez Herrera, R. (2019). Principales enfermedades en cítricos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(7), 1653–1665. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1827>
- 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. <https://doi.org/10.15517/RAC.V36I1.9964>
- Santamaría Basulto, F., Días Plaza, R., Gutiérrez Alonso, O., Santamaría Fernández, J., & Larqué Saavedra, 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. <https://doi.org/10.29312/remexca.v2i5.1614>
- Savi, D. C., Jnoski Rossi, B., Rodrigues Rossi, G., Santos Ferreira-Maba, L., Bini, I. H., da Silva Trindade, E., Goulin, E. H., Machado, M. A., & 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., Campos Melendez, L. F., Danielsen, S., Funk Jensen, D., & Madriz Ordenana, K. (2006). Two subpopulations of *Colletotrichum acutatum* are responsible for anthracnose in strawberry and leatherleaf fern in Costa Rica. *European Journal of Plant Pathology*, 116, 107–118. <https://doi.org/10.1007/s10658-006-9045-0>
- 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, Article 15839. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15946-w>
- Silva, A. O., Savi, D. C., Gomes, F. B., Gos, F. M. W. R., Silva Jr, G. J., & 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, 731–748. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1038-z>
- Šišić, A., Baćanović-Šišić, J., Al-Hatmi, A. M. S., Karlovsky, P., Ahmed, S. A., Maier, W., Sybren de Hoog, G., & Finckh, M. R. (2018). The ‘forma specialis’ issue in Fusarium: a case study in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Scientific Reports*, 8, Article 1252. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19779-z>
- Timmer, L. W., & Peres, N. A. (2015). Where have all the flowers gone? Postbloom fruit drop of citrus in the Americas. *Journal of Citrus Pathology*, 2(1), Article 28302. <https://doi.org/10.5070/C421028302>
- Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I., Martín-Mex, R., Nexticapan-Garcez, A., & Pérez-Brito, D. (2015). Sensitivity of *Colletotrichum truncatum* to four fungicides and characterization of thiabendazole-resistan isolates. *Plant Disease*, 99(11), 1590–1595. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-14-1183-RE>
- United States Department of Agriculture. (2020, December 15<sup>th</sup>). *Citrus Annual*. <https://bit.ly/3I27GOE>
- Wharton, P. S., & Diéguez-Uribeondo, 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. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innis, S. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press, New York. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>