



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

Tesis para optar al título de Doctora en Ciencias Agrarias
ICiAgro Litoral - UNL FCA

Identificación y caracterización de especies
de *Colletotrichum* asociadas a manchas foliares y podredumbre
amarga en manzanos de bajos requerimientos de frío del centro de
Santa Fe

Laura Noemí Fernandez

Director: Dr. Mondino Pedro Emilio
Co-Directora: Dra. Favaro María Alejandra

Esperanza – Santa Fe

2023

Identificación y caracterización de especies de *Colletotrichum* asociadas a manchas foliares y podredumbre amarga en manzanos de bajos requerimientos de frío del centro de Santa Fe

Laura Noemí Fernandez

Ingeniera Agrónoma

Universidad Nacional del Litoral

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias de la Facultad de Ciencias Agrarias - Universidad Nacional del Litoral y no ha sido presentado previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados de investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Ciencias Agropecuarias del Litoral, en la Facultad de Ciencias Agrarias, en campos experimentales y en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Ciencias Agrarias durante el período comprendido entre abril de 2016 y enero de 2022, bajo la Dirección del Dr. Pedro Mondino y la Co-dirección de la Dra. María Alejandra Favaro.

“Ninguno ignora todo, ninguno lo sabe todo. Por eso aprendemos siempre” Paulo Freire

AGRADECIMIENTOS

Al sistema de Becas Doctorales de CONICET

A mi Director de Tesis, Dr. Pedro Mondino por acompañarme y brindarme sus conocimientos y experiencia a lo largo de todo este camino.

A mi Co-Directora, Dra. Ma. Alejandra Favaro por su paciencia, enseñanza y empuje constante para que llegara a la meta.

A la Dra. Roxana Maumary, por haber confiado en mí y haberme introducido en el hermoso camino de la investigación y la docencia.

A la Dra. Sandra Alaniz, por brindarme generosamente sus conocimientos y su tiempo.

Al Dr. Norberto Gariglio, director de mi Beca Doctoral, por ofrecerme siempre su apoyo y experiencia.

Al Dr. Marcos Derita y todo su equipo de investigación; Norma, Ma. Inés y Gisela, por haberme echo parte de sus trabajos.

A la MSc Alejandra Lutz, por siempre, siempre estar... ¡Gracias Amiga!

A quienes por una u otra razón han entrado en mi vida y se han quedado... así como también a aquellos que se han ido, pero han dejado bellos recuerdos y enseñanzas.

A todos ellos, Simplemente Gracias...

DEDICATORIA

A mi compañero de vida... Juan

A mis pequeños pero potentes motores... Pedro y Álvaro

PUBLICACIONES EN REVISTAS

2022 **LAURA NOEMÍ FERNANDEZ, SANDRA ALANIZ, MARCOS GABRIEL DERITA, ALEJANDRA LUTZ, NORBERTO FRANCISCO GARIGLIO, PEDRO EMILIO MONDINO & MARÍA ALEJANDRA FAVARO.** Characterization of *Colletotrichum siamense* the causal agent of bitter rot and leaf spot in low-chill apple cultivars in central Argentina, International Journal of Pest Management, 68:4, 295-310, DOI: 10.1080/09670874.2022.2116659

2020 **FERNANDEZ, L., BERUTTI, G., GARIGLIO, N., FAVARO, M.A., MAUMARY, R.** *Marssonina coronaria*, nuevo agente causal de manchas foliares en manzanos de bajos requerimientos de frío del centro de Argentina. Revista FAVE sección Ciencias Agrarias. Vol. 19 (1): 43-53. e-ISSNN: 2346-9129. DOI 10.14409/fa.v19i1.9452

2018 **L. N. FERNANDEZ; S. ALANIZ; P. MONDINO; R. A. ROESCHLIN; R. L. MAUMARY; N. F. GARIGLIO; M. A. FAVARO.** First Report of *Colletotrichum siamense* Causing Apple Bitter Rot in Central Argentina. Plant disease notes. January 2018, Vol. 102:1. Page 250. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1071-PDN>

INDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. Introducción general	4
1.1 El cultivo del manzano: características, importancia mundial y nacional.....	5
1.2 Manzanos con bajos requerimientos de frío: desarrollo y comportamiento en el centro de Argentina	6
1.3 Enfermedades del manzano	8
1.3.1.1. Podredumbre amarga (PA) del manzano.....	10
1.3.1.2. Mancha foliar por <i>Glomerella</i> (MFG).....	11
1.3.1.3. Especies de <i>Colletotrichum</i> asociadas a PA y MFG, y su interrelación.....	13
1.4 PA y MF asociadas a <i>Colletotrichum</i> spp. en la región central de Santa Fe	14
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS.....	16
Objetivo general	16
Objetivos específicos.....	16
2. Capítulo 1	17
2.1. INTRODUCCIÓN.....	18
2.1.1. El género <i>Colletotrichum</i> : historia y características.....	18
2.1.2. Identificación tradicional de especies en el género <i>Colletotrichum</i>	19
2.1.3. Identificación molecular de especies en el género <i>Colletotrichum</i>	19
2.1.4. Situación taxonómica actual del género <i>Colletotrichum</i> . Especies identificadas en manzano	22
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.2.1. Obtención de aislados y condiciones de cultivo.....	25
2.2.2. Caracterización morfológica.....	25
2.2.3. Análisis filogenético	26
2.2.4. Pruebas de patogenicidad directas y cruzadas.....	27
2.2.5. Caracterización de susceptibilidad de los cultivares	30
2.3. RESULTADOS	30
2.3.1. Síntomas a campo y aislados obtenidos	30
2.3.2. Caracterización morfológica.....	31
2.3.3. Análisis filogenético	36
2.3.4. Pruebas de patogenicidad directas y cruzadas sobre frutas y hojas.....	38
2.3.5. Caracterización de susceptibilidad de los cultivares	40
2.4 DISCUSIÓN.....	44
3. Capítulo 2	49

3.1. INTRODUCCIÓN.....	50
3.1.1 Epidemiología de <i>Colletotrichum</i> en manzanos.....	50
3.1.1.1. Factores ambientales que favorecen el desarrollo de la PA por <i>Colletotrichum</i> spp. en manzano	51
3.1.1.2. Factores ambientales que favorecen el desarrollo de MF por <i>Colletotrichum</i> spp. en manzano	52
3.1.2. Ciclo de las enfermedades causadas por <i>Colletotrichum</i>	53
3.1.2.1 Sobrevivencia y Fuentes de inóculo	54
3.1.2.2 Penetración, infección y colonización.....	54
3.1.2.2.1 Pre-infección.....	55
3.1.2.2.2. Post-infección	55
3.1.2.2.3. Crecimiento y reproducción	56
3.1.2.2.4 Diseminación	58
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
3.2.1 Epidemiología de las enfermedades causadas por <i>Colletotrichum siamense</i> en el campo	58
3.2.1.1 Sitios y estructuras de sobrevivencia.....	58
3.2.1.2 Evolución de PA a campo	59
3.2.2 Caracterización de las primeras etapas del proceso infeccioso de <i>Colletotrichum siamense</i>	60
3.2.2.1 Análisis mediante microscopía óptica tradicional.....	60
3.2.2.2 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión.....	61
3.2.2.3 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido	61
3. 3 RESULTADOS	62
3.3.1 Epidemiología de las enfermedades causadas por <i>Colletotrichum siamense</i> en el campo	62
3.3.1.1 Sitios y estructuras de sobrevivencia.....	62
3.3.1.2 Evolución de las enfermedades causadas por <i>Colletotrichum siamense</i> a campo en relación a la fenología y las condiciones ambientales	63
3.3.2 Caracterización de las primeras etapas del proceso infeccioso de <i>Colletotrichum siamense</i> en hojas y frutos de manzanos	71
3.3.2.1 Mecanismo de Infección en hojas	71
Pre-infección.....	71
Post-infección	72
3.3.2.2 Mecanismo de Infección en frutos.....	74
Pre-infección.....	74
Post-infección	74
3.4 DISCUSIÓN.....	76
4. Capítulo 3	81

4.1 INTRODUCCIÓN.....	82
4.1.1 Manejo de las enfermedades causadas por <i>Colletotrichum</i> en manzanos.....	82
4.1.1.2 Control químico.....	82
4.1.1.3 Características de los principales fungicidas registrados en Argentina para el control de <i>Colletotrichum</i> spp.	84
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	88
4.2.1 Evaluación <i>in vitro</i> por inhibición del crecimiento micelial	88
4.3 RESULTADOS	89
4.4 DISCUSIÓN.....	92
5. Discusión general	96
5.1 DISCUSIÓN GENERAL	97
BIBLIOGRAFÍA.....	100

ABREVIATURAS

act , actina	his3 , histona 3
ADE , Agua Destilada Estéril	hpi , horas post inoculación
ADN , Ácido Desoxirribonucleico	ITS-rDNA , del inglés <i>Internal Transcriber Spacer</i>
APD , Agar Papa Dextrosa	M3 , del inglés <i>Multisite</i>
apmat , del inglés <i>Apn2-Mat1-2 intergenic spacer and partial Mating type Mat1-2 gene</i>	M4 , del inglés <i>Multisite</i>
apn2 , <i>DNA lyase</i>	MBC , del inglés <i>Methyl Benzimidazole Carbamate</i> , metil bencimidazol carbamatos
apn2/mat-igs , <i>intergenic spacer between DNA lyase and the mating-type locus MAT1-2-1</i>	MEB , Microscopía Electrónica de Barrido
C. , <i>Colletotrichum</i>	MET , Microscopía Electrónica de Transmisión
cal , calmodulina	MF , Manchas Foliares
CASAFE , Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes	MFG , Mancha Foliar por Glomerella
CE50 , Concentración Efectiva 50	MI , Manejo Integrado
CECIF , Campo Experimental de Cultivos Intensivos y Forestales	PA , Podredumbre Amarga
chs-1 , del inglés <i>chitin synthase</i>	PCR , del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
DMI , del inglés <i>DeMethylation Inhibitors</i> , inhibidores de la desmetilación	QoI , del inglés <i>Quinone outside Inhibitor</i> , inhibidores externos de la quinona
dpi , días post inoculación	SBI , del inglés <i>Sterol Biosynthesis Inhibiting</i> , inhibidores de la biosíntesis del ergosterol
FRAC , del inglés <i>Fungicide Resistance Action Committee</i>	spp , especies
gap2-igs , del inglés <i>intergenic spacer between GAPDH and a hypothetical protein</i>	tub2 , β -tubulina
gapdh , gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa	USDA , del inglés <i>United State Department of Agriculture</i> , Departamento de Agricultura de Estados Unidos
HF , Horas de Frío	

RESUMEN

La podredumbre amarga (PA), causada por *Colletotrichum* spp., es una de las enfermedades fúngicas prevalentes de la manzana a nivel global. Algunas especies de *Colletotrichum* también causan la mancha foliar por *Glomerella* (MFG), restringida a unas pocas regiones del mundo. En la región central de Santa Fe, en el año 2014 se registró la presencia de PA y en el año 2016 comenzaron a visualizarse manchas foliares (MF) en tres cultivares de manzanas con bajos requerimientos de frío, ‘Eva’, ‘Princesa’ y ‘Caricia’. Esta tesis se centró en determinar y caracterizar las especies de *Colletotrichum* involucradas en estas patologías, estudiar diferentes aspectos de la epidemiología y patogénesis y caracterizar la sensibilidad de aislados fúngicos a fungicidas. Se obtuvieron treinta y cuatro aislados desde frutos y hojas sintomáticos. Las características morfológicas en combinación con el análisis filogenético multilocus revelaron que *Colletotrichum siamense* es la única especie asociada con PA y MF en manzanas con bajos requerimientos de frío de la región central de Santa Fe. De los tres cultivares evaluados, ‘Caricia’ resultó el más susceptible a PA. Las MF registradas encuentran diferencias notables con la MFG típica, lo que indica que esta enfermedad no está presente en la región. Se determinó además que *C. siamense* sobrevive en forma de conidios, principalmente sobre la planta y que para infectar frutos y hojas utiliza un mecanismo hemibiotrófico. A campo, la presencia de síntomas en frutos se ve favorecida con el inicio de las lluvias primaverales, temperaturas por encima de 20°C, con óptimo de 25°C y humedad relativa por encima de 90%. Los aislados de *C. siamense* son sensibles a fungicidas pertenecientes a los grupos metil bencimidazol carbamatos e inhibidores de la desmetilación, mientras que son insensibles a todos los principios activos de contacto multisitio testeados y al azoxistrobin (inhibidores externos de la quinona). Estos hallazgos serán útiles para futuros estudios de inhibición de germinación de conidios, sensibilidad a fungicidas a campo y para diseñar estrategias de manejo de las enfermedades causadas por *C. siamense* en la región.

Palabras claves: podredumbre amarga, manchas foliares, complejo de especies *C. gloeosporioides*; ‘Caricia’; ‘Princesa’; ‘Eva’; identificación molecular, fungicidas

ABSTRACT

Bitter rot (BR), caused by *Colletotrichum* spp., is one of the prevalent fungal diseases of apple worldwide. Some *Colletotrichum* spp. also causes *Glomerella* leaf spot (GLS), restricted to a few regions worldwide. The presence of BR was recorded in 2014 in the central region of Santa Fe, and leaf spots (LS) began to be seen in 2016 in three low-chill apple cultivars, 'Eva', 'Princesa' and 'Caricia'. This thesis was focused to determine and characterize the *Colletotrichum* species involved in these pathologies, studying different aspects of epidemiology and pathogenesis and characterizing the sensitivity of fungal isolates to fungicides. Thirty-four isolates from symptomatic fruits and leaves were obtained. Morphological characteristics in combination with multilocus phylogenetic analysis revealed that *Colletotrichum siamense* is the single species associated with BR and LS on low-chill apples in Santa Fe. Of the three cultivars evaluated, 'Caricia' was the most susceptible to BR. Although in this study we obtained and characterized isolates of *C. siamense* from LS, we found remarkable differences with typical GLS indicating that this disease is not present in the region. It was also determined that *C. siamense* survives in the form of conidia, mainly on the plant, and that it uses a hemibiotrophic mechanism to infect fruits and leaves. In the field, the presence of symptoms in fruits is favored with the beginning of spring rains, temperatures above 20°C, with an optimum of 25°C and relative humidity above 90%. The isolates of *C. siamense* are sensitive to fungicides belonging to the methyl benzimidazole carbamate and demethylation inhibitors groups, whereas they are insensitive to all the multisite contact active ingredients tested and to azoxystrobin (Quinone outside Inhibitor). These findings will be useful for future studies on conidial germination inhibition, sensitivity to fungicide in the field, and to design management strategies for diseases caused by *C. siamense* in the region.

Keywords: bitter rot; leaf spot; *C. gloeosporioides* species complex; 'Caricia'; 'Princesa'; 'Eva'; molecular identification; fungicide

1. Introducción general

1.1 El cultivo del manzano: características, importancia mundial y nacional

La manzana doméstica común pertenece al género *Malus* de la familia Rosaceae, subfamilia Pomoideae. Actualmente se lo conoce como *Malus domestica* (Borkh) o *Malus x domestica* (Borkh) y se cree que su origen estaría en Asia Central, donde su antepasado principal, *M. sieversii*, es nativo de la región ubicada entre el oeste de China y la antigua Unión Soviética (Forsline *et al.*, 2003; Velasco *et al.* 2010).

Las especies de *Malus* pueden clasificarse en varios números de subgéneros en base a sus características morfológicas y similitud de flavonoides (Phipps *et al.*, 1990, Luby, 2003). En la actualidad existen más de 7500 cultivares de manzanas documentadas en todo el mundo, muchas de las cuales están estrechamente relacionadas con los principales genotipos ‘Red Delicious’, ‘Golden Delicious’ y ‘Jonathan’ (Li *et al.*, 2021)

El árbol de manzano posee hojas alternas, simples y caducifolias (Cárdenas & Fischer, 2013). Las flores se agrupan en inflorescencias denominadas cimbras, que generalmente contienen entre 5 y 7 flores hermafroditas. El fruto es un pomo carnoso e indehisciente, formado por un ovario ínfero compuesto por 5 carpelos. El tamaño de la planta depende del potencial genético de los diferentes cultivares y del vigor del pie de injerto utilizado (Castro *et al.*, 2015a).

La difusión, cultivo, y usos del manzano se fue ampliando a lo largo de milenios, con la expansión de imperios y colonizaciones en diferentes regiones a lo largo del planeta. Actualmente el manzano es cultivado en todos los continentes. De acuerdo al Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), la producción de manzano durante la campaña 2021-2022 fue de 81,6 millones de toneladas. China es el principal productor aportando más de la mitad de la producción (45 millones de toneladas), mientras que la Unión Europea participa con un volumen de 11,9 millones de toneladas, Estados Unidos y Turquía con 4,3 millones de toneladas. Argentina ocupa el décimo lugar como productor con 584.000 toneladas y es el décimo cuarto exportador en importancia (USDA, 2022).

El manzano encuentra condiciones de crecimiento óptimas en zonas de climas templado frío, debido a sus requerimientos de bajas temperaturas invernales para alcanzar una buena cosecha (O'Rourke, 2003; Castro *et al.*, 2015a; Velho *et al.*, 2015). Por ello, en Argentina históricamente el cultivo de manzano estuvo restringido a zonas de clima templado, como el Valle de Río Negro y Neuquén (Patagonia Norte), el Valle de Uco (Mendoza), el Valle del Tulum (San Juan) y Chubut, donde el cultivo encuentra condiciones edafoclimáticas óptimas. La superficie de cultivo de pomáceas (manzana y pera), ubicada en el Alto Valle de Río Negro y Neuquén y Valle Medio de Río Negro, representa aproximadamente el 85%

de la superficie cultivada del país, así como el 85% de la producción y el 95% de las exportaciones en fresco e industriales. En esta región, el clima es continental, templado y árido con una precipitación media anual que van desde los 188 mm en el Alto Valle a 288 mm en el Valle Medio (Toranzo, 2016). El cultivar predominante es ‘Red Delicious’ seguidos por ‘Granny Smith’, ‘Gala’, y en menor medida ‘Cripps Pink’ ‘Golden Delicious’, ‘Rome Beauty’, ‘Fuji’ y ‘Braeburn’. ‘Red Delicious’ y sus clones representan el 66% de la producción, mientras que ‘Granny Smith’ el 19% y ‘Gala’ y sus clones, el 10%. Los restantes cultivares aportan un 5 % de la producción regional (Castro *et al.*, 2015a; Toranzo, 2016).

1.2 Manzanos con bajos requerimientos de frío: desarrollo y comportamiento en el centro de Argentina

El avance en técnicas de mejoramiento genético ha permitido desarrollar cultivares con bajos requerimientos de horas de frío que logran ser productivos en regiones subtropicales, permitiendo la expansión del cultivo a zonas no tradicionales. Este desarrollo de nuevos cultivares en conjunto con tecnologías de cultivo, permitieron que el cultivo de manzano se expandiera exitosamente en climas cálidos (O'Rourke, 2003; Castro *et al.*, 2015a).

Los primeros cultivares con bajos requerimientos de frío liberados al mercado fueron generados en Israel bajo los nombres ‘Ein Shemer’ y ‘Anna’ (Hauagge & Cummins, 1999). Actualmente existen numerosos cultivares de manzanos con bajos requerimientos de frío y mejor calidad de fruta, que fueron desarrollados principalmente en Israel, Estados Unidos, Japón, Brasil y México (Castro *et al.*, 2015a).

La provincia de Santa Fe se caracteriza por tener un clima templado cálido con un régimen de precipitación isohigro con tendencia a monzónico y un comportamiento asincrónico de la temperatura. Esto determina que, durante los meses de invierno, se puedan registrar temperaturas elevadas que terminan afectando el crecimiento y desarrollo de cultivos con bajos requerimientos de horas de frío y bajo umbral de brotación (García *et al.*, 2015). Estos inviernos suaves, no permiten que los requerimientos de frío de los cultivares tradicionales de manzanos sean cubiertos adecuadamente. A partir del año 2005 en la región central de Santa Fe comenzaron a desarrollarse estudios de comportamiento de los cultivares con bajos requerimientos de frío: ‘Caricia’, ‘Eva’ y ‘Princesa’, obtenidos mediante mejoramiento genético en Brasil, con requerimientos de entre 350 a 450 horas de frío (HF) invernales para la ruptura de la dormición (Hauagge & Cummins, 1999; Denardi *et al.*, 2019). Los estudios realizados en la región sobre el comportamiento vegetativo y reproductivo, la carga frutal óptima y la biología reproductiva de estos cultivares de bajos requerimientos de frío han

brindado nuevos conocimientos para mejorar el desarrollo de este cultivo en el área (Castro *et al.*, 2015a; Castro *et al.*, 2015b; 2016; 2017). Además, estos cultivares han sido implantados en diferentes localidades de las provincias de Misiones, Córdoba, Entre Ríos y Corrientes (Provasi *et al.*, 2000; Paéz-Morón, 2003; Alayón Luaces & Rodríguez, 2010; Castro *et al.*, 2015a; Fenoy, 2015), en el centro-norte del país, con condiciones climáticas similares a las del centro de Santa Fe.

‘Caricia’ (IAPAR 77; ‘Anna’ × ‘Prima’) presenta frutos de mediano tamaño, de sabor subácido y coloración roja intensa y pareja. Los árboles presentan un crecimiento vigoroso y una buena producción con 350 HF (Hauagge & Cummins, 2000; Castro *et al.*, 2015a). Bajo las condiciones climáticas de la región central de Santa Fe, la fecha media de cosecha de este cultivar es a principios de enero (Castro *et al.*, 2015b). ‘Eva’ (IAPAR 75; ‘Anna’ × ‘Gala’) tiene un fruto de tamaño mediano y bicolor, asemejándose a ‘Gala’. Su cosecha ocurre a finales de diciembre bajo nuestras condiciones climáticas (Castro *et al.*, 2015b). El árbol tiene un crecimiento compacto, buen comportamiento con 350 HF y fructificación alta, incluso en madera de un año (Hauagge & Cummins, 2000). Finalmente, ‘Princesa’ (‘Anna’ × ‘NJ56’) presenta frutos de mayor tamaño que las anteriores, de color rojo vetado y sabor dulce-subácido. Requiere 450 HF para su desarrollo óptimo. Su temporada de cosecha en la zona central de Santa Fe se superpone a la de ‘Caricia’ la mayoría de los años (Castro *et al.*, 2015a).

Si bien la provincia de Santa Fe presenta baja importancia relativa dentro del mapa frutícola del país, desde la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral (FCA-UNL), se trabaja desde hace más de 20 años en la adaptación de diferentes especies de frutales, como posibles fuentes de diversificación productiva para la región, especialmente para el cinturón hortícola que ha sufrido una pérdida importante de rentabilidad en los últimos años (Travadelo *et al.*, 2015). En lo que respecta a producción de manzanas, si bien no existen estadísticas oficiales para el número de hectáreas implantadas, se viene registrando un aumento paulatino de la superficie en producción (Castro *et al.*, 2015a).

La incorporación de nuevos cultivos en una región trae aparejada la falta de conocimientos acerca de las enfermedades que pueden afectarlos y de los patógenos que pueden resultar epidémicos en estas nuevas condiciones edafo-climáticas. Esto toma especial importancia teniendo en cuenta que las condiciones ambientales que pueden encontrar los patógenos en la provincia de Santa Fe resultan predisponentes para su desarrollo, multiplicación y sobrevivencia.

1.3 Enfermedades del manzano

Las principales zonas de producción de manzano en Argentina presentan condiciones climáticas de escasas precipitaciones y baja humedad relativa, propicias para la obtención de frutas de alta calidad (Dobra *et al.*, 2007). En estas regiones se han reportado enfermedades cuya incidencia es variable en función de las condiciones climáticas, como sarna (*Venturia inaequalis*), oidio del manzano (*Podosphaera leucotricha*), y enfermedades de poscosecha entre las que se destacan el moho azul (*Penicillium expansum*), moho gris (*Botrytis cinerea*), el corazón mohoso seco de la manzana asociado a *Fusarium* spp., *Alternaria* spp. y *Cladosporium* spp. (Di Masi, 2007) y el corazón mohoso húmedo de la manzana asociado a *Penicillium* spp. (Cichón *et al.*, 1996; Dobra *et al.*, 2007).

Desde la incorporación del cultivo de manzano en la región central de Santa Fe en el año 2005, su producción ha atravesado distintas problemáticas fitosanitarias, dentro de las que se han registrado con diferente intensidad muerte de ramas, plantas y podredumbre de fruta por miembros de la familia Botryosphaeriaceae (Rista *et al.*, 2011), manchas foliares y deshojado anticipado por *Marssonina coronaria* (Fernandez *et al.*, 2020) y ocasionalmente sarna en fruta y hojas ocasionada por *Venturia inaequalis* (Rista & Favaro, 2015) (Figura 1.1). A partir del año 2014 comenzaron a detectarse frutos con podredumbre amarga (PA), atribuida a nivel mundial a diferentes especies del género *Colletotrichum*. Esta enfermedad se presentó con valores de incidencia promedio del 70% en los cultivares ‘Caricia’, ‘Eva’ y ‘Princesa’ y con una alta prevalencia en las plantaciones de la región central de Santa Fe (Fernandez *et al.*, 2018). En estudios posteriores, se detectó la presencia de una sintomatología foliar asociada a *Colletotrichum* spp., que se caracterizó por pequeñas manchas foliares (MF) necróticas que al agrandarse formaban parches irregulares en el limbo. En función de la problemática generada, y como parte de los objetivos de esta tesis doctoral, se comenzaron a realizar estudios para determinar con precisión a los agentes causales de estas patologías en la región central de Santa Fe.

La PA y las podredumbres causadas por especies de Botryosphaeriaceae son dos de las principales enfermedades incluídas en el complejo denominado “enfermedades de verano”, presentes en zonas de producción con climas templados cálidos y veranos lluviosos. Si bien la incidencia de ambas enfermedades suele ser muy variable entre años y entre plantaciones frutales, en los años favorables a su desarrollo, las pérdidas suelen ser cuantiosas (Alaniz *et al.*, 2014). Resulta interesante destacar que la PA no ha sido reportada en la principal región de producción de manzanos del país (Valle de Río Negro y Neuquén), probablemente porque las condiciones de humedad ambiental, precipitaciones y temperaturas más bajas hacen que

sea poco probable su desarrollo. No obstante, en los últimos años han sido reportadas las especies de la familia Botryosphaeriaceae: *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila* y *Dothiorella omnivora* causando canchros y muerte regresiva en ramas de manzano en Río Negro (Lódolo *et al.*, 2022).



Figura 1.1. Enfermedades registradas desde el año 2005 en manzanos con bajos requerimientos de frío del centro santafesino. Cancro en rama principal de manzano (A), secado anticipado de rama (B), y podredumbre de frutos (C) a causa de patógenos de la familia Botryosphaeriaceae. Lesiones aracnoides que permanecen verdes y amarilleo característico que produce *Marssonina coronaria* (D). Distintos grados de infección de sarna en frutos (E) y en hojas (F) causada por *Venturia inaequalis*.

1.3.1 Enfermedades causadas por el género *Colletotrichum* en manzano

Colletotrichum, el único miembro de la familia Glomerellaceae (Glomerellales, Sordariomycetes), es uno de los géneros más importantes económicamente dentro de los patógenos fúngicos. Este género cosmopolita es causante de enfermedades en un amplio

rango de hospedantes de clima templado, tropical y subtropical. Puede afectar numerosas especies herbáceas y leñosas, árboles frutales, hortalizas, ornamentales, cereales y oleaginosas, lo cual conduce a severas pérdidas en calidad y rendimiento (Sutton, 1992; Hyde *et al.*, 2009a; Khodadadi *et al.*, 2020; Jayawardena *et al.*, 2021). Por su importancia científica y económica, este género ha sido incluido en “*The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology*” (Dean *et al.*, 2012).

La mayoría de las especies de *Colletotrichum* causan el síntoma conocido como antracnosis, caracterizado por lesiones necróticas hundidas, de forma circular a irregular, en hojas, tallos, flores y frutos. Cuando las condiciones ambientales son favorables, dentro de estas lesiones necróticas se forman acérvulas que contienen masas mucilaginosas de conidios de coloración variada (Sutton, 1992; Freeman *et al.*, 2000; Dowling *et al.*, 2020). Además, este género ocasiona otros síntomas como podredumbres de fruta, tallo y corona, marchitamiento de plántulas, tizones florales, manchas foliares y defoliación (Sutton, 1992; Dowling *et al.*, 2020; Carraro *et al.*, 2022).

Tradicionalmente, la taxonomía del género *Colletotrichum* se basaba en el rango de hospedantes y los caracteres morfológicos de los aislados fúngicos, lo que dificultaba la diferenciación entre especies (Cai *et al.* 2009; Cannon *et al.* 2012). En el año 2009, se avanzó notablemente en la sistemática de *Colletotrichum*, luego de la publicación de un número especial de *Fungal Diversity* (Nro. 39, 2009), destinado a la revisión taxonómica del género (Cai *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2009b; Hyde *et al.*, 2009a). Estos autores propusieron el análisis filogenético multilocus como base para definir nuevas especies de *Colletotrichum*. Según avances recientes, el género *Colletotrichum* comprende 280 especies que se dividen en 16 complejos o clados y 15 especies únicas (Fu *et al.* 2019; Vieira *et al.* 2020; Bhunjun *et al.* 2021; Jayawardena *et al.* 2021; Talhinhos & Baroncelli 2021; Liu *et al.*, 2022).

Las especies de *Colletotrichum* identificadas como patógenos en manzano a nivel mundial pertenecen a tres complejos: acutatum, gloeosporioides y boninense y las enfermedades producidas por estas especies reciben el nombre de antracnosis o PA y mancha foliar por Glomerella (MFG) (Velho *et al.*, 2015; Alaniz *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2021; Carraro *et al.*, 2022).

1.3.1.1. Podredumbre amarga (PA) del manzano

La PA es una de las enfermedades fúngicas del manzano más prevalentes en todo el mundo, que causa pérdidas económicas notables de la fruta, reduciendo hasta un 50% el rendimiento en climas cálidos donde las altas temperaturas (25 a 32°C) y la humedad favorecen

fuertemente el desarrollo de la enfermedad (Sutton 1990; Velho *et al.*, 2014; Bragança *et al.*, 2016).

La PA se caracteriza como una podredumbre blanda en los frutos, que comienza en forma de manchas circulares marrones, de 1 a 2 mm, que se agrandan rápidamente, formando una leve depresión en el centro. En cuanto la lesión avanza se desarrollan sobre la misma, acérvulas rodeadas por una matriz gelatinosa generalmente color salmón a naranja, siguiendo un patrón de círculos concéntricos (Figura 1.2A). Bajo condiciones favorables es común observar múltiples sitios de infección en la fruta (Figura 1.2B) y una alta incidencia de la enfermedad en las plantas (Figura 1.2C). En el caso de que las lesiones fueran causadas por la fase perfecta o teleomorfa los peritecios son observados en el centro de la lesión (Talamini & Bogo, 2009; Mondino *et al.*, 2009; Alaniz *et al.*, 2015). Una característica distintiva de la PA es que en el interior de la fruta la lesión avanza hacia el centro formando una “V” (Figura 1.2D). Esta característica se utiliza para diferenciarla de otros tipos de podredumbres como por ejemplo la podredumbre blanca, causada por miembros de la familia Botryosphaeriaceae, que se caracteriza por un patrón de avance con forma cilíndrica (Sutton, 1992; Mondino *et al.*, 2009; Alaniz *et al.*, 2015).

Todos los cultivares de manzano son susceptibles a PA, especialmente las de cosecha tardía, como ‘Granny Smith’, ‘Cripps Pink’ y ‘Fuji’ (Denardi *et al.*, 2003; Alaniz *et al.*, 2014). Otros cultivares que pueden ser afectadas son las rojas o de estación como ‘Early Red One’, ‘Oregon Spur’, ‘Red Delicious’ o ‘Red Spur’ (Alaniz *et al.*, 2014).

1.3.1.2. Mancha foliar por *Glomerella* (MFG)

Algunas especies de *Colletotrichum* también pueden causar infecciones en hojas de manzano dando lugar a la enfermedad conocida como MFG. La MFG es una enfermedad devastadora, que, a diferencia de la PA, está restringida a unas pocas regiones del mundo, como el sur de Brasil (Velho *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2019a), Uruguay (Casanova *et al.*, 2017; Alaniz *et al.*, 2019); el sureste de EE.UU. (González *et al.*, 2006; Johnson, 2019), el este de China (Wang *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2015a), y Japón (Yokosawa *et al.*, 2017). Esta enfermedad se ve favorecida por precipitaciones y temperaturas entre 23 y 28 °C (Casanova *et al.* 2017). En contraste a lo que sucede con la PA, donde el único síntoma es una podredumbre blanda del fruto, las poblaciones de *Colletotrichum* spp. que causan la MFG generan pequeñas puntuaciones deprimidas en frutos, lesiones necróticas en hojas y defoliación (Talamini & Bogo, 2009; Hamada, 2013; Casanova *et al.*, 2017; Alaniz *et al.*, 2019).



Figura 1.2. Caracterización de síntomas de podredumbre amarga (PA) ocasionados por *Colletotrichum* en frutos de manzanos de plantaciones comerciales ubicados en la región centro de Santa Fe. Síntoma típico de PA en manzana ‘Eva’; sobre la lesión se observa el signo conformado por conidios contenidos en una masa mucilaginosa color naranja (A). Múltiples sitios de infección por *Colletotrichum* spp. en manzana ‘Caricia’ (B). Presencia de PA en árbol de manzana ‘Eva’. Los síntomas inician desde la parte basal del árbol (C). Corte de fruto mostrando el avance en forma de “V” característico de podredumbres ocasionadas por *Colletotrichum* spp. (D).

Los síntomas iniciales de MFG en hojas aparecen en verano; como se muestra en la Figura 1.3A, inician como pequeñas manchas de color marrón rojizo, que se convierten en lesiones necróticas asimétricas, de color tostado claro (Katsurayama & Boneti, 2009; Cannon *et al.*, 2012; Casanova *et al.*, 2017; Alaniz *et al.*, 2019; Velho *et al.*, 2019). Luego de 5 a 7 días las manchas en las hojas crecen rápidamente causando clorosis generalizada y defoliación intensa (Figura 1.3 B y C). En los frutos, la MFG provoca lesiones necróticas redondas, ligeramente deprimidas y rodeadas por un halo rojizo, que no superan los 3 mm de diámetro (Figura 1.3D). Estas lesiones no se expanden a medida que la fruta madura y presentan un aspecto corchoso, sin evolucionar a la típica PA (Wang *et al.*, 2012; Casanova *et al.*, 2017; Alaniz *et al.*, 2019).

La MFG infecta principalmente al cultivar ‘Golden Delicious’ y sus descendientes como ‘Gala’ y ‘Cripps Pink’ (Velho *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015a) y recientemente ha sido reportada en el cultivar ‘Granny Smith’ en China (Zhang *et al.*, 2021).



Figura 1.3. Caracterización de los síntomas de Mancha Foliar por *Glomerella* (MFG) en hojas y frutos del cultivar ‘Gala’ de un huerto comercial ubicado en San José, Uruguay (34°38’58’’S, 56°45’19’’O). Lesiones necróticas iniciales en forma de parches (A). Planta de manzano con defoliación anticipada severa (B) y detalle de hojas con los típicos parches necróticos (flechas rojas) que provoca la MFG (C). Lesiones necróticas, puntiformes y corchosas en frutos (D) características de poblaciones de *Colletotrichum* spp. que generan MFG. Las fotos que forman parte de esta figura fueron cedidas por el Dr. Pedro Mondino.

1.3.1.3. Especies de *Colletotrichum* asociadas a PA y MFG, y su interrelación

Tradicionalmente, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* han sido las dos especies asociadas a la PA a nivel mundial, mientras que la MFG fue atribuida a su estado teleomorfo, *Glomerella* spp. (Brook, 1977; Shi *et al.*, 1996; Freeman *et al.*, 2001; González *et al.*, 2006, Giaretta *et al.*, 2010). En el año 2012, los miembros de la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Colletotrichum* (*International Subcommittee on Colletotrichum Taxonomy*), apoyaron el uso del nombre *Colletotrichum* sobre el de *Glomerella* para todas las enfermedades causadas por este género, de manera de minimizar las confusiones taxonómicas existentes (Crous *et al.*, 2015; Rojo-Baez *et al.*, 2017).

A partir de revisiones y trabajos de investigación realizados después de la introducción del análisis filogenético multilocus, complementados con estudios morfológicos, ecológicos y patogénicos se han reportado numerosas nuevas especies de *Colletotrichum* asociadas a PA

y MFG a nivel mundial, pertenecientes a tres grandes complejos: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. boninense* (Carraro *et al.*, 2022).

Entre las principales especies que causan PA se citan *C. fioriniae*, *C. godetiae*, *C. nymphaeae*, *C. fructicola*, *C. melonis*, *C. theobromicola*, *C. siamense*, *C. aenigma*, *C. alienum*, *C. chrysophilum*, *C. noveboracense* y *C. orientalis* (Dowling *et al.*, 2020; Khodadadi *et al.*, 2020; Carraro *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2022a). Respecto a las especies de *Colletotrichum* asociadas a MFG, se identificaron *C. aegnima*, *C. asianum*, *C. chrysophilum*, *C. fioriniae*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. limetticola*, *C. melonis*, *C. nymphaeae*, *C. paranaense*, *C. siamense* y *C. tropicale* (Velho *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015a; Casanova *et al.*, 2017; Hoge, 2017; Alaniz *et al.*, 2019; Johnson, 2019; Moreira *et al.*, 2019a; Velho *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020; Astolfi *et al.*, 2022; Carraro *et al.*, 2022). Aunque en algunos lugares la PA y la MFG ocurren simultáneamente en los campos de manzano, la relación que existe entre sus agentes causales no se comprende completamente (Moreira *et al.*, 2021). Ante esto, numerosos autores sostienen que la mayoría de los aislados de MFG no tienen la capacidad de causar PA (Sutton & Valdebenito-Sanhueza, 1998; Alaniz *et al.*, 2019; Carraro *et al.*, 2022). Excepcionalmente, se ha encontrado que algunos aislados causaron síntomas de PA al ser inoculados mediante heridas (Velho *et al.*, 2015). Estudios recientes han demostrado que existen grandes diferencias entre los perfiles transcriptómicos de aislados de MFG y PA (Jiang *et al.*, 2022). En comparación con los aislados de PA, los aislados de MFG producen mayor cantidad de metabolitos secundarios, mayor secreción de enzimas extracelulares, una acumulación superior de melanina y un incremento en la expresión de genes asociados a la patogenicidad. Por estos motivos, los autores proponen que los aislados de MFG se originan a partir de aislados de PA a través de mutaciones a cepas más virulentas (Jiang *et al.*, 2022). En base a estos antecedentes, ha sido propuesto que la PA y la MFG son causadas por diferentes poblaciones de *Colletotrichum*.

1.4 PA y MF asociadas a *Colletotrichum* spp. en la región central de Santa Fe

Como fue mencionado previamente, a partir del año 2014 comenzaron a detectarse síntomas característicos de PA en los cultivares de manzanas con bajos requerimientos de frío ‘Caricia’, ‘Princesa’ y ‘Eva’ cultivados en la región central de Santa Fe. La enfermedad se caracterizaba por la presencia de una típica podredumbre hundida, que avanzaba hacia el corazón del fruto en forma de “V” y desarrollaba anillos concéntricos de acérvulas color salmón del tamaño de una cabeza de alfiler en condiciones de alta humedad. Además, en estudios posteriores se detectó la presencia de una sintomatología foliar asociada a

Colletotrichum spp., caracterizada por MF necróticas (1 a 3 mm de diámetro) que luego se desarrollaban formando parches irregulares en el limbo (7-10 mm de diámetro). Sin embargo, es importante destacar que la clorosis y la defoliación típicamente descritas para MFG no fueron observadas en el campo. Tampoco se encontraron los síntomas típicos de MFG en frutas.

En Argentina, la PA del manzano fue atribuida exclusivamente a *C. gloeosporioides* hace ya más de setenta años (Marchionatto, 1948; Fernández Valiella, 1978). Desde entonces, no se han realizado nuevos estudios que actualicen esta información, y el Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas (SINAVIMO) reporta a *C. gloeosporioides* como único agente causal de PA en manzano ([https://www.sinavimo.gob.ar/plaga/colletotrichum - gloeosporioides](https://www.sinavimo.gob.ar/plaga/colletotrichum-gloeosporioides)).

El conocimiento de las especies de *Colletotrichum* presentes en una región, así como la susceptibilidad de los cultivares locales, y los aspectos centrales de la patogénesis y la epidemiología de las enfermedades que estos patógenos causan, son esenciales para definir estrategias de manejo. En la región central de Santa Fe existen serias carencias de conocimiento acerca de la etiología y epidemiología de la PA y de las MF asociadas a *Colletotrichum* en manzano, lo que dificulta establecer estrategias y medidas de manejo eficientes. En base a estos antecedentes, consideramos crucial avanzar en el conocimiento del comportamiento de estas enfermedades en la región. Por ello, en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se identificaron las especies de *Colletotrichum* causantes de PA y MF en plantaciones de manzano de la región centro de Santa Fe, mediante caracterización fenotípica, molecular y patogénica de aislados. Por otra parte, se estudiaron diferentes fases del proceso de la patogénesis de la enfermedad en la región y se evaluó la sensibilidad a fungicidas de los diferentes aislados identificados.

De lo expuesto anteriormente, se desprenden las siguientes hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS

- En la provincia de Santa Fe, la PA y MF en manzanos con bajos requerimientos de frío son causadas por diversas especies de *Colletotrichum* que se diferencian por su capacidad para infectar distintos cultivares y órganos de manzanos.
- Los aislados regionales de *Colletotrichum* sobreviven en su etapa asexual en la parte aérea de la planta de manzano. El proceso de infección ocurre mediante colonización hemibiotrófica intracelular.

- Los aislados regionales de *Colletotrichum* resultan sensibles a fungicidas con diferentes principios activos.

En base a estas hipótesis se plantean los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo general

Contribuir al manejo de la PA y MF en manzanos con bajos requerimientos de frío de la provincia de Santa Fe mediante la caracterización molecular y patogénica de aislados de *Colletotrichum* spp.

Objetivos específicos

1. Identificar y caracterizar aislados de *Colletotrichum* obtenidos a partir de síntomas de PA y MF en cultivares de manzano con bajos requerimientos de frío en la región central de Santa Fe.
2. Estudiar la capacidad de los aislados fúngicos para infectar frutos y hojas de manzano mediante pruebas de patogenicidad directas y cruzadas
3. Evaluar la susceptibilidad de los cultivares de manzanos con bajos requerimientos de frío a las especies de *Colletotrichum* identificadas.
4. Caracterizar las principales fases de la patogénesis de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* spp. en manzanos con bajos requerimientos de frío en la región central de Santa Fe.
5. Evaluar la sensibilidad *in vitro* a diferentes fungicidas de aislados correspondientes a las especies de *Colletotrichum* identificadas.

2. Capítulo 1

Caracterización de *Colletotrichum siamense*, agente causal de podredumbre amarga y manchas foliares en cultivares de manzanos con bajos requerimientos de frío de la región central de Santa Fe

2.1. INTRODUCCIÓN

2.1.1. El género *Colletotrichum*: historia y características

Actualmente, *Colletotrichum* pertenece al reino Fungi, Subreino Dikarya, División Ascomycota, Subdivisión Pezizomycotina, Clase Sordariomycetes, Subclase Hypocreomycetidae, orden Glomerellales; y es el único género reconocido dentro de la Familia Glomerellaceae (Hyde *et al.*, 2020; Jayawardena *et al.*, 2021; Bhunjun *et al.*, 2021; Talhinhos & Baroncelli, 2021).

Desde el inicio del género *Colletotrichum*, la confusión ha rodeado su relación con el género más antiguo *Vermicularia* y más tarde con *Gloeosporium*. El género *Vermicularia*, mucho más antiguo, había sido descrito por Tode en 1790 y revalidado por Fries en 1825; tenía como principal característica la presencia de cuerpos fructíferos en forma de estroma. En el año 1831, el género fue revisado por Corda y renombrado *Colletotrichum* en base a su morfología macro y microscópica. En 1849 fue descrito el género *Gloeosporium*, muy similar a *Colletotrichum*, pero su característica distintiva era que no producía setas en las acérvulas (Menezes, 2006; Cannon *et al.*, 2012). En 1957, VonArx tratando de resolver la incertidumbre taxonómica de *Colletotrichum* concluyó que muchas especies de hongos incluidas en los géneros *Colletotrichum*, *Vermicularia* y *Gloeosporium* pertenecían al mismo género, por lo que decidió mantener el nombre *Colletotrichum* frente a *Vermicularia* y *Gloeosporium*. Así, se amplió el concepto genérico de *Colletotrichum*, pero el número de especies, alrededor de 750 en ese momento, se redujo a 11, en función de caracteres morfológicos, con formas especiales o variedades denominadas según el hospedante (Menezes, 2006; Hyde *et al.*, 2009a; Cannon *et al.*, 2012; Jayawardena *et al.*, 2021; Talhinhos & Baroncelli, 2021).

Las esporas de reproducción asexual de *Colletotrichum* son los conidios, estos son unicelulares, hialinos y se originan sobre conidióforos que en su conjunto conforman fructificaciones (conidiomatas) denominadas acérvulas que en ocasiones pueden presentar setas. Generalmente, estos conidios están rodeados por una matriz gelatinosa conformada con polisacáridos y proteínas hidrosolubles. Esta matriz probablemente protege a los conidios de la desecación, aumentando la eficiencia de germinación y penetración en el tejido huésped (Menezes, 2006).

Tradicionalmente, el estado anamorfo de *Colletotrichum* ha sido asociado al teleomorfo *Glomerella*, identificado oportunamente por Stonem en 1898, quien caracterizó la fructificación sexual como peritecios no estromáticos, solitarios o en grupo, globosos o subglobosos, a veces alargados en forma piriforme y color pardo oscuro o negro. En el año

2011 a partir de la firma de la Declaración de Amsterdam, surgió el concepto de *ONE FUNGUS, ONE NAME*¹ (Wingfield *et al.*, 2012). En este sentido, en el año 2012, con el objetivo de minimizar las confusiones taxonómicas existentes, los miembros de la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Colletotrichum* (*International Subcommission on Colletotrichum Taxonomy*), apoyaron el uso del nombre *Colletotrichum* sobre el de *Glomerella* (Crous *et al.*, 2015; Rojo-Baez *et al.*, 2017).

2.1.2. Identificación tradicional de especies en el género *Colletotrichum*

Tradicionalmente, las especies de *Colletotrichum* han sido identificadas y delimitadas en base a caracteres morfológicos y fisiológicos, tales como forma y tamaño de conidios y apresorios, presencia o ausencia de setas, velocidad de crecimiento, color y textura del micelio, tinción del medio de cultivo, desarrollo o no del estado teleomorfo y la especie hospedante, entre otros. Sin embargo, estos criterios no son suficientes para la diferenciación entre especies debido a la variación que pueden sufrir la morfología y el fenotipo bajo influencia de diferentes factores ambientales (Cannon *et al.*, 2012; Weir *et al.*, 2020; Chung *et al.*, 2020). Las imprecisiones taxonómicas en este género han hecho la identificación difícil y complican los esfuerzos por entender la interacción con los hospedantes, el correcto diagnóstico de la enfermedad, el desarrollo de estrategias de manejo y el establecimiento de programas de cuarentena efectivos (Hyde *et al.*, 2009a; Cai *et al.*, 2009). Para resolver estos problemas, Cai *et al.* (2009) plantearon un enfoque polifásico para la identificación de especies de *Colletotrichum*, que integre el estudio de características culturales, morfológicas, fisiológicas y patogénicas, en combinación con la identificación molecular, a través del análisis filogenético de secuencias de ácidos nucleicos.

2.1.3. Identificación molecular de especies en el género *Colletotrichum*

A fines de 1990 se llevó a cabo el primer taller internacional sobre *Colletotrichum* en el Reino Unido (Bailey & Jeger, 1992) que marcó el comienzo del uso de los métodos moleculares en el estudio de *Colletotrichum* (Jayawardena *et al.*, 2021). Los primeros estudios fueron realizados en base a secuencias de la región del espaciador transcrito interno del ADN ribosomal (ITS-rDNA, del inglés *internal transcriber spacer*) (Mills *et al.*, 1992; Sherriff *et al.*, 1994; Screenivasaprasad *et al.*, 1996) posteriormente empleada como código

¹ El concepto de One Fungus-One Name (un hongo-un nombre) establece que cada hongo debe tener sólo un nombre (ya sea el del estado anaformo o teleomorfo) y que el mismo deber ser definido por la Comisión Internacional de Taxonomía de Hongos (*International Commission on the Taxonomy of Fungi*, <http://www.fungaltaxonomy.org>).

de barras² primario para la identificación de géneros de hongos (Schoch *et al.*, 2012; Crous *et al.*, 2015). Posteriormente se comprobó que ITS era un marcador útil para distinguir grandes complejos³ de *Colletotrichum*, mientras que para diferenciar e identificar con precisión las especies dentro de los complejos era necesario emplear códigos de barras secundarios (Cannon *et al.*, 2012).

En el año 2009, se avanzó notablemente en la sistemática de *Colletotrichum* luego de la publicación de un número especial de *Fungal Diversity* (Nro. 39, 2009), destinado a la revisión taxonómica del género (Cai *et al.*, 2009; Hyde *et al.*, 2009a; Hyde *et al.*, 2009b). En el marco de un enfoque polifásico, estos autores propusieron el análisis filogenético multilocus⁴ como base para definir nuevas especies de *Colletotrichum*.

La selección de los mejores loci o marcadores para identificar especies de *Colletotrichum* es un proceso en continua revisión y actualización (Jayawardena *et al.*, 2020). En este sentido, han sido recomendados y utilizados numerosos genes para distinguir y delimitar a las especies (Tabla 2.1), que se han ido actualizando a lo largo del tiempo (Cannon *et al.*, 2012; Vieira *et al.*, 2020; Jayawardena *et al.*, 2020; Jayawardena *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). Vieira *et al.* (2020) realizaron una investigación con el objetivo de encontrar las regiones informativas óptimas para la identificación de las especies de *Colletotrichum*, teniendo como premisa proponer al menos 3 marcadores que resulten los más adecuados para cada complejo. Aunque *gapdh* (gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa), *his3* (histona 3) y *tub2* (β -tubulina) estuvieron entre los mejores marcadores, no hubo un solo conjunto de marcadores que fuera útil para todos los complejos estudiados. Otro aspecto importante a tener en cuenta en la selección de los marcadores a utilizar es la disponibilidad de secuencias en las bases de datos. En este sentido, aunque Vieira *et al.* (2020) concluyeron que *apn2/mat-igs*, *gap2-igs* y *apn2* (del inglés *intergenic spacer between DNA lyase and the mating-type locus mat1-2-1*; *intergenic spacer between gapdh and a hypothetical protein*; *DNA lyase*, respectivamente) son las regiones más informativas para separar especies dentro del complejo de especies de *C. gloeosporioides*, también mencionaron que las secuencias de

² Un código de barras de ADN representa un patrón de secuencia de ADN único de 400 a 800 nucleótidos de longitud que puede procesarse rápidamente a partir de muestras o cultivos y analizarse sin ambigüedades mediante programas informáticos para identificar especies.

³ Dentro del género *Colletotrichum* un complejo se define como un grupo de especies que forman un clado monofilético y comparten características en común como, por ejemplo, similar morfología de conidios (Cannon *et al.* 2012).

⁴ El análisis filogenético multilocus incluye una combinación de genes mitocondriales, nucleares, ribosómicos y codificadores de proteínas, que son analizados utilizando diferentes enfoques, como máxima parsimonia, máxima verosimilitud y/o inferencia bayesiana (Crous *et al.*, 2015).

estos genes no están disponibles en las bases de datos para algunas de las especies del complejo. Más recientemente, Liu *et al.* (2022) presentaron una actualización filogenómica del género *Colletotrichum*, donde recomiendan el uso de los marcadores ITS, gapdh, chs-1, hist3, act y tub2 para distinguir las especies que conforman la mayoría de los complejos de *Colletotrichum*.

Tabla 2.1 Diferentes loci de genes utilizados en la identificación de *Colletotrichum*. Adaptado de Dowling *et al.* (2020); Jayawardena *et al.* (2021) y Liu *et al.* (2022).

Región	Nombre	Función
ITS	Internal transcribed spacer	Ribosómico
LSU	Large Subunit	Nuclear
mat2	mating-type idiomorphs 2	Codificador de proteínas
tub2	β -tubulin 2	Codificador de proteínas
his3	Histone3	Codificador de proteínas
mtSSU	the mitochondrial small subunit	Mitocondrial
gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Nuclear
gs	Glutamine synthetase	Nuclear
mat 1 2 (HMG marker)	Mat1-2 mating type gene	Codificador de proteínas
sod2	Manganese-superoxide dismutase	Nuclear/ribosómico
Ccret2	Ccret2 transposon	Codificador de proteínas
apn2	DNA lyase	Nuclear
act	Actin	Codificador de proteínas
chs-1	chitin synthase	Codificador de proteínas
cal	Calmodulin	Codificador de proteínas
ef1α	translation elongation factor 1- α	Codificador de proteínas
rpb1	the large subunit of RNA polymerase II	Codificador de proteínas
apmat	Apn2-Mat1-2 intergenic spacer and partial mating type Mat1-2 gene	Nuclear
apn15l	Apn2 gene for DNA lyase exon 3 and 4	Nuclear
mat5L	MAT1-2-1 gene 5' intergenic region	Codificador de proteínas
apn1ex3	Apn2 gene for DNA lyase exon 3	Nuclear
apn13l	Apn2 gene for DNA lyase exon 2 and 3	Nuclear

En la actualidad, el uso combinado del diagnóstico molecular y la caracterización morfológica tradicional es la forma más apropiada para el estudio de *Colletotrichum* spp. (Cannon *et al.*, 2012; Jayawardena *et al.*, 2021). Una vez que una especie es correctamente identificada, esta información puede ser usada para el desarrollo e implementación de estrategias de manejo efectivas (Baroncelli *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2020).

2.1.4. Situación taxonómica actual del género *Colletotrichum*. Especies identificadas en manzano

En los últimos años, se han publicado numerosas revisiones del género *Colletotrichum* y numerosas especies que afectan diferentes cultivos han sido re-clasificadas y/o re-identificadas (Cannon *et al.*, 2012; Hyde *et al.*, 2014; Jayawardena *et al.*, 2016; Bhunjun *et al.*, 2021; Jayawardena *et al.*, 2021). Actualmente, Liu *et al.* (2022) reconocen la existencia de 280 especies distribuidas en 16 clados o complejos mayores y 15 especies no asignadas a ningún complejo (Figura 2.1).

Entre los 16 complejos, *C. acutatum*, *C. boninense* y *C. gloeosporioides* son los que contienen la mayor cantidad de especies identificadas. Dentro de estos tres grandes complejos se encuentran las 22 especies asociadas a la PA y las 13 especies asociadas a la MFG encontradas hasta el presente (Dowling *et al.*, 2020; Carraro *et al.*, 2022, Chen *et al.*, 2022a), las cuales se presentan en la Tabla 2.2. Cabe destacar que la re-identificación y re-clasificación de especies del género *Colletotrichum* es continua. Como ejemplo, puede mencionarse que aislados de MFG provenientes de Uruguay y Brasil identificados en el año 2015 por Velho *et al.* como *C. fructicola*, fueron recientemente re-identificados como *C. chrysophilum* por el mismo grupo de trabajo (Astolfi *et al.*, 2022).

Entre las diferentes especies de *Colletotrichum* identificadas en manzano, existen grandes diferencias en cuanto a agresividad, epidemiología, sensibilidad a fungicidas y, en consecuencia, manejo (Velho *et al.*, 2015; Munir *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2019b; Dowling *et al.*, 2020; Carraro *et al.*, 2022). Por lo tanto, para poder implementar un sistema de manejo integrado de las enfermedades causadas por este género es necesario conocer con exactitud el agente causal de las mismas, aspectos de su patogénesis y sus características epidemiológicas, así como la susceptibilidad de los cultivares implantados en cada región.

En la región central de Santa Fe existe falta de conocimiento acerca de la etiología y epidemiología de la PA y de las MF asociadas a *Colletotrichum* en manzano, así como de la susceptibilidad de los cultivares, lo que dificulta establecer estrategias y medidas de manejo eficientes. En base a los antecedentes presentados, en este capítulo de Tesis Doctoral se propuso avanzar en el conocimiento del comportamiento de las enfermedades de la PA y MF del manzano en Santa Fe, Argentina. Por lo tanto, este estudio se centró en 1) identificar y caracterizar aislados de *Colletotrichum* obtenidos de frutos y hojas con síntomas de PA y MF en cultivares de manzano con bajos requerimientos de frío en la región central de Santa Fe, utilizando características fenotípicas y análisis filogenético, 2) estudiar su capacidad para infectar frutos y hojas de manzano mediante pruebas de patogenicidad directas y cruzadas,

y 3) evaluar la susceptibilidad de los cultivares de manzano con bajo requerimiento de frío a las especies de *Colletotrichum* identificadas.

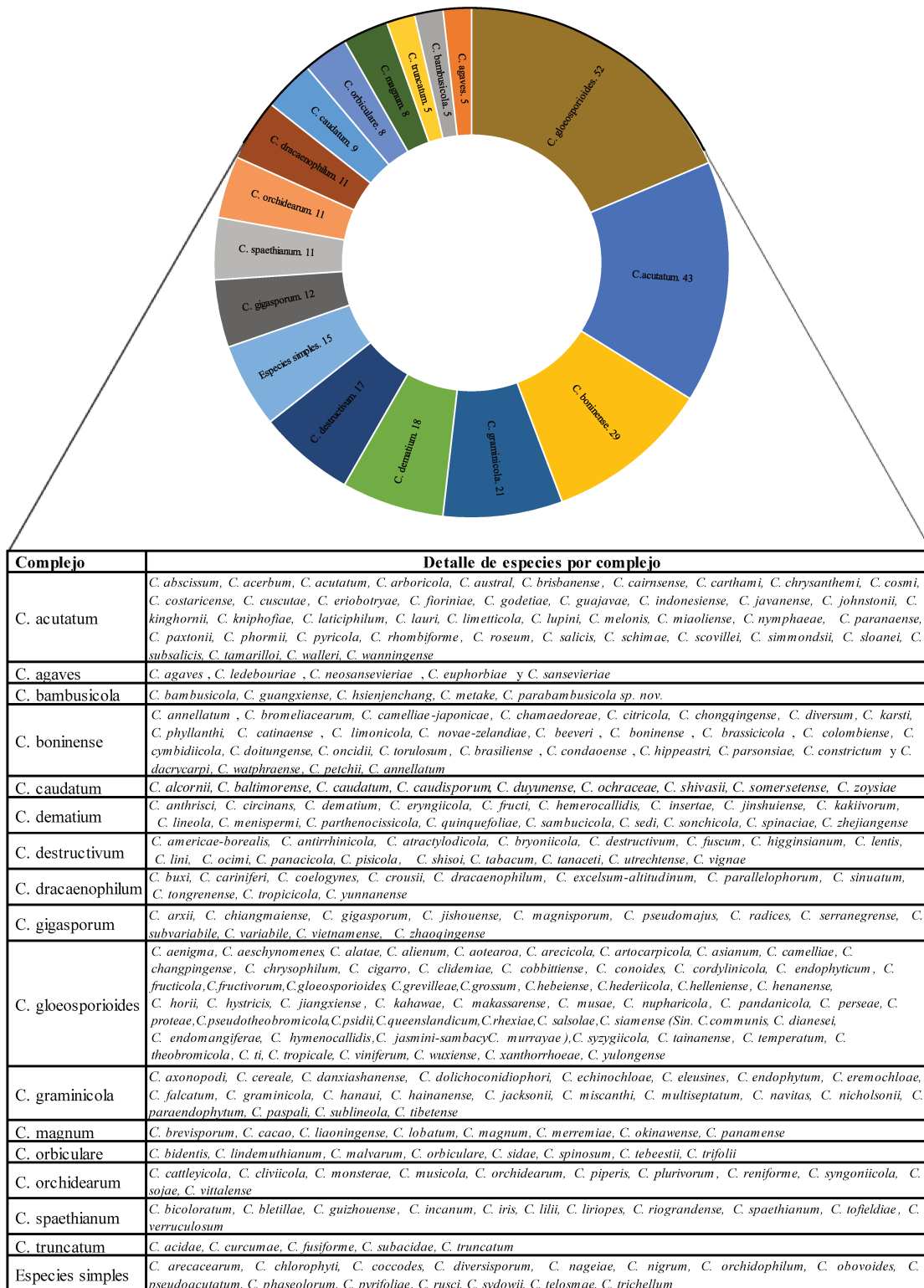


Figura 2.1 Distribución y resumen de especies de *Colletotrichum* dentro de cada complejo. Adaptado de Liu *et al.* (2022). En el gráfico se muestra la proporción de cada complejo seguido del número de especies que contiene cada uno. La tabla detalla las especies de los diferentes complejos o clados.

Tabla 2.2 Especies del género *Colletotrichum* asociadas a la podredumbre amarga y a la mancha foliar por *Glomerella* en diferentes regiones del mundo. Adaptado de Dowling *et al.* (2020), Carraro *et al.* (2022) y Chen *et al.* (2022)a.

PODREDUMBRE AMARGA		
Complejo	especie	Región
C. acutatum	<i>C. fioriniae</i>	EEUU, Bélgica, Croacia, Japón, Corea, Francia, Eslovenia
	<i>C. godetiae</i>	Bélgica, Reino Unido, Países Bajos, Eslovenia, Japón, Croacia, Australia
	<i>C. nymphaeae</i>	EEUU, Bélgica, Brasil, Japón, Corea
	<i>C. cuscatae</i>	Países Bajos, Nueva Zelanda, EEUU
	<i>C. salicis</i>	Bélgica, Alemania, Nueva Zelanda
	<i>C. acerbum</i>	Nueva Zelanda
	<i>C. acutatum s. str.</i>	Bélgica, Australia
	<i>C. melonis</i>	Brasil, Uruguay
	<i>C. rhombiforme</i>	Bélgica, China
	<i>C. limeticola</i>	Brasil
	<i>C. paranaense</i>	Brasil
	<i>C. orientalis</i>	China
	<i>C. simmondsii</i>	Japón
C. gloeosporioides	<i>C. fructicola</i>	EEUU, Corea, Brasil, Uruguay, Japón, Francia, China
	<i>C. siamense</i>	EEUU, Corea, Japón, Pakistán, Argentina
	<i>C. tropicale</i>	EEUU
	<i>C. alienum</i>	EEUU, Nueva Zelanda
	<i>C. theobromicola (syn. C. fragariae)</i>	EEUU, Uruguay
	<i>C. aenigma</i>	Japón, China
	<i>C. kahawae</i>	EEUU, Bélgica
	<i>C. gloeosporioides s. str.</i>	EEUU
C. boninense	<i>C. karstii</i>	Brasil
MANCHA FOLIAR POR GLOMERELLA		
C. acutatum	<i>C. fioriniae</i>	EEUU
	<i>C. nymphaeae</i>	Brasil
	<i>C. melonis</i>	Brasil
	<i>C. paranaense</i>	Brasil
	<i>C. limeticola</i>	Brasil
C. gloeosporioides	<i>C. fructicola</i>	Brasil, Japón, China, EEUU, Uruguay
	<i>C. gloeosporioides</i>	EEUU
	<i>C. aenigma</i>	China, Japón
	<i>C. alienum</i>	EEUU, Nueva Zelanda
	<i>C. siamense</i>	EEUU, Japón
	<i>C. tropicale</i>	EEUU
	<i>C. asianum</i>	China
C. boninense	<i>C. karstii</i>	Brasil

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Obtención de aislados y condiciones de cultivo

Durante tres años consecutivos se monitorearon manzanos de entre 7 y 10 años de edad, localizados en ocho pequeños huertos de cuatro localidades diferentes de la provincia de Santa Fe, centro de Argentina. Para determinar la identidad de las especies de *Colletotrichum* que afectan manzano, se recolectaron frutos con síntomas de PA y hojas con MF (Figura 2.2) provenientes de los cultivares ‘Caricia’ (IAPAR 77, ‘Anna’ × ‘Prima’), ‘Princesa’ (‘Anna’ × ‘NJ56’) y ‘Eva’ (IAPAR 75; ‘Anna’ × ‘Gala’). Se tomaron al azar un máximo de tres muestras por árbol, incluyendo frutos y hojas y cinco árboles por huerto.

Para la obtención de los aislados, los frutos fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio (1% v/v) por 4 min. Luego se abrieron por la parte opuesta a la podredumbre, a efectos de dejar al descubierto la zona de avance en profundidad de la lesión, de donde se extrajeron pequeñas porciones de tejido mediante bisturí. En el caso de las hojas, se cortaron pequeños trozos (3 a 5mm²) en la zona de avance de la lesión, abarcando tejido sano y necrótico. Los mismos fueron desinfectados inicialmente en etanol (70% v/v) por 30 seg, luego en hipoclorito de sodio (1% v/v) por un min y finalmente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril (ADE). En ambos casos, las porciones de tejido se sembraron en medio agar papa dextrosa (APD, Britania, Argentina) enmendado con sulfato de estreptomicina 0,5 g.l⁻¹. Las placas se incubaron a 25°C con 12 h de luz: 12 h de oscuridad durante siete a diez días. A partir de los cultivos obtenidos se realizaron aislados monospóricos mediante técnica de transferencia de un conidio germinado. Los mismos se conservaron en papel de filtro deshidratado con sílica gel en el freezer a -20°C y se depositaron en la colección micológica del Laboratorio de Fitopatología (ICiAgro Litoral, UNL, CONICET, FCA) para posteriores ensayos.

2.2.2. Caracterización morfológica

Los aislados monospóricos se incubaron a 25°C y 12 h de luz: 12 h de oscuridad durante siete días y se analizaron características morfológicas como color de las colonias, presencia de zonas de crecimiento, y habilidad de producir peritecios en medio de cultivo. Además, se observaron las características morfológicas de 50 conidios de cada aislado utilizando un microscopio Leica DM1000 (Leica, Wetzlar, Alemania) acoplado a una cámara Canon EOS Rebel T2i (Canon, Melville, NY) y se midió el largo y el ancho de los mismos empleando el software Image J v1.41 (Rasband, 2018).

Para determinar la tasa de crecimiento de las colonias, se retiraron asépticamente discos de 5 mm de diámetro de la periferia de colonias de siete días de crecimiento y se colocaron en el centro de placas de Petri con APD. Los aislados se cultivaron durante cinco días a 20, 25, 30 y 35°C. Se realizaron tres repeticiones para cada aislado y temperatura. El diámetro de la colonia (mm) se midió en dos direcciones perpendiculares y los datos se utilizaron para calcular el crecimiento del micelio en milímetros por día (mm d^{-1}). El ensayo se repitió dos veces con resultados similares. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y las medias se analizaron mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$) a través del software InfoStat v2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017).

2.2.3. Análisis filogenético

Para la identificación molecular de los aislados, se extrajo el ADN de colonias crecidas en APD durante siete días siguiendo la metodología descrita por Gupta *et al.* (2013). Posteriormente se amplificaron tres regiones génicas, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR): el gen que codifica para la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (*gapdh*, 308 pb) usando los cebadores GDF (5'-GCCGTCAACGACCCTTCATTGA-3') y GDR (5'-GGGTGGAGTCGTACTIONTGGAGCATGT-3', Templeton *et al.*, 1992); el gen β -tubulina (*tub2*, 716 pb) usando los cebadores T1 (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3', O'Donnell & Cigelnik, 1997) y Bt2b (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3', Glass & Donaldson, 1995) y el gen calmodulina (*cal*, 756 pb) usando los cebadores CL1C (5'-GAATTCAAGGAGGCCTTCTC-3') y CL2C (5'-CTTCTGCATCATGAGCTGGGAC-3', Weir *et al.*, 2012). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne TC-312 (Techne, Cambridge, Reino Unido) en mezclas de reacción de 20 μl que contenían 1 \times PCR buffer, 2.5 mM MgCl_2 , 0.4 μM de cada primer, 0.2 mM dNTPs, 1 U de Taq DNA polimerasa (PB-L, Productos Bio-Lógicos®, Argentina) y 100 ng de ADN genómico. Las amplificaciones se programaron para realizar una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 34 ciclos, cada uno de los cuales consta de un paso de desnaturalización a 94°C por 30 seg, un paso de hibridación y un paso de extensión de 52°C por 30 seg y 72°C por 30 seg para *gapdh*, 57°C durante 30 seg y 72° durante 1 min para *tub2* y 59°C durante 30 seg y 72° durante 45 seg para *cal*, respectivamente. La extensión final se realizó a 72°C durante 7 min. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1,5% por electroforesis a 90 mA en solución tampón 1 \times TAE (Tris-Acetato 40 Mm, EDTA 1 mM). Finalizada la electroforesis, el gel fue teñido con GelRed (Biotium, Hayward, EE. UU.) de acuerdo a las indicaciones del

fabricante. Posteriormente se visualizó bajo luz ultravioleta (300 nm) utilizando un transiluminador Biostep UST-30M-8E (Biostep, Jahnsdorf, Alemania).

Los productos amplificados se purificaron y secuenciaron con los mismos cebadores en Macrogen (Seoul, Corea). Las secuencias obtenidas en ambas direcciones para cada región del gen, se alinearon con el programa MEGA X (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*, Kumar *et al.*, 2018) utilizando el algoritmo MUSCLE. Luego, las alineaciones individuales se concatenaron a través de la versión 3.61 de Mesquite (Maddison & Maddison, 2019) y se emplearon para el análisis filogenético efectuado en el programa MEGA X. El árbol filogenético multilocus de las regiones de los genes *gapdh*, *tub2* y *cal* se generó utilizando el método de Máxima Verosimilitud y el modelo Tamura de 3-parámetros. Secuencias de 52 aislados de *Colletotrichum* obtenidos de GenBank se incorporaron a las alineaciones como referencia (Tabla 2.3), incluyendo secuencias de especies tipificadas (*ex-type*). La confiabilidad de este árbol se evaluó mediante un análisis “bootstrap” con 1200 repeticiones. Las secuencias generadas en este estudio fueron depositadas en la base de datos de GenBank.

2.2.4. Pruebas de patogenicidad directas y cruzadas

Para cumplir los Postulados de Koch y corroborar la especificidad de órgano (hoja o fruto), todos los aislados de *Colletotrichum* se inocularon en frutos y hojas del cultivar de manzana del cual se obtuvieron originalmente. Las inoculaciones se realizaron de acuerdo a Alaniz *et al.* (2019) con algunas modificaciones.

-Inoculación de frutos

Manzanas visualmente sanas de los cultivares ‘Caricia’, ‘Eva’ y ‘Princesa’ de tamaño comercial y con color verde predominante se desinfectaron superficialmente con etanol (70% v/v) por 3 min y solución de hipoclorito de sodio (1% v/v) durante 1 min. Inmediatamente, las frutas se enjuagaron tres veces en ADE durante 2 min y se secaron en papel absorbente estéril. Posteriormente, con ayuda de una aguja estéril se hizo una herida de 0,5 mm de diámetro y 1 mm de profundidad en cada fruto. Por cada aislado, 8 frutos heridos y 8 frutos sin herir se asperjaron hasta el punto de goteo con una suspensión de 1×10^5 conidios mL⁻¹. La misma cantidad de frutos heridos y sin herir fueron asperjados con ADE y utilizados como control.

Tabla 2.3. Detalle de números de acceso de Genbank de las secuencias utilizadas para el análisis filogenético

Fuente/Origen			GenBank - Número de acceso			
Aislado	Órgano/Cultivar	Lugar	gapdh	tub2	cal	Especie
ICMP 18608*	<i>Persea americana</i>	Israel	JX010044	JX010389	JX009683	<i>C. aenigma</i>
ICMP 18686	<i>Pyrus pyrifolia</i>	Japón	JX009913	JX010390	JX009684	<i>C. aenigma</i>
ICMP 17673	<i>Aeschynomene virginica</i>	EEUU	JX009930	JX010392	JX009721	<i>C. aeschynomenes</i>
ICMP 17919*	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX009990	JX010383	JX009738	<i>C. alatae</i>
CBS 304.67	<i>Dioscorea alata</i>	India	JX010011	JX010449	JX009739	<i>C. alatae</i>
ICMP 12071*	<i>Malus domestica</i>	Nueva Zelanda	JX010028	JX010411	JX009654	<i>C. alienum</i>
ICMP 18621	<i>Persea americana</i>	Nueva Zelanda	JX009959	JX010386	JX009657	<i>C. alienum</i>
GM595	<i>Mangifera indica</i>	India	JQ894623	JQ894601	KC790789	<i>C. asianum</i>
ICMP 18580*	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX010053	JX010406	FJ917506	<i>C. asianum</i>
CBS 123755*	<i>Crinum asiaticum</i> var. <i>sinicum</i>	Japón	JQ005240	JQ005588	JQ005674	<i>C. boninense</i>
CMM 4268*	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KX094183	KX094285	KX094063	<i>C. chrysophilum</i>
CMM 4394	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KX094179	KX094282	KX094059	<i>C. chrysophilum</i>
CBS 142.31	<i>Fragaria</i> × <i>ananassa</i>	EEUU	JX010024	JX010373	JX009592	<i>C. fragariae</i>
CMM 4242	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KX094173	KX094278	KX094068	<i>C. fragariae</i>
3589	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	KX094175	KX094280	KX094067	<i>C. fructicola</i>
CBS 125397*	<i>Tetragastris panamensis</i>	Panamá	JX010032	JX010409	JX009674	<i>C. fructicola</i>
ICMP 18581*	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX010033	JX010405	FJ917508	<i>C. fructicola</i>
ICMP 17821	<i>Citrus sinensi</i>	Italia	JX010056	JX010445	JX009731	<i>C. gloeosporioides</i>
CBS 132879*	<i>Grevillea</i> sp.	Italia	KC297010	KC297102	KC296963	<i>C. grevilleae</i>
CPC 28153*	<i>Citrus hystrix</i>	Italia	KY856274	KY856532	KY856103	<i>C. hystricis</i>
CPC 28154	<i>Citrus hystrix</i>	Italia	KY856275	KY856533	KY856104	<i>C. hystricis</i>
ICMP 12942	<i>Diospyros kaki</i>	Japón	GQ329685	JX010375	JX009603	<i>C. horii</i>
ICMP 10492*	<i>Diospyros kaki</i>	Nueva Zelanda	GQ329681	JX010450	JX009604	<i>C. horii</i>
CBS 116870*	<i>Musa</i> sp.	EEUU	JX010050	HQ596280	JX009742	<i>C. musae</i>
CMM 4421	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KX094194	KX094297	KX094030	<i>C. musae</i>
ICMP 18187	<i>Nuphar lutea</i> subsp. <i>polysepala</i>	EEUU	JX009936	JX010397	JX009661	<i>C. nupharicola</i>

CBS 472.96	<i>Nymphaea odorata</i>	EEUU	JX010031	JX010399	JX009662	<i>C. nupharicola</i>
GA100	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620242	KX620341	KX620206	<i>C. perseae</i>
GA177	<i>Persea americana</i>	Israel	KX620245	KX620344	KX620209	<i>C. perseae</i>
CBS134301	<i>Protea</i> sp.	Sudáfrica	KC842379	KC842387	KC842375	<i>C. proteae</i>
CBS132882	<i>Protea</i> sp.	Sudáfrica	KC297009	KC297101	KC296960	<i>C. proteae</i>
ICMP 18705	<i>Coffea</i> sp.	Fiji	JX010036	JX010412	JX009694	<i>C. queenslandicum</i>
ICMP 1778*	<i>Carica papaya</i>	Australia	JX009934	JX010414	JX009691	<i>C. queenslandicum</i>
ICMP 19051*	<i>Salsola tragus</i>	Hungría	JX009916	JX010403	JX009696	<i>C. salsolae</i>
NK24	<i>Mangifera indica</i>	India	JQ894632	KX513896	KC790791	<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. communis</i>)
CBS 125378	<i>Hymenocallis americana</i>	China	JX010019	JX010410	JX009709	<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. hymenocallidis</i>)
CBS 130420	<i>Jasminum sambac</i>	Vietnam	JX009974	JX010415	JX009713	<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. jasmini-sambac</i>)
CBS 133251	<i>Vaccinium macrocarpon</i>	EEUU	KP703275	JX145195	KX094036	<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. melanocaulon</i>)
CMM 4083	<i>Mangifera indica</i>	Brasil	KC517194	KC517254	KC517209	<i>C. siamense</i> (syn. <i>C. dianesei</i>)
LF139	<i>Camellia</i> sp.	China	KJ954788	KJ955236	KJ954640	<i>C. siamense</i>
PCG2	<i>Pyrus</i>	China	MK141757	MK141763	MK141755	<i>C. siamense</i>
YMTJ111	<i>Zea mays</i>	China	MK569073	MK569214	MK569167	<i>C. siamense</i>
YMTJ117	<i>Zea mays</i>	China	MK569075	MK569215	MK569169	<i>C. siamense</i>
ZH01	<i>Malus domestica</i>	China	KX885147	KX885138	KX885165	<i>C. siamense</i>
ICMP 18578*	<i>Coffea arabica</i>	Tailandia	JX009924	JX010404	FJ917505	<i>C. siamense</i>
CMM4248	<i>Musa</i> sp.	Brasil	MK240044	KX094300	KX094037	<i>C. siamense</i>
OD12-1	<i>Prunus persica</i>	EEUU	KJ769240	KM245089	KJ769234	<i>C. siamense</i>
EY12-1	<i>Prunus persica</i>	EEUU	KJ769246	KM245086	KJ769236	<i>C. siamense</i>
CBS 124945*	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010006	JX010447	JX009591	<i>C. theobromicola</i>
ICMP17957	<i>Stylosanthes viscosa</i>	Australia	JX009962	JX010380	JX009597	<i>C. theobromicola</i>
CBS 124949*	<i>Theobroma cacao</i>	Panamá	JX010007	GU994454	JX009719	<i>C. tropicale</i>
CMM 4243	<i>Musa</i> sp.	Brasil	KU213601	KU213604	KU213599	<i>C. tropicale</i>
BRIP 45094*	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Australia	JX009927	JX010448	JX009653	<i>C. xanthorrhoeae</i>

(*) Aislados type

-Inoculación de hojas

Hojas completamente expandidas y aparentemente sanas de ramas jóvenes de los cultivares ‘Caricia’, ‘Eva’ y ‘Princesa’, se desinfectaron superficialmente con etanol (70% v/v) durante 3 minutos y solución de hipoclorito de sodio (1% v/v) durante 1 minuto. Inmediatamente, las hojas se enjuagaron tres veces en ADE durante 2 min y se secaron en papel absorbente estéril. Posteriormente, se colocaron individualmente en cajas de Petri con sus pecíolos envueltos en algodón saturado con ADE. Por cada aislado se asperjaron 8 hojas hasta el punto de goteo con una suspensión de 1×10^5 conidios mL⁻¹. La misma cantidad de hojas se asperjaron con ADE y se utilizaron como control.

Los frutos y las hojas inoculadas se mantuvieron en cámaras húmedas a 25°C con un fotoperíodo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad. Las cámaras fueron monitoreadas diariamente registrando los primeros síntomas y su evolución hasta los 5 y 10 días post inoculación (dpi) de hojas y frutos, respectivamente. Los aislados se consideraron patógenos cuando la lesión avanzó más allá de los 5 mm de diámetro (Velho *et al.*, 2015). Las pruebas de patogenicidad se repitieron dos veces.

2.2.5. Caracterización de susceptibilidad de los cultivares

Frutos de los cultivares ‘Caricia’, ‘Princesa’ y ‘Eva’ con tamaño comercial y color verde predominante, se inocularon con seis aislados de frutos seleccionados, obtenidos de los tres cultivares de manzana y de diferente origen. Los frutos fueron desinfectados superficialmente e inoculados por aspersión con el aislado correspondiente siguiendo la metodología detallada en el apartado 2.2.4. Por cada cultivar y aislado se inocularon 8 frutos, que se mantuvieron en cámara húmeda a 25°C con fotoperíodo natural y se evaluó la severidad de la enfermedad a los 12 dpi utilizando la escala detallada por Oo *et al.* (2017). La misma consta de 4 grados para la asignación de gravedad de la siguiente manera: (-) = sin infección y sin síntomas, muy resistente; (+) = 1–5% de la superficie de la fruta presenta síntomas, moderadamente resistente; (++) \geq 5–25% de la superficie de la fruta presenta síntomas, moderadamente susceptible; (+++) \geq 25% de la superficie de la fruta presenta síntomas, altamente susceptible. El experimento se repitió dos veces con similares resultados.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Síntomas a campo y aislados obtenidos

Se obtuvieron 28 aislados de frutas y 6 de hojas que presentaron síntomas de PA y MF respectivamente, en diferentes árboles de manzanos del centro de Santa Fe (Tabla 2.4). La

mayoría de los aislados de fruta fueron obtenidos a partir de la sintomatología típica de PA, caracterizada por la presencia de una podredumbre húmeda hundida, que avanza en forma de “V” hacia el corazón de la fruta y en condiciones de alta humedad desarrolla anillos concéntricos de acérvulas del tamaño de una cabeza de alfiler, donde se forma una masa mucilaginosa color salmón-naranja compuesta de conidios (Figura 2.2A y B). En cambio, 2 aislados (E28 y E29) fueron obtenidos de frutos que presentaban síntomas atípicos, que comenzaban con múltiples sitios de infección (Figura 2.2C), caracterizados por pequeños puntos circulares (1-2 mm) color marrón oscuro, que con el correr de los días coalescían generando una podredumbre generalizada (Figura 2.2D), pero con la característica forma aplanada de las lesiones de PA. Los 6 aislados de hoja fueron obtenidos de lesiones necróticas amarronadas de 1 a 3 mm de diámetro (Figura 2.2E) que evolucionaban formando manchas irregulares como parches de 7-10 mm de diámetro (Figura 2.2F). Bajo condiciones de alta humedad a campo o luego de incubación en cámara húmeda, sobre las lesiones se podía observar acérvulas irrumpiendo a través de la cutícula y liberando masas mucilaginosas de conidios color salmón (Figura 2.2G). Sin embargo, la clorosis y la defoliación típicamente descriptas para MFG no se observaron en el campo.

2.3.2. Caracterización morfológica

Las colonias de todos los aislados presentaron bordes regulares, fueron inicialmente blancas en la superficie y crema en el envés. Luego de 7 días de crecimiento a 25°C, las colonias presentaron micelio sub-aéreo color gris (Figura 2.3A). La incubación de los aislados a temperaturas más altas (35°C) redujo notablemente el crecimiento de las colonias, pero no lo impidió, tornándose las mismas color gris oscuro en la parte superior y naranja con secciones marrón oscuro en la parte inferior (Figura 2.3B). El patrón de crecimiento de las colonias fue circular, con masas mucilaginosas de acérvulas color salmón a negro, distribuidas en forma concéntrica sobre las colonias (Figura 2.3C y D). Se visualizaron estructuras redondeadas, estromáticas compactas, conformadas por una asociación de hifas, distribuidas en forma irregular en las placas y visibles por encima del micelio o en el revés de las colonias, creciendo inmersas en el medio de cultivo. Estas eran de color negro, en ocasiones contenían conidios y en otras se encontraban vacías. Las colonias de los aislados E24, E13, E17 y E4 mostraron ocasionalmente sectores de crecimiento en forma de “V”.

Todos los aislados presentaron hifas hialinas, multinucleadas, septadas y ramificadas.

Tabla 2.4. Detalle de los aislados obtenidos de frutas y hojas de manzanos en la región central de Santa Fe

Fuente/Origen		
Aislado	Órgano/Cultivar	Lugar
E1	Fruta/Caricia	Esperanza
E2	Fruta/Caricia	Esperanza
E3	Fruta/Eva	Esperanza
E4	Fruta/Eva	Esperanza
E5	Fruta/Eva	San Jerónimo
E6	Fruta/Eva	San Jerónimo
E7	Fruta/Caricia	San Jerónimo
E8	Fruta/Princesa	Cululú
E9	Fruta/Caricia	Cululú
E10	Fruta/Caricia	San Jerónimo
E12	Fruta/Princesa	Esperanza
E13	Fruta/Princesa	Esperanza
E14	Fruta/Caricia	Esperanza
E16	Fruta/Princesa	San Jerónimo
E17	Fruta/Princesa	San Jerónimo
E20	Fruta/Caricia	Cululú
E21	Fruta/Eva	Cululú
E22	Fruta/Eva	Cululú
E24	Fruta/Eva	Cululú
E25	Fruta/Princesa	San Jerónimo
E26	Fruta/Princesa	San Jerónimo
E27	Fruta/Princesa	San Jerónimo
E28	Fruta/Caricia	Cululú
E29	Fruta/Caricia	Cululú
A2	Fruta/Caricia	Arroyo
A3	Fruta/Caricia	Arroyo
A4	Fruta/Princesa	Arroyo
A5	Fruta/Princesa	Arroyo
H1	Hoja/Eva	Esperanza
H3	Hoja/Princesa	Esperanza
H8	Hoja/Caricia	Cululú
H11	Hoja/Eva	San Jerónimo
H12	Hoja/Princesa	San Jerónimo
H14	Hoja/Princesa	Cululú

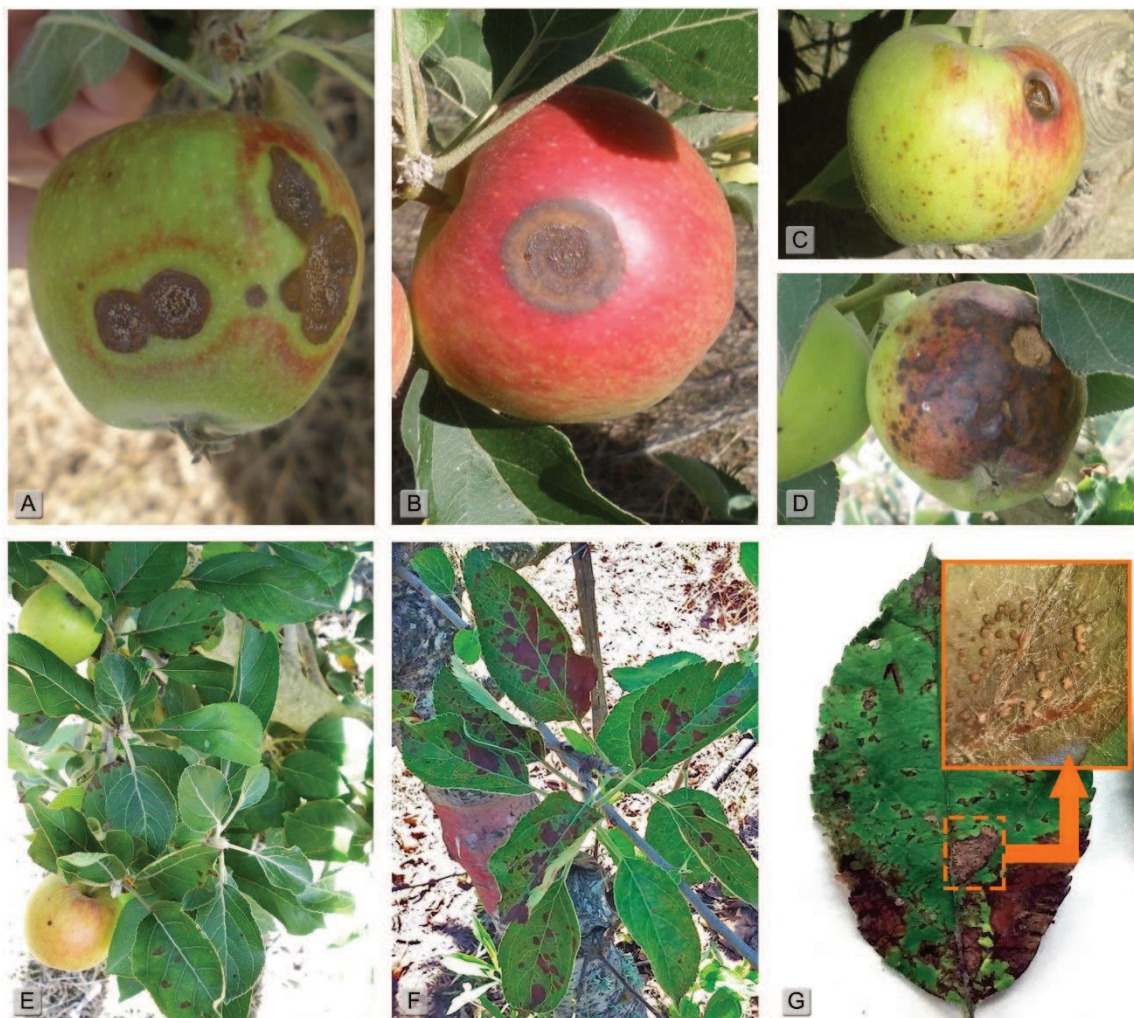


Figura 2.2. Síntomas representativos de PA en frutos y MF necróticas encontradas a campo en cultivares de manzanos con bajos requerimientos de frío. Síntomas típicos de PA en fruto joven (A) y maduro (B) que muestran el signo de la enfermedad. Síntomas atípicos caracterizados por múltiples lesiones pequeñas en las manzanas (C) que luego progresan a podredumbre generalizada (D). Síntomas iniciales de pequeñas lesiones necróticas marrones (1-3mm) en hojas (E) que con el tiempo progresaron a parches irregulares (F). Luego de incubación en cámara húmeda sobre las lesiones se podían observar acérvulas irrumpiendo a través de la cutícula, las cuales se muestran magnificadas en el recuadro superior (G).

A medida que las colonias envejecían las hifas se tornaban color ámbar. Los conidios fueron unicelulares, hialinos, cilíndricos, ocasionalmente fusiformes, sostenidos por conidióforos cortos formando acérvulas (Figura 2.3E, F y G). En los conidios se observó el desarrollo de un septo o tabique, previo a la emisión del tubo germinativo. Los conidios presentaban de 1 a 3 tubos germinativos que fueron hialinos y en ocasiones hubo presencia de conidios secundarios asociados a los conidios originales. Cuando los aislados crecieron a 35°C, los conidios cambiaron su aspecto, tornándose más alargados y estrechos que los conidios crecidos a 25°C. En los conidios, desde los tubos germinativos terminales o laterales, emergían apresorios ovales

e irregulares, de color marrón a marrón oscuro (Figura 2.3H). Sobre los órganos del hospedante (hojas y frutos) fue posible observar setas color marrón oscuro a negro, con terminación acuminada y hasta tres septos (Figura 2.3I y J). En placas de Petri, estas setas se formaban ocasionalmente en las acérvulas oscuras que crecían inmersas en el medio de cultivo, luego de aproximadamente 10 días de incubación. No se visualizó desarrollo de estructuras de origen sexual o teleomorfo.

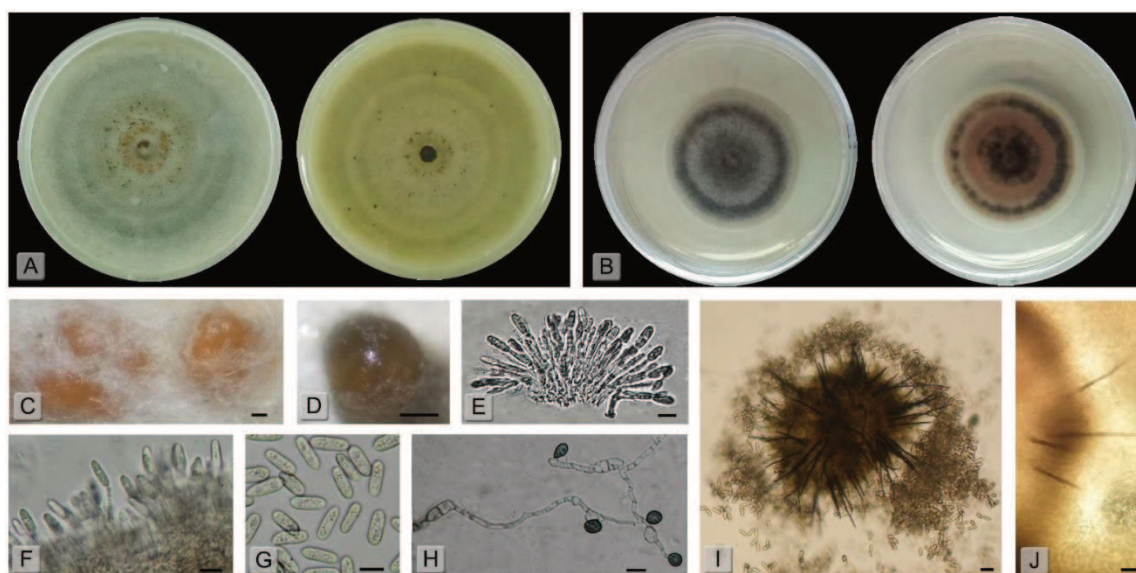


Figura 2.3. Características de aislados monospóricos pertenecientes al complejo de especies *Colletotrichum gloeosporioides* cultivados en medio APD durante 7 días. Colonias del aislado representativo E20 en vista frontal y posterior respectivamente, cultivadas a 25°C (A) y a 35°C (B). Conidiomas (C-D). Acérvulas mostrando conidióforos y conidios (E-F). Conidios (G). Conidios germinados con apresorios (H). Setas (I-J). Barras de escala: C, D = 100 μm ; E, F, G, H = 10 μm ; I, J = 20 μm .

Se evaluó la morfología de los conidios de los 34 aislados. El valor promedio del largo de los conidios fue de 13,94 μm , con un valor mínimo de 12,27 y un valor máximo de 15,62 μm ; mientras que el valor promedio para el ancho fue de 4,69 μm con un ancho mínimo de 3,85 y un ancho máximo de 5,1 μm (Tabla 2.5). La evaluación del crecimiento a distintas temperaturas mostró que, para todos los aislados, la máxima tasa de crecimiento micelial ocurre a los 25°C (Tabla 2.6). A esta temperatura, no se registraron diferencias significativas entre los aislados. El rango en la tasa de crecimiento a 25°C fue de 6,69 a 8,31 mm d^{-1} . A 20°C y 30°C el crecimiento micelial se redujo con un rango de 4,5 a 7,06 mm d^{-1} y 4,25 a 7,13 mm d^{-1} , respectivamente y se encontraron diferencias significativas entre aislados a estas temperaturas. Finalmente, la incubación de los aislados a temperaturas más altas (35°C) redujo notablemente el crecimiento de las colonias variando de 2,44 a 4,56 mm d^{-1} , no encontrándose diferencias significativas entre aislados (Tabla 2.6).

En base a las características morfológicas encontradas, no fue posible diferenciar grupos o especies diferentes dentro de los aislados, y en correspondencia con descripciones previas (Prihastuti *et al.*, 2009; Weir *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2013), los 34 aislados de *Colletotrichum* fueron identificados como miembros del complejo de especies *C. gloeosporioides*.

Tabla 2.5. Tamaño y forma de conidios de aislados de *Colletotrichum*

Aislado	Tamaño de conidios (rango/media y desvío estándar)		Forma (%)	
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Falciforme	Cilíndrico
E1	12,69-17,33/ 14,59 ±1,12	4,01-5,55/ 4,69 ±0,36	8,57	91,43
E2	11,10-16,44/ 13,32 ±1,13	3,40-5,32/ 4,27 ±0,35	5,00	95,00
E3	11,83-17,45/ 14,02 ±1,27	3,81-5,16/ 4,34 ±0,34	14,80	85,20
E4	10,29-17,53/ 14,57 ±1,66	3,69-5,83/ 4,89 ±0,47	18,75	81,25
E5	13,60-18,68/ 15,55 ±0,99	4,2-5,81/ 5,10 ±0,35	7,35	92,65
E6	12,29-17,07/ 14,46 ±0,93	3,77-5,81/ 4,99 ±0,49	13,85	86,15
E7	11,39-16,08/ 13,63 ±1,15	3,93-5,23/ 4,58 ±0,33	7,89	92,11
E8	13,42-17,61/ 15,62 ±1,08	4,3-5,55/ 4,78 ±0,26	7,00	93,00
E9	12,85-17,85/ 15,3 ±1,16	4,24-5,23/ 4,78 ±0,22	4,90	95,10
E10	12,28-17,37/ 14,87 ±1,12	3,89-5,49/ 4,75 ±0,34	9,90	90,10
E12	10,53-16,21/ 13,72 ±1,12	3,25-5,59/ 4,71 ±0,48	2,27	97,73
E13	10,33-14,74/ 12,27 ±1,08	4,12-5,92/ 5,05 ±0,41	0,00	100,00
E14	11,72-17,77/ 14,73 ±1,13	3,68-5,21/ 4,56 ±0,37	2,70	97,30
E16	12,11-15,98/ 13,96 ±0,88	4,28-5,74/ 4,95 ±0,35	6,35	93,65
E17	12,46-17,28/ 14,63 ±1,14	3,93-5,21/ 4,58 ±0,32	5,92	94,08
E20	11,47-16,36/ 13,75 ±1,06	3,23-5,56/ 4,89 ±0,39	5,22	94,78
E21	12,54-17,58/ 14,32 ±0,92	4,19-5,91/ 4,83 ±0,35	4,55	95,45
E22	11,97-21,99/ 14,65 ±1,88	4,10-6,70/ 4,95 ±0,41	2,86	97,14
E24	10,69-15,40/ 13,11 ±1,12	3,61-5,35/ 4,41 ±0,47	1,94	98,06
E25	11,68-16,74/ 14,02 ±1,11	4,33-5,67/ 5,10 ±0,32	6,82	93,18
E26	12,29-17,11/ 14,52 ±1,13	3,97-5,61/ 4,92 ±0,32	3,28	96,72
E27	13,16-17,03/ 14,89 ±0,92	4,35-5,70/ 5,02 ±0,36	7,56	92,44
E28	10,81-17,82/ 13,78 ±1,44	4,14-5,56/ 4,68 ±0,32	2,52	97,48
E29	12,48-23,19/ 14,56 ±1,73	3,79-5,61/ 4,78 ±0,36	1,41	98,59
A2	11,72-15,17/ 13,26 ±0,84	3,93-5,79/ 4,79 ±0,36	2,27	97,73
A3	9,84-14,85/ 12,75 ±0,98	3,37-4,32/ 3,85 ±0,23	2,33	97,67
A4	11,75-20,47/ 14,47 ±1,75	3,79-5,33/ 4,59 ±0,38	4,12	95,88
A5	12,07-16,36/ 14,33 ±0,85	3,83-4,86/ 4,33 ±0,23	2,21	97,79
H1	11,01-15,13/ 13,00 ±0,98	3,61-6,66/ 4,68 ±0,51	13,04	86,96
H3	10,99-15,97/ 13,24 ±1,19	3,69-5,83/ 4,55 ±0,52	10,81	89,19
H8	10,94-17,23/ 13,39 ±1,15	3,73-5,57/ 4,62 ±0,42	16,67	83,33
H11	11,34-17,12/ 13,04 ±1,09	3,32-5,44/ 4,42 ±0,50	16,22	83,78
H12	11,73-17,42/ 14,20 ±1,32	3,90-5,77/ 4,73 ±0,45	10,00	90,00
H14	10,25-16,37/ 12,68 ±1,37	3,51-5,56/ 4,38 ±0,44	4,00	96,00

Tabla 2.6. Tasa de crecimiento radial de aislados de *Colletotrichum* a diferentes temperaturas

Aislado	Media (mm.d ⁻¹) ± Desvío estándar			
	20°	25°	30°	35°
E1	6,06±0,5 ab	6,97±0,78 a	6,25±1,39 ab	3,3±1,36 a
E2	6±0,93 ab	6,88±0,92 a	6,13±0,58 ab	3,08±1,13 a
E3	6,25±0,71 ab	6,97±0,54 a	6,31±1,07 ab	2,44±0,9 a
E4	6,38±1,41 ab	7,41±0,78 a	6,13±0,88 ab	3,01±1,24 a
E5	6,81±1,33 b	8,13±1,09 a	6,25±0,89 ab	3,33±1,1 a
E6	6,88±1,25 b	8,13±1,13 a	6,13±1,27 ab	4,24±1,36 a
E7	6,88±1,25 b	8,31±1,03 a	6,81±0,84 b	3,64±1,01 a
E8	6,56±0,98 ab	8,25±0,85 a	6,75±1,00 b	2,69±0,92 a
E9	6,75±0,53 b	7,94±1,08 a	6,69±1,03 ab	2,44±0,62 a
E10	7±1,04 b	8,06±1,15 a	6±2,15 ab	3,52±1,57 a
E12	6,25±1,04 ab	6,75±1,31 a	6,31±1,22 ab	3,25±1,55 a
E13	5,69±1,44 ab	7,06±0,5 a	5,56±1,18 ab	2,79±1,55 a
E14	5,63±1,22 ab	7,13±0,95 a	6,63±1,19 ab	3,13±1,4 a
E16	5,5±0,46 ab	6,69±0,84 a	5,94±1,66 ab	3,11±1,43 a
E17	6,88±1,36 b	7,69±0,75 a	7,13±1,27 b	4,56±1,96 a
E20	6,19±1 ab	7,16±0,79 a	6,41±1,13 ab	4±2,07 a
E21	6,13±0,83 ab	7,22±0,88 a	5,06±1,02 ab	2,76±1,6 a
E22	6,56±1,18 ab	7,63±0,58 a	6,94±0,94 b	3,48±1,29 a
E24	5,81±0,92 ab	6,88±0,64 a	4,81±1,79 ab	3,56±1,78 a
E25	6,25±0,89 ab	6,81±0,92 a	5,31±0,96 ab	3,7±1,49 a
E26	6±1,07 ab	6,75±0,71 a	5,81±0,65 ab	3,96±1,5 a
E27	6,44±1,18 ab	7,13±0,88 a	5,31±0,7 ab	4,1±2,23 a
E28	4,5±1,71 a	7,88±0,88 a	6,81±1,87 b	3,9±1,63 a
E29	6,75±1,04 b	7,5±0,96 a	4,25±1,77 a	3,61±1,5 a
A2	4,94±1,15 ab	6,91±0,76 a	5,94±0,86 ab	3,54±1,6 a
A3	7,06±1,52 b	7,13±0,58 a	5,94±0,78 ab	3,52±1,74 a
A4	6,38±2,33 ab	7,41±0,82 a	5,88±1,64 ab	3,19±1,61 a
A5	5,69±0,88 ab	7,19±0,92 a	5±2,51 ab	3,52±1,63 a
H1	6,19±0,92 ab	7,75±0,71 a	6,75±1,36 b	2,88±0,58 a
H3	6,56±0,5 ab	7,63±1,06 a	5,13±1,25 ab	3,13±1,19 a
H8	6,38±0,92 ab	7,63±0,74 a	5,94±0,68 ab	2,94±0,62 a
H11	7±0,89 b	8,13±0,83 a	5,81±0,84 ab	2,5±0,76 a
H12	5,88±0,99 ab	8±0,93 a	5,88±1,27 ab	2,81±0,65 a
H14	6,88±1,13 b	8±1,51 a	5,81±1,31 ab	3,13±0,64 a

Letras diferentes dentro de la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes (Pruebas de Tukey; P <0.05)

2.3.3. Análisis filogenético

Las regiones de los genes gapdh, tub2 y cal de todos los aislados se amplificaron y secuenciaron con éxito. Las mismas fueron depositadas en GenBank con los números de acceso que se

detallan en la Tabla 2.7. Los productos de PCR obtenidos fueron de aproximadamente 220, 690 y 710 pares de bases (pb) para *gapdh*, *tub2* y *cal*, respectivamente.

Tabla 2.7. Números de acceso para aislados de *Colletotrichum siamense* identificados utilizando las secuencias *gapdh*, *tub2* y *cal*

Aislado	GenBank - Número de acceso		
	<i>gapdh</i>	<i>tub2</i>	<i>cal</i>
E1	OL688850	OL688819	MT261719
E2	OL688851	OL688820	MT261720
E3	KY656675	KY656678	MF476801
E4	OL688852	OL688821	MT261721
E5	OL688853	OL688822	MT261722
E6	OL688854	OL688823	MT261723
E7	OL688855	OL688824	MT261724
E8	KY656676	KY656679	MF476802
E9	KY656677	KY656680	MF476803
E10	OL688856	OL688825	MT261725
E12	OL688857	OL688826	MT261726
E13	OL688858	OL688827	MT261727
E14	OL688859	OL688828	MT261728
E16	OL688860	OL688829	MT261729
E17	OL688861	OL688830	MT261730
E20	OL688862	OL688831	MT261731
E21	OL688863	OL688832	MT261732
E22	OL688864	OL688833	MT261733
E24	OL688865	OL688834	MT261734
E25	OL688866	OL688835	MT261735
E26	OL688867	OL688836	MT261736
E27	OL688868	OL688837	MT261737
E28	OL688869	OL688838	MT261738
E29	OL688870	OL688839	MT261739
A2	OL688846	OL688815	MT261715
A3	OL688847	OL688816	MT261716
A4	OL688848	OL688817	MT261717
A5	OL688849	OL688818	MT261718
H1	OL688871	OL688840	MT261740
H3	OL688872	OL688841	MT261741
H8	OL688873	OL688842	MT261742
H11	OL688874	OL688843	MT261743
H12	OL688875	OL688844	MT261744
H14	OL688876	OL688845	MT261745

Los conjuntos de secuencias no mostraron conflictos en la topología de árbol, lo que indica que los tres grupos de datos pueden combinarse. El total de registros multilocus de *Colletotrichum* contenía 87 taxones (34 de este estudio) y 1230 caracteres, incluidos *gaps* (*gapdh*: 203, *tub2*: 394 y *cal*: 633), de los cuales 258 eran parsimoniamente informativos. Los análisis filogenéticos moleculares basados en la alineación concatenada de las tres regiones genómicas agruparon los 34 aislados de este estudio con *Colletotrichum siamense* (Figura 2.4). Los diferentes subclados que se encuentran dentro de los aislados del clado principal de *C. siamense* se explican principalmente por las diferencias encontradas en la región del gen *gapdh*.

2.3.4. Pruebas de patogenicidad directas y cruzadas sobre frutas y hojas

Todos los aislados de *C. siamense* obtenidos de frutos de manzana, incluidos los dos aislados obtenidos de frutos que mostraban síntomas atípicos (E28 y E29), produjeron síntomas típicos de PA en frutos inoculados y MF necróticas en hojas inoculadas. De manera similar, los seis aislados de *C. siamense* obtenidos de lesiones en hojas fueron capaces de causar manchas necróticas en hojas inoculadas, similares a las observadas en campo y síntomas típicos de PA en frutos inoculados. Es importante notar que todos los frutos y hojas inoculadas presentaron síntomas, alcanzándose un 100% de incidencia. En frutas, los primeros síntomas de infección aparecieron 2 a 3 dpi en las zonas heridas como lesiones puntiformes, marrones, que aumentaron de tamaño rápidamente, alcanzando 20 a 40 mm a los 10 dpi, volviéndose necróticas y hundidas. Sobre la lesión se formaron anillos concéntricos de acérvulas con masas conidiales anaranjadas (Figura 2.5A). En frutos sin heridas, la inoculación por aspersión produjo múltiples sitios de infección visibles a los 7 dpi, caracterizados por lesiones marrón oscuro de 1-2 mm. Estas lesiones aumentaron a 5-8 mm a los 10 dpi (Figura 2.5B) y causaron una podredumbre generalizada de la fruta a medida que avanzaron los días.

En las hojas, los primeros síntomas aparecieron a los 3 dpi como manchas irregulares necróticas que desarrollaron acérvulas con masas conidiales de color naranja a los 5 dpi (Figura 2.5C). No se observó la clorosis típicamente descrita para la enfermedad de MFG, coincidiendo con lo observado previamente en campo. Las frutas y hojas de los grupos control permanecieron asintomáticas durante el período que duró el experimento.

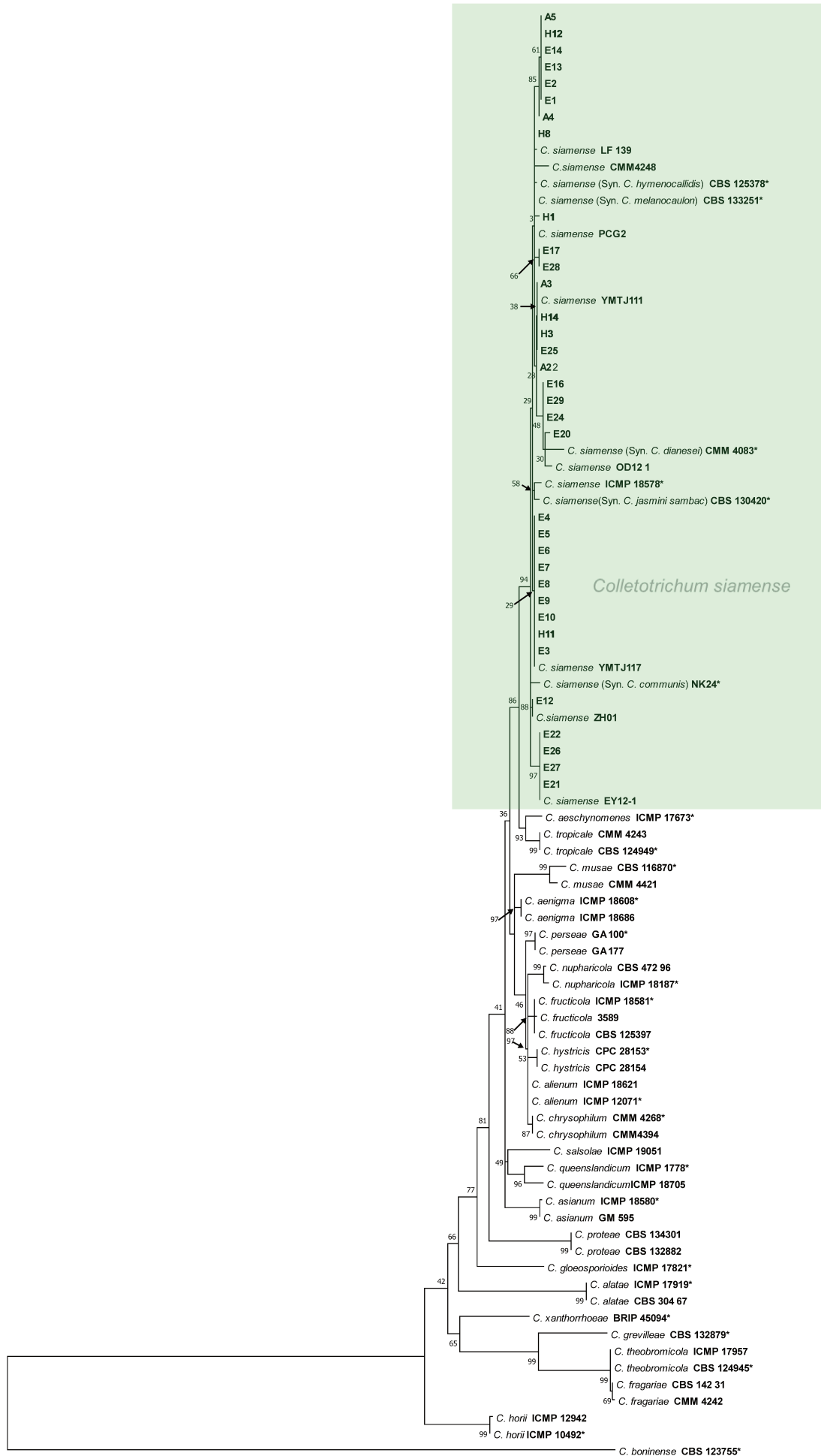


Figura 2.4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud construido con las secuencias concatenadas de las regiones genómicas *gapdh*, *tub2* y *cal* de 34 aislados de *Colletotrichum* obtenidos de síntomas de Podredumbre Amarga (PA) y Manchas Foliares (MF) en manzanos con bajos requerimientos de frío de los cultivares ‘Caricia’, ‘Princesa’ y ‘Eva’ en la región central de Santa Fe y secuencias de especies relacionadas obtenidas de GenBank (Ex-type indicados con *). *Colletotrichum boninense* (CBS123755) se utilizó como outgroup. En cada rama se indica el porcentaje de asociación entre los taxones en base a ML (≥ 50). La barra de escala indica el número promedio de sustituciones por sitio. Bootstrap = 1200.

Para completar los postulados de Koch, el hongo fue re-aislado de los síntomas desarrollados sobre hojas y frutos inoculados. Las características morfológicas de todos los aislados coincidieron con las previamente descriptas para el complejo *Colletotrichum gloeosporioides*. La secuenciación del gen *cal* en los aislados E3, E8 y E9 confirmó que *C. siamense* es la especie responsable de la sintomatología desarrollada.

Cuando se realizaron pruebas de patogenicidad cruzada, inoculando los aislados obtenidos de hojas en frutas (Figura 2.6A y B) y los aislados obtenidos de frutas en hojas (Figura 2.6C) el desarrollo de los síntomas fue similar al obtenido para las pruebas de patogenicidad directa (Figura 2.5A, B y C).

2.3.5. Caracterización de susceptibilidad de los cultivares

Con el objetivo de determinar la susceptibilidad de los cultivares a PA causada por *C. siamense*, seis aislados de frutos obtenidos de los tres cultivares de manzana y de diferente origen, fueron inoculados en frutos de los tres cultivares ensayados. Todos los aislados causaron lesiones de PA en los tres cultivares estudiados ‘Eva’, ‘Princesa’ y ‘Caricia’, visibles a partir de los 5 a 7 dpi. Sin embargo, se evidenciaron diferencias en la susceptibilidad de los cultivares a lo largo del período monitoreado. En base a la escala de severidad propuesta por Oo *et al.* (2017), ‘Princesa’ fue moderadamente resistente a todos los aislados testeados, mientras que ‘Eva’ se comportó de moderadamente resistente a moderadamente susceptible, dependiendo del aislado inoculado. Finalmente, ‘Caricia’ fue altamente susceptible a todos los aislados de *C. siamense* probados. A los 12 dpi, las lesiones en este cultivar fueron sustancialmente más grandes que en los cultivares ‘Eva’ y ‘Princesa’ (Figura 2.7).

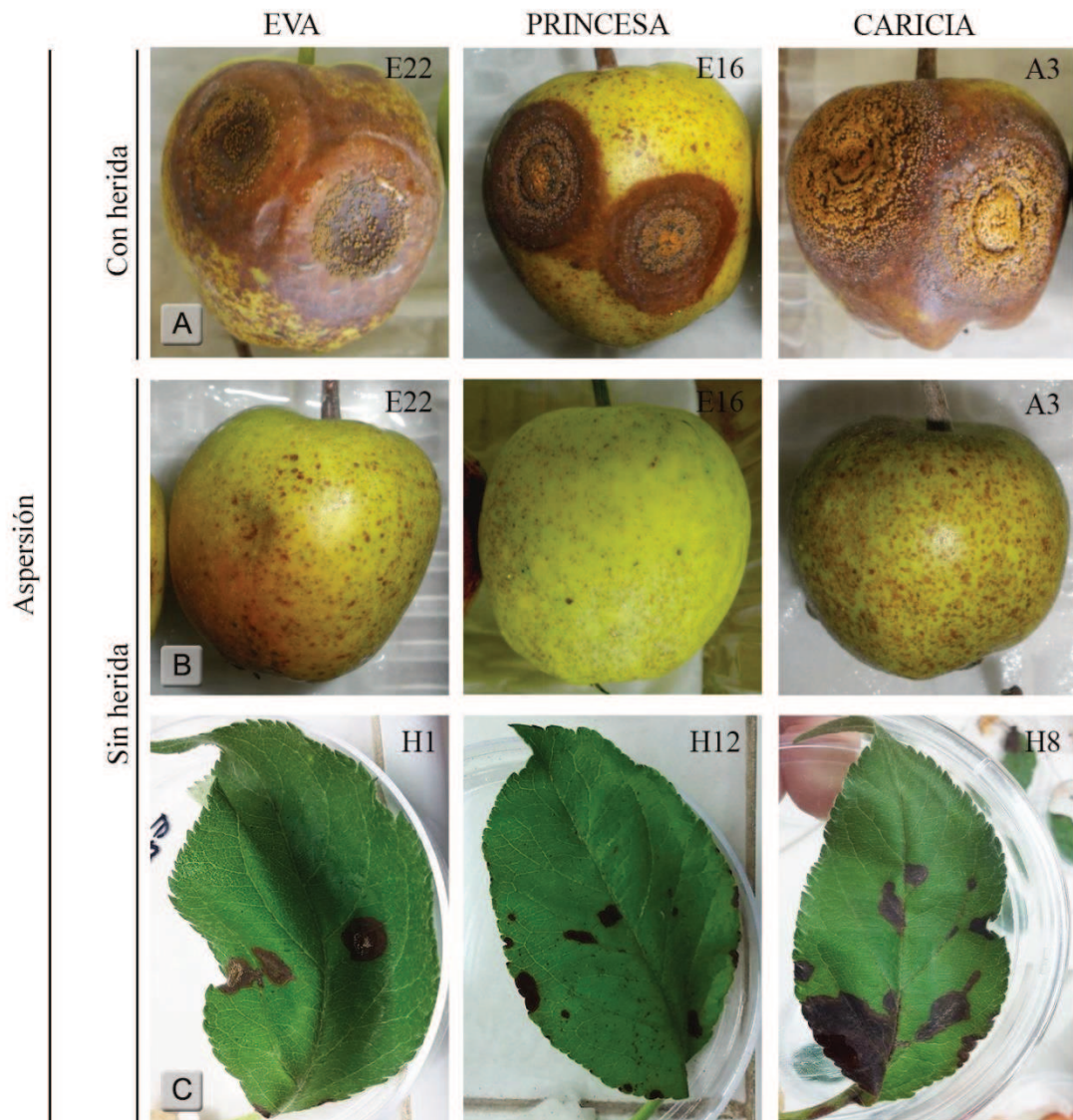


Figura 2.5. Síntomas desarrollados en pruebas de patogenicidad directas en frutos y hojas de manzanos con bajos requerimientos de frío de los cultivares ‘Eva’, ‘Princesa’ y ‘Caricia’ inoculados con aislados de *Colletotrichum siamense*. Se muestra un aislado representativo para cada cultivar y órgano inoculado. (A) Síntomas típicos de Podredumbre Amarga (PA) causados por aislados obtenidos de frutas (E22, E16, A3) en órganos heridos a 10 días post-inoculación (dpi). (B) Múltiples lesiones de color marrón oscuro causadas por aislados de frutas (E22, E16, A3) en órganos sin herir a 10 dpi. (C) Manchas Foliares (MF) causadas por aislados obtenidos de hojas (H1, H12, H8) a los 5 dpi.

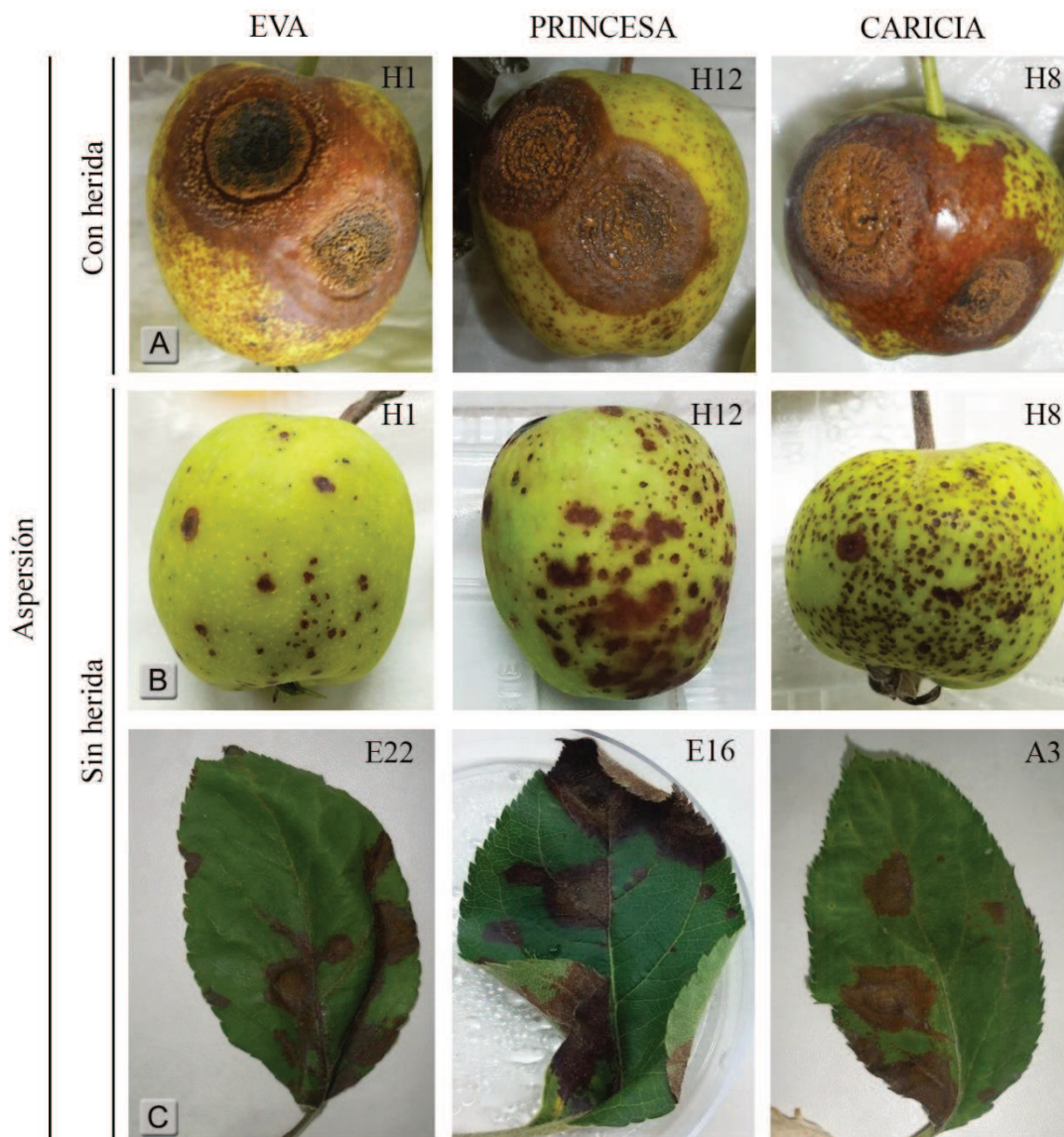


Figura 2.6. Síntomas desarrollados en pruebas de patogenicidad cruzada en frutos y hojas de manzanos con bajos requerimientos de frío de los cultivares ‘Eva’, ‘Princesa’ y ‘Caricia’ inoculados con aislados de *Colletotrichum siamense*. Se muestra un aislado representativo para cada cultivar y órgano inoculado. (A) Síntomas típicos de Podredumbre Amarga (PA) causados por aislados de hojas (H1, H12, H8) en frutos heridos a 10 días post-inoculación (dpi). (B) Múltiples lesiones de color marrón oscuro causados por aislados de hojas (H1, H12, H8) en frutos sin herir a 10 dpi. (C) Manchas Foliarias (MF) causados por aislados obtenidos de frutos (E22, E16, A3) a los 5 dpi.

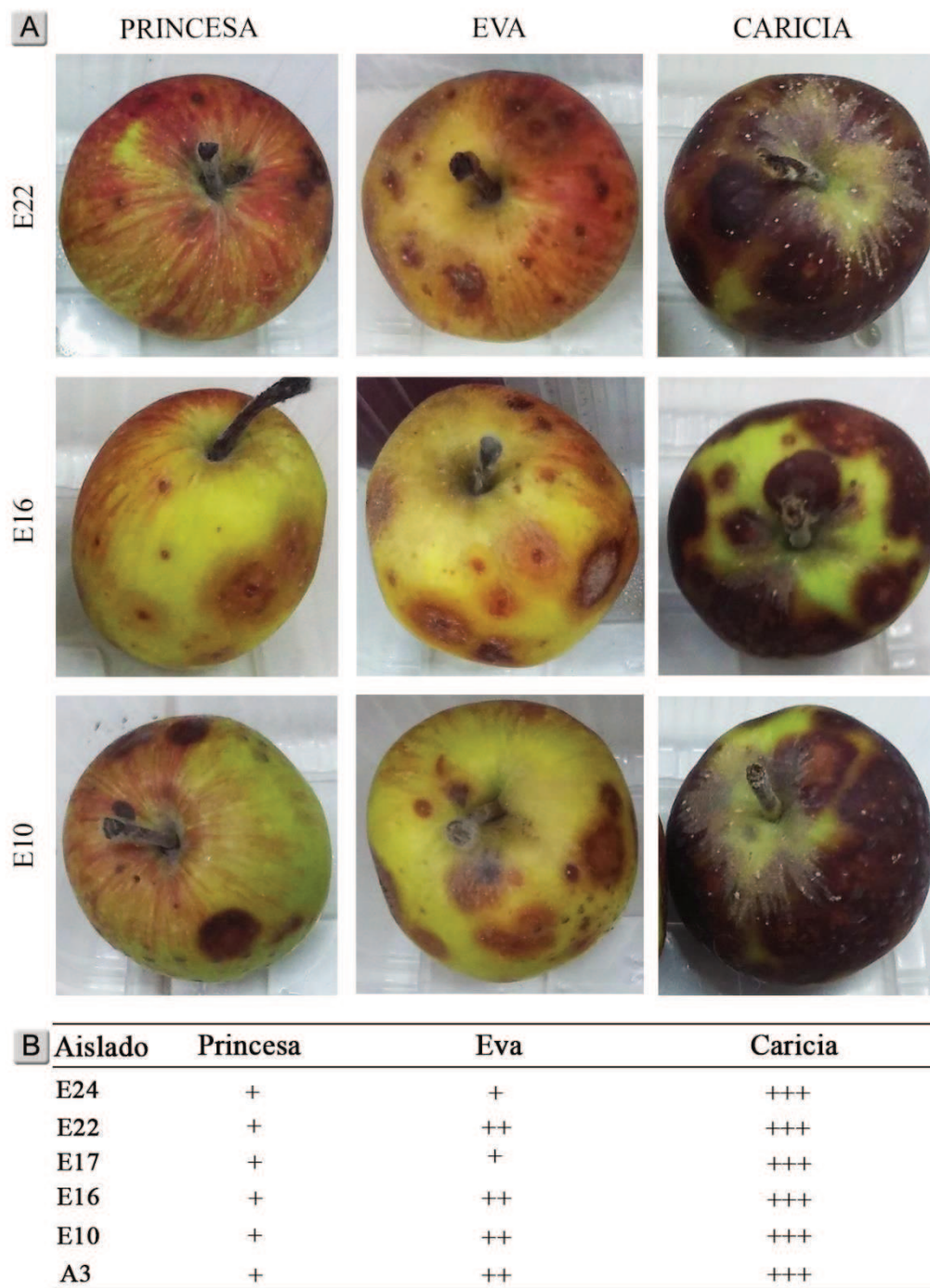


Figura 2.7. Susceptibilidad de los cultivares con bajos requerimientos de frío ‘Eva’, ‘Princesa’ y ‘Caricia’ a la podredumbre amarga (PA) causada por aislados de *Colletotrichum siamense*. (A) Síntomas causados por 3 aislados representativos 12 días post inoculación. (B) Estimación de la severidad de PA según la escala modificada descrita por Oo et al. (2017): (+) = 1–5% de la superficie de la fruta presenta síntomas, moderadamente resistente; (++) \geq 5–25% de la superficie de la fruta presenta síntomas, moderadamente susceptible; (+++) \geq 25% de la superficie de la fruta presenta síntomas, altamente susceptible.

2.4 DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo para determinar las especies del género *Colletotrichum* presentes en manzanos con bajos requerimientos de frío del centro de Santa Fe, asociadas a las sintomatologías de PA y MF, similares al síntoma inicial de MFG reportada en otros países. En investigaciones previas realizadas, la PA de la manzana ha sido asociada a veintitrés especies diferentes de *Colletotrichum*, mientras que la MFG se restringió a trece especies hasta la fecha (Velho *et al.*, 2015; Alaniz *et al.*, 2019; Velho *et al.*, 2019; Dowling *et al.*, 2020; Khodadadi *et al.*, 2020; Astolfi *et al.*, 2022; Carraro *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2022a).

En este trabajo, todos los aislados obtenidos de frutos y hojas compartieron características morfológicas similares, típicas del complejo de especies *C. gloeosporioides* (Weir *et al.*, 2012). La similitud en la morfología de las colonias y conidios de todos los aislados no permitió diferenciar grupos, así como tampoco fue suficiente para identificar las especies involucradas en la PA y MF. Específicamente dentro del complejo *C. gloeosporioides*, Weir *et al.* (2012) afirman que las diferencias de tamaño de conidios entre las especies son leves y los rangos de tamaño se superponen, lo que no permite que estas características sean confiables para definir especies. Por estas razones, aunque dentro del complejo *C. gloeosporioides* existen diferencias morfológicas entre especies, estas no son suficientes para identificarlas, por lo que la forma más confiable de caracterización es la secuenciación molecular (Weir *et al.*, 2012; Phoulivong *et al.*, 2010).

En este estudio, la caracterización morfológica de los 34 aislados en combinación con el análisis filogenético multilocus reveló que, independientemente de los cultivares, los órganos, o el lugar donde se obtuvieron los aislados, *Colletotrichum siamense* es la única especie capaz de causar las dos enfermedades presentes en manzanos con bajos requerimientos de frío en Santa Fe; la PA y las MF, cuya sintomatología se asemeja al síntoma inicial de MFG, no reportada en Argentina hasta el momento.

Colletotrichum siamense fue descrita por primera vez afectando frutos de café en Tailandia (Prihastuti *et al.*, 2009). Desde entonces, ha sido encontrada afectando numerosos hospedantes en varias regiones tropicales y subtropicales del mundo. Talhinhos & Baroncelli (2022) colocan a esta especie en primer lugar dentro de las diez especies de *Colletotrichum* con mayor número de plantas hospedantes. Hoy se reporta la existencia de 103 especies hospedantes de *C. siamense*, incluidos plantas ornamentales y diferentes cultivos intensivos y extensivos como pimiento, cebolla, manzana, pera, durazno, naranja, mango, papaya, guayaba, arándano, jazmín, nuez, palta, entre otros (Weir *et al.*, 2012; Fu *et al.*, 2019; Meng *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022, Talhinhos & Baroncelli, 2022). Específicamente en manzano, *C. siamense* ha sido hallada

causando PA en Estados Unidos, Korea, Japón, Pakistán y China (Weir *et al.*, 2012; Munir *et al.*, 2016; Yokosawa *et al.*, 2017; Oo *et al.*, 2018; Park *et al.*, 2018; Abid *et al.*, 2019; Dowling *et al.*, 2020; Han *et al.*, 2021; Martin *et al.*, 2021a, Carraro *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2022a).

En los últimos años se ha discutido si *Colletotrichum siamense* debe considerarse como una sola especie o como un complejo de especies. En base al análisis del marcador ApMat, Sharma *et al.* (2015) han propuesto que *C. siamense* es un complejo de especies, compuesto por *C. siamense*, *C. communis*, *C. dianesei*, *C. endomangiferae*, *C. hymenocallidis*, *C. jasmini-sambac* y *C. murrayae*. Sin embargo, investigaciones posteriores de Liu *et al.* (2016) refutan esta propuesta en base a resultados basados en el reconocimiento de especies filogenéticas por concordancia genealógica (GCPSR), métodos coalescentes y pruebas de apareamiento que confirman que todas estas especies deben considerarse sinónimos de *C. siamense*. Recientemente, Liu *et al.* (2022) destacaron la falta de disponibilidad de secuencias ApMat para algunos taxones en el complejo de especies de *C. gloeosporioides* y en otros complejos, y recomendaron en su lugar la secuenciación de los loci *gapdh* y *tub2*, entre otros, como códigos de barras de ADN para *C. siamense*. Por otro lado, Jayawardena *et al.* (2021) especificaron que la especie *C. siamense* es identificada con precisión utilizando las secuencias de los loci *cal* y *tub2*. En este trabajo y en concordancia con los diferentes resultados obtenidos por los autores citados, la utilización de los marcadores *cal*, *tub2* y *gapdh* permitió una correcta resolución del árbol filogenético, identificando a todos los aislados estudiados como *C. siamense*.

En Argentina, la re-identificación de enfermedades originalmente atribuidas a *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* ha comenzado recientemente, por lo que se dispone de escasa información sobre la distribución y prevalencia de especies de *Colletotrichum* en diferentes hospedantes y regiones. Los reportes para *C. siamense* en Argentina refieren únicamente a infecciones foliares en *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* (Larran *et al.*, 2015) en Buenos Aires. Sin embargo, debido a la amplia gama de hospedantes de *C. siamense* reportados a nivel mundial, se especula que esta especie se encontraba en la región central de Santa Fe antes de la introducción de los cultivares de manzana con bajos requerimientos de frío. Luego, bajo las condiciones ambientales propicias presentes en la región, el patógeno encontró un nuevo hospedante susceptible para infectar. En este sentido, en trabajos realizados en nuestro laboratorio se ha identificado a esta misma especie causando antracnosis en frutos de pimiento y pecán en la región (Fernandez *et al.*, 2022a).

El hallazgo de *C. siamense* como único agente etiológico responsable de PA y manchas foliares observados en manzanos de la provincia de Santa Fe es valioso porque las estrategias de manejo podrían concentrarse específicamente en esta especie, y no en un conjunto de especies como

ocurre en otras partes del mundo. Dado que la sensibilidad a los fungicidas y la fuente de inóculo pueden variar entre las especies de *Colletotrichum* en el campo, es fundamental que los métodos de manejo se centren en las especies que causan la enfermedad en cada región (Dowling *et al.*, 2020). En manzana, diferentes estudios muestran a *C. siamense* generando lesiones de PA de mayor tamaño y profundidad que otros miembros del complejo *C. gloeosporioides*, como *C. fructicola* y *C. theobromicola* (Munir *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2018). Sin embargo, dentro de este complejo, el crecimiento micelial de *C. siamense* fue el más sensible a los fungicidas probados (Munir *et al.*, 2016). Por otro lado, en estudios más recientes, algunos aislados de *C. siamense* de Estados Unidos mostraron resistencia a los fungicidas inhibidores externos de la quinona y metil bencimidazol carbamatos (Martin *et al.*, 2021b). La sensibilidad de los aislados caracterizados en este estudio a los fungicidas será objeto de estudio del Capítulo 3 de esta Tesis Doctoral.

En lo que respecta a patogenicidad, los ensayos confirmaron que todos los aislados reprodujeron los síntomas de la enfermedad en frutos y hojas de manzana, cumpliendo los postulados de Koch. Los aislados obtenidos de frutos que presentaban un síntoma atípico (E28 y E29) también reprodujeron los síntomas característicos de la PA. Resultados similares fueron informados por Jiang *et al.* (2014), quienes encontraron que aislados obtenidos a partir de una sintomatología de manchas negras en frutos de pera inducían síntomas de PA en inoculaciones artificiales. Estos autores propusieron que los síntomas de manchas negras en frutos jóvenes de pera constituyen una etapa de infección quiescente de *Colletotrichum* spp., lo que resulta en PA en etapas posteriores de crecimiento cuando las condiciones tanto del hospedante como del ambiente favorecen la enfermedad.

Aunque en este estudio se obtuvieron y caracterizaron aislados de *C. siamense* de hojas, no fue posible encontrar todos los síntomas típicos de la enfermedad MFG en el campo bajo las condiciones climáticas locales. Ante esto, resulta necesario destacar algunas diferencias notables con esta enfermedad. Primero, los síntomas de las MF observados en el campo no progresaron hacia la clorosis y la defoliación severa típica de la MFG. Esto podría deberse a que las condiciones ambientales presentes en esta región no favorecen el progreso de la enfermedad en el campo o a que los aislados presentes no son lo suficientemente agresivos para causar la defoliación típica de la MFG. Además, tampoco se encontró el síntoma típico de MFG en la fruta, consistente en pequeñas lesiones corchosas rodeadas por un borde rojizo (Casanova *et al.*, 2017; Alaniz *et al.*, 2019). En cambio, los aislados de *C. siamense* obtenidos de hojas lograron generar síntomas típicos de PA en la fruta mediante inoculaciones artificiales. Teniendo en cuenta estas consideraciones y el hecho de que los inviernos templado-cálidos en

la región causan brotaciones esporádicas y caída de hojas incompleta durante el reposo invernal en los cultivares ‘Caricia’, ‘Eva’ y ‘Princesa’, se hipotetiza que *C. siamense* emplea las hojas como sitio de sobrevivencia. Curiosamente, en un estudio reciente realizado en Brasil se obtuvieron aislados patogénicos de *C. siamense* en hojas del cultivar ‘Eva’ (Moreira *et al.*, 2019a). Sin embargo, en inoculaciones artificiales estos aislados no fueron capaces de inducir síntomas macroscópicos de MFG en hojas de los cultivares ‘Eva’ y ‘Gala’ y solo unas pocas lesiones fueron visibles bajo un microscopio estereoscópico. Estos autores especulan que la presencia de síntomas microscópicos implica que el patógeno infectó al hospedante, pero la respuesta de defensa de la planta interrumpió su progreso. *C. siamense* también fue aislado a partir de hojas asintomáticas en Japón (Yokosawa *et al.*, 2017). En este sentido, aunque *C. siamense* ha sido incluida entre las especies asociadas a MFG (Hoge, 2017; Velho *et al.*, 2019; Carraro *et al.*, 2022), no se ha confirmado la patogenicidad en hojas para esta especie aún (Velho *et al.*, 2019). Por lo tanto, hasta el presente no está claro si *C. siamense* es una de las especies asociadas a la sintomatología típica de la MFG.

La relación que existe entre los agentes causales de PA y MFG no se comprende completamente, pero todo indica que dentro de una misma especie algunas poblaciones de *Colletotrichum* causantes de la PA se diferencian, pierden la capacidad de causar podredumbre en los frutos, pero ganan la capacidad de infectar y reproducirse sobre las hojas de los cultivares ‘Golden Delicious’ y sus descendientes como ‘Gala’. En los lugares donde esto ocurre ambas enfermedades aparecen simultáneamente en los campos de manzanos (Moreira *et al.*, 2021). Diferentes autores hablan de la incapacidad de los aislados de MFG para producir en fruto PA teniendo sólo la capacidad o patogenicidad para producir síntomas caracterizados por pequeñas lesiones corchosas, rodeadas por un borde rojo y la incapacidad de aislados de PA para generar MFG (Casanova *et al.*, 2017; Alaniz *et al.*, 2019; Carraro *et al.*, 2022). Estudios recientes han demostrado que existen grandes diferencias entre los perfiles transcriptómicos de aislados de MFG y PA (Jiang *et al.*, 2022). En comparación con los aislados de PA, los aislados de MFG producen mayor cantidad de metabolitos secundarios, mayor secreción de enzimas extracelulares, una acumulación de melanina superior, e incrementan la expresión de genes asociados a la patogenicidad. Por estos motivos, los autores proponen que los aislados de MFG se originan a partir de aislados de PA a través de mutaciones a cepas más virulentas (Jiang *et al.*, 2022). En base a estos antecedentes, ha sido propuesto que la PA y la MFG son causadas por diferentes poblaciones de *Colletotrichum*.

La mejor estrategia de manejo a largo plazo para PA consiste en la selección y utilización de cultivares resistentes o de menor susceptibilidad (Jurick *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2021a). Se

ha demostrado que el cultivar de manzana tiene un efecto significativo sobre el crecimiento y esporulación de *Colletotrichum* spp. (Munir *et al.*, 2016; Grammen *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2021a). En el estudio de susceptibilidad de este trabajo se demostró que en el cultivar ‘Caricia’ la PA progresa más rápidamente y las lesiones alcanzan un mayor tamaño que en los cultivares ‘Eva’ y ‘Princesa’. Los resultados encontrados en las inoculaciones están en concordancia con observaciones realizadas a campo, en las cuales ‘Caricia’ se comportó como el cultivar más susceptible en regiones con condiciones climáticas similares (Fenoy, 2015). En este sentido, aunque diferentes autores caracterizan a los cultivares ‘Caricia’, ‘Eva’ y ‘Princesa’ como resistentes a MFG (Hauage & Tsuneta, 1999; Furlan *et al.*, 2010; Denardi *et al.*, 2019) no hay información disponible sobre PA.

En conjunto, los estudios realizados demuestran que *C. siamense* es el principal agente causal de PA en manzanos con bajos requerimientos de frío de la región central de Santa Fe, y que este patógeno, además es capaz de infectar las hojas, causando MF pero no clorosis ni defoliación severa, lo cual indica que la MFG no está presente en la región hasta el presente. Durante el progreso de este capítulo fueron cumplidos todos los requisitos necesarios para documentar por primera vez la presencia de *C. siamense* causando podredumbre amarga en manzano en la región central de Santa Fe, Argentina, lo cual resultó en el primer reporte de la enfermedad en esta región en la revista *Plant Disease* (<https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1071-PDN>, Fernandez *et al.*, 2018).

Más recientemente, los resultados de este Capítulo en relación a la caracterización de 31 aislados de *Colletotrichum siamense* como agente causal de PA y MF en manzanos con bajo requerimientos de frío de la región central de Santa Fe, han sido publicados en la revista *International Journal of Pest Management* (Fernandez *et al.*, 2022b, <https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2116659>)

3. Capítulo 2

Epidemiología y patogénesis de las enfermedades causadas por *Colletotrichum siamense* en manzanos con bajos requerimientos de frío de la región central de Santa Fe

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1 Epidemiología de *Colletotrichum* en manzanos

Durante el desarrollo del Capítulo 1 de esta Tesis Doctoral fue posible determinar algunos de los aspectos que conforman el triángulo de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* en la región central de Santa Fe (Figura 3.1). Específicamente, pudo establecerse que *Colletotrichum siamense* es la única especie que genera podredumbre amarga (PA) y manchas foliares (MF) en la región central de Santa Fe, creciendo óptimamente con temperaturas de 25°C. Bajo estas condiciones, el período de incubación para la aparición de los síntomas es de 3 y 7 días en hojas y frutos sin heridas, respectivamente, resultando ‘Caricia’ el cultivar más susceptible. No obstante, numerosos aspectos de la epidemiología y patogénesis de la enfermedad en la región son desconocidos. Entre estos factores pueden mencionarse las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad, los sitios de sobrevivencia y fuentes de inóculo del patógeno, y la estrategia de infección utilizada por *C. siamense*. Durante el desarrollo del presente Capítulo se dilucidarán estos aspectos de la PA y MF causadas por *C. siamense* en la región central de Santa Fe.



Figura 3.1. Triángulo de Podredumbre Amarga (PA) y Manchas Foliares (MF) generadas por *Colletotrichum siamense* en plantaciones de manzanos con bajos requerimientos de frío del centro de la provincia de Santa Fe.

Las epidemias tienen características particulares y específicas quedando su dinámica espacio-temporal condicionada por el ambiente y las características del patosistema (Vásquez-López *et al.*, 2012, Carraro *et al.*, 2022). En el caso de las enfermedades causadas por *Colletotrichum*, el

entendimiento de las condiciones ambientales necesarias para el desarrollo de una epidemia y el conocimiento de las especies presentes en cada región son esenciales para definir estrategias de manejo dado que, aunque los síntomas pueden ser similares para todas las especies, la biología del patógeno puede variar entre especies y complejos de especies (Aćimović *et al.*, 2020). En este sentido, son numerosos los estudios epidemiológicos realizados en enfermedades causadas por *Colletotrichum* en manzano que muestran diferencias notables de acuerdo a las regiones, cultivares de manzano y especies de *Colletotrichum* involucradas (Casanova *et al.*, 2016; Nekoduka *et al.*, 2018; Nita *et al.*, 2019; Moreira *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 2021; Martin *et al.*, 2022), por lo cual resulta esencial realizar estudios locales.

Los estudios epidemiológicos tienen como objetivo comprender los factores que interaccionan para dar lugar al desarrollo de la enfermedad. Estos factores incluyen aspectos del hospedante como estados fenológicos y resistencia a los patógenos, características de la enfermedad tales como, período de incubación e infección; aspectos del patógeno como supervivencia, diseminación y reproducción; y componentes ambientales (Campbell, 1998; Restrepo Leal & Rada Gonzalez, 2017). Si se hace referencia a las condiciones ambientales, la temperatura y la humedad relativa son factores potencialmente importantes que afectan el desarrollo de los complejos de especies de *Colletotrichum* (Morkeliūnė *et al.*, 2021). Los reportes que especifican las condiciones necesarias para una infección efectiva resultan dispares según las especies de *Colletotrichum* y las condiciones del ambiente u hospedante. Para el caso de manzanos, la presencia frecuente de PA y Mancha Foliar por *Glomerella* (MFG) se observa en regiones subtropicales donde la lluvia y el clima cálido favorecen la propagación de conidios y el desarrollo de estas enfermedades (Moreira *et al.*, 2021).

La provincia de Santa Fe se caracteriza por tener un clima templado-cálido, con características que podrían favorecer el desarrollo de enfermedades como la PA y MFG. Las precipitaciones medias anuales son de 800 a 1.200 mm, y se incrementan en primavera, haciéndose máximas en los meses de verano, siendo noviembre el mes que presenta el mayor número de días con lluvias. En verano, las temperaturas promedio son de 27°C (García *et al.*, 2015).

3.1.1.1. Factores ambientales que favorecen el desarrollo de la PA por *Colletotrichum* spp. en manzano

La distribución de especies de *Colletotrichum* y la incidencia de la PA están muy influenciadas por la temperatura y la humedad (Nita *et al.*, 2019). Las temperaturas óptimas de crecimiento de *Colletotrichum* spp. varían entre los 22 y 30°C (Dowling *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 2021); esto determina que sea una enfermedad común de frutos en la mayoría de las zonas productoras

de manzana de clima templado, en las que ocurren lluvias durante el desarrollo y maduración del fruto, provocando pérdidas que pueden superar el 50% (Sutton, 1990; Talamini & Bogo, 2009). Numerosos trabajos han demostrado la distribución geográfica de las especies de *Colletotrichum* que causan PA en respuesta a las temperaturas presentes (Everett *et al.*, 2009; Nekoduka *et al.*, 2018; Martin *et al.*, 2021). Por ejemplo, *C. fioriniae* predomina en las regiones más frías del Atlántico-Medio de Estados Unidos, mientras que diversas especies del complejo gloeosporioides, más adaptadas a temperaturas cálidas, son las predominantes en las regiones más templadas de esta misma zona (Martin *et al.*, 2021). Ensayos a campo y en laboratorio realizados en Nueva Zelanda en manzanas ‘Royal Gala’ determinaron que las infecciones por *C. acutatum* se producen con temperaturas mayores a 15°C, independientemente de la madurez del fruto (Everett *et al.*, 2009). Posteriormente, en sus ensayos, Nekoduka *et al.* (2018) asociaron las infecciones en frutos inmaduros (20 días después de la caída de los pétalos) a días con temperaturas superiores a 20°C; condiciones que favorecen directamente la germinación de conidios y la producción de apresorios de *C. acutatum*.

Estudios precedentes mostraron que la fruta de manzana es susceptible a PA en todas las etapas de desarrollo y que las infecciones están directamente relacionadas con la temperatura (Shane & Sutton, 1981; Noe & Starkey, 1982). Para plantaciones de frutales de pepita en España se indica que, temperaturas entre 19-24°C acompañadas de lluvias resultan condiciones favorables para la liberación de las primeras esporas viables e infección de frutas por *C. gloeosporioides* o *C. acutatum* (Bonaterra, 2000). En Brasil se estableció que la PA es favorecida por períodos lluviosos, con alta humedad relativa y con un óptimo de temperatura entre 22 a 26°C (Talamini & Bogo, 2009). Por otro lado, en Uruguay, Lolas (2005) indica como favorables para esta enfermedad de verano, temperaturas entre 24 y 28°C. Probablemente, por este requerimiento, Jones & Aldwinckle (2002) expresan que, si bien los frutos son susceptibles durante todas las fases de su desarrollo, iniciando las infecciones un mes después del comienzo de la caída de pétalos, lo más usual es encontrar infecciones desde que el fruto alcanza la mitad de su tamaño hasta la cosecha.

3.1.1.2. Factores ambientales que favorecen el desarrollo de MF por *Colletotrichum* spp. en manzano

Como fue mencionado en el capítulo 1, la MFG no está presente hasta el día de hoy en la región central de Santa Fe, lo cual podría deberse a que las condiciones ambientales presentes en esta región no favorecen el progreso de la enfermedad en el campo o a que los aislados presentes no son lo suficientemente agresivos para causar la defoliación típica de la MFG. El hecho de que

a nivel mundial la MFG esté presente sólo en algunas regiones a diferencia de la PA, parecería indicar que requiere condiciones más concretas para su establecimiento. Diferentes estudios epidemiológicos han sido realizados a nivel mundial para poder determinar las condiciones específicas que requieren las especies de *Colletotrichum* para causar MFG.

Crusius *et al.* (2002) combinaron diferentes tiempos de mojado foliar y temperaturas y determinaron que la intensidad de la MFG aumenta de forma directa según se incrementa la temperatura en el rango de 14 a 26-28°C, inhibiendo completamente la infección a 34°C. A esto agregan que, el tiempo de mojado foliar para lograr una infección efectiva varía según la temperatura. Así, entre los 24 y 30°C, solo se requieren de 2 a 4 horas de mojado foliar para la infección. En cambio, se necesitan de 6 a 16 horas cuando las temperaturas están entre 16 y 22°C. En base a estos datos concluyen que, al ser estas temperaturas comunes tanto en la primavera como en el verano del sur de Brasil, la duración del mojado foliar sería el principal factor que limita el desarrollo de la MFG.

Otros autores expresan que para desarrollarse con nivel epidémico en Brasil la MFG necesita de la ocurrencia de tres días consecutivos con 10 horas de mojado foliar (en presencia de lluvia) con temperaturas de 15°C o superiores (Hamada, 2005; Talamini & Bogo, 2009).

En el caso de China, Wang *et al.* (2015)b determinaron mediante estudios en condiciones controladas que la infección por conidios en hojas del cultivar 'Gala' ocurrió en un rango de temperaturas de entre 15 y 35°C. La duración mínima de humedad requerida para la infección se produjo a 27,6°C y fue de 2,7 horas. Estos datos de temperatura coinciden con los reportes de Velho *et al.* (2014) que refiere a las infecciones de MFG con temperaturas entre 23 y 28°C.

Los antecedentes expuestos tanto para PA como para MFG revelan la gran diversidad de especies de *Colletotrichum* y las evidentes diferencias en las condiciones que requieren para ocasionar ambas enfermedades, por lo que resulta ineludible estudiar las condiciones óptimas requeridas por cada especie en interacción con su hospedante a fines de comprender y conocer la situación particular de cada patosistema en la región.

3.1.2. Ciclo de las enfermedades causadas por *Colletotrichum*

La mayoría de los hongos fitopatógenos muestran una variedad de interacciones con sus plantas hospedantes, cambiando su relación en diferentes etapas de su ciclo de vida dependiendo de la madurez fisiológica y la resistencia del hospedante, el medio ambiente y los genes de virulencia asociados al patógeno (De Silva *et al.*, 2017). Así, *Colletotrichum* es capaz de generar dos enfermedades en manzanos de la región central de Santa Fe: PA y MF, siendo su ciclo de vida

desconocido. La importancia de poder definir los ciclos de estas enfermedades radica en lograr determinar fases críticas de la patogénesis en las cuales deberían centrarse las medidas de manejo.

3.1.2.1 Sobrevivencia y Fuentes de inóculo

Diferentes autores consideran que *Colletotrichum* spp. persiste durante el invierno en los frutos momificados de manzanos que permanecen en el árbol, en rajaduras de la corteza, en heridas provocadas por quebraduras de ramas y en yemas asintomáticas (Crusius *et al.*, 2002; Sanhueza *et al.*, 2002; Mondino *et al.*, 2009).

Sutton (1990) y Bonaterra (2000), afirman que *C. gloeosporioides* sobrevive en forma de peritecios y acérvulas sobre manzanas momificadas, frutos caídos y ramas desprendidas de los árboles o bien en forma de micelio en madera y canchales. Nekoduka *et al.* (2018) estudiaron la epidemiología de *C. acutatum* en manzanos de Iwate, Japón y agregan como sitio de sobrevivencia para los conidios a las cicatrices de frutos infectados y los pedúnculos de frutos momificados. De acuerdo a estos autores, como los frutos nacen cerca de las cicatrices producidas el año anterior, es probable que éstas sean la principal fuente de inóculo en el manzano.

En Uruguay, Casanova *et al.* (2016) indicaron que *Colletotrichum* sobrevive en su fase asexual, encontrándose micelio y conidios sobre los árboles de manzanos, principalmente sobre las ramas. Estas estructuras constituirían la fuente de inóculo primario para las infecciones que se iniciarían sobre los frutos.

En estudios realizados en Brasil sobre la dispersión de diferentes especies de *Colletotrichum* (*C. nymphaeae*, *C. fructicola*, *C. paranaense* y *C. limeticola*) causantes de MFG se registró un número mayor de esporas en la parte inferior de las plantas, lo que podría asociarse con la sobrevivencia del inóculo en hojas caídas al suelo (Hamada *et al.*, 2019). Por otra parte, Børve & Stensvand (2017) determinaron la presencia de infecciones asintomáticas por *C. acutatum* en hojas de manzanos del sur de Noruega indicando a éstas como fuente importante de inóculo inicial para infecciones en frutos. Siguiendo en esta línea, Hamada *et al.* (2020) registraron infecciones quiescentes en flores de manzano de los cultivares ‘Eva’ y ‘Gala’, de los cuales obtuvieron aislados de *Colletotrichum* spp. que resultaron patogénicos en frutos y en hojas, causando síntomas de PA y MFG, respectivamente. Estas infecciones asintomáticas pueden servir como fuentes de inóculo para la infección de otras plantas o de la misma planta (Freeman *et al.*, 2001; Peres *et al.*, 2005; Udayanga *et al.*, 2013).

3.1.2.2 Penetración, infección y colonización

Al género *Colletotrichum* se asocian diferentes modos de vida dentro de los que se encuentran necrotrófico, hemibiotrófico, latente o quiescente y endófito (De Silva *et al.*, 2017). En general, estos diferentes estilos varían entre complejos de especies, y la mayoría de las especies a su vez pueden cambiar secuencialmente entre los distintos estilos de vida (O'Connell *et al.*, 2012).

Las especies de *Colletotrichum* son cosmopolitas, en algunos casos, múltiples especies infectan un solo hospedante, o a la inversa, una sola especie de *Colletotrichum* es capaz de infectar varios hospedantes (Sanders & Korsten, 2003). De esta manera, las estrategias de infección pueden variar entre diferentes hospedantes e incluso entre diferentes tejidos de un mismo hospedante (Dowling *et al.*, 2020).

El proceso de infección típico de *Colletotrichum* puede dividirse en dos partes: pre-infección y post-infección. La primera etapa involucra una secuencia inicial de eventos que es similar en todas las especies y es en el proceso de post-infección cuando se pueden encontrar diferencias según hospedantes y especies (Bailey *et al.*, 1992; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004).

3.1.2.2.1 Pre-infección

Una vez que los conidios se depositaron sobre la superficie del hospedante comienza el proceso de pre-infección. Para la germinación de los conidios es necesario que exista agua libre en la superficie de los frutos u hojas (Trapero & Blanco, 2008). Los conidios se depositan, se adhieren a la superficie del tejido y germinan. Los conidios uninucleados se hinchan, sus núcleos se dividen, se forma un tabique que divide en dos al conidio y emerge un tubo germinativo que produce un conidio secundario o un apresorio que penetra la epidermis (Velho *et al.*, 2016; Rockenbach *et al.*, 2018; De Silva *et al.*, 2017; Jayawardena *et al.*, 2021). La velocidad con que germina el conidio y se diferencia el tubo germinativo en apresorio está fuertemente influenciada por factores ambientales, pero generalmente ocurre entre 3 y 48 horas luego de la deposición de los conidios sobre la superficie del hospedante (Lopez, 2001). Estudios realizados en hojas de manzanos por Shang *et al.* (2020) determinaron a las 72 horas post inoculación (hpi), que el 99,1% de los conidios habían germinado y el 98,5% habían desarrollado apresorios, la mayoría de ellos ya melanizados. A partir de aquí, luego de la penetración, ocurren diferencias en el proceso de infección que pueden variar según el hospedante o la especie de *Colletotrichum* involucrada (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004).

3.1.2.2.2. Post-infección

Luego de la fase de pre-infección, se inicia el proceso de infección propiamente dicho del tejido del hospedante. Se han descrito diferentes estrategias básicas de infección para *Colletotrichum*

spp. entre las que se destacan: hemibiotrófica intracelular, que es la forma más común, y necrotrófica subcuticular-intramural (Araujo *et al.*, 2014; De Silva *et al.*, 2017; Jayawardena *et al.*, 2021).

Muchas especies inicialmente establecen la infección con una breve fase biotrófica intracelular (Figura 3.2), en la cual el apresorio penetra en la célula epidérmica y se hincha para producir una vesícula de infección con varias hifas, llamadas hifas primarias, que invaden el tejido epidérmico adyacente y el mesófilo. Esta fase puede durar de 24 a 72 horas, pero luego continúa una fase necrotrófica destructiva subcuticular, en la cual las hifas secundarias que nacen de las primarias crecen intra e intercelularmente, secretando enzimas que degradan la pared celular y necrosan las células (O'Connell *et al.*, 2012; De Silva *et al.*, 2017). Este mecanismo de infección fue descrito recientemente por Shang *et al.* (2020) para *C. fructicola* infectando hojas de manzano del cultivar 'Gala'.

En otras especies, la infección inicial es necrotrófica subcuticular-intramural (Figura 3.2), no hay hifas primarias ni fase biotrofa y el hongo crece rápidamente debajo de la cutícula dentro de las paredes de las células epidérmicas, sin penetrar los protoplastos (Moraes *et al.*, 2013). Durante las primeras 24 horas después de la penetración, la fase inicial de la infección subcuticular, ocurre en ausencia de síntomas. Luego, el hongo avanza hacia las paredes anticlinales de la capa epidérmica produciendo una extensa red de hifas intramurales. Una vez establecida la infección, el patógeno adquiere la clásica conducta necrotrófica, la cual es responsable de los síntomas (Bailey *et al.*, 1992; De Silva *et al.*, 2017).

3.1.2.2.3. Crecimiento y reproducción

Una vez que el patógeno logró infectar los tejidos de su hospedante comienza a crecer y se multiplica dentro de los mismos invadiendo y colonizando la planta. El crecimiento y/o la reproducción del patógeno (colonización) en los tejidos infectados son en realidad dos subetapas simultáneas del desarrollo de la enfermedad (Agrios, 2005). En la mayoría de los casos, una infección exitosa resulta en la aparición de los síntomas. Este período comprendido entre la inoculación y la aparición de síntomas, llamado incubación, es un componente fundamental en la comprensión de las epidemias, ya que influye en su velocidad y duración (Amorim & Bergamin Filho, 2018; Moreira *et al.*, 2021). Para el caso de la PA y MFG en manzanos, el período de incubación, aunque resulta muy corto en condiciones óptimas, es variable según el cultivar de manzano y la especie de *Colletotrichum* involucrada. De manera generalizada Katsurayama & Boneti (2009) informan períodos de 2 a 5 días en hojas y 4 hasta 7 días en frutos, dependiendo si la infección ocurre con o sin presencia de lesión,

respectivamente. Moreira *et al.* (2021) reportan el período de incubación de PA en cultivares ‘Gala’ y ‘Eva’ en el rango de 2 a 6 días en frutos inoculados con heridas, extendiéndose éste en frutos sanos de 15 a 25 días en el cultivar ‘Gala’ y de 5 a 17 días en el cultivar ‘Eva’.

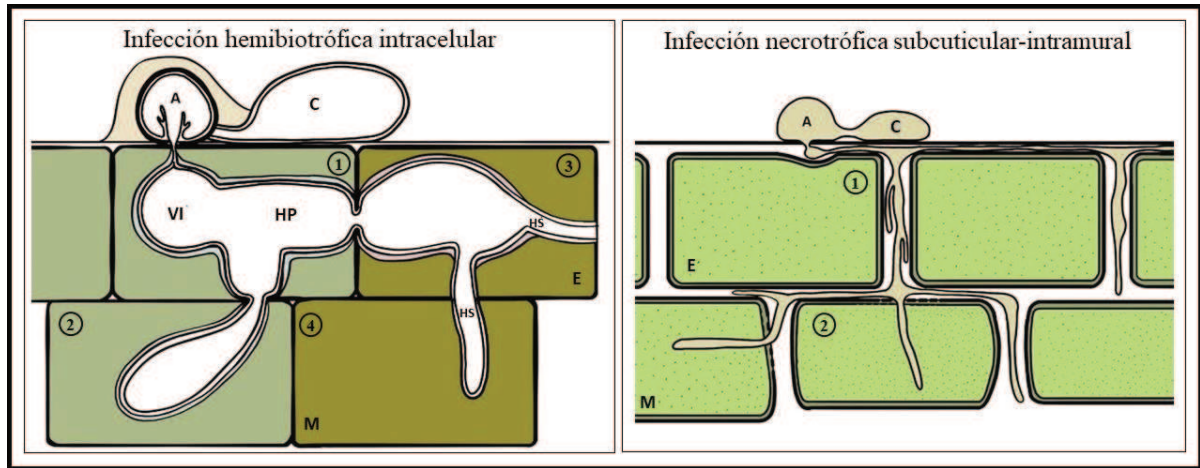


Figura 3.2.: Dos especies de *Colletotrichum* que exhiben diferentes estrategias de infección (Adaptada de Perfect *et al.*, 1999 y Chethana *et al.*, 2021). Del lado izquierdo se muestra el esquema de infección hemibiotrófica intracelular. Los conidios (C) germinan para formar apresorios (A) melanizados. (1) Al ingresar a las células epidérmicas del hospedante (E), las hifas de penetración se hinchan para formar vesículas de infección (VI) e hifas primarias (HP). El protoplasto hospedante permanece vivo durante esta etapa biotrófica. (2) Las HP colonizan progresivamente nuevas células epidérmicas y mesófilas (M), y se contraen a medida que atraviesan las paredes celulares. (3) Aproximadamente 48 horas después de la penetración inicial, se forman hifas necrotroficas secundarias (HS). En las células que contienen hifas primarias y secundarias, la membrana plasmática vegetal y la matriz que rodea a las hifas primarias comienzan a desintegrarse. (4) Las HS estrechas secretan enzimas que degradan la pared celular y crean lesiones necróticas que se expanden rápidamente. Del lado izquierdo se muestra el esquema de infección necrotrofica intramural subcuticular. Los conidios (C) germinan para formar apresorios (A) melanizados a partir de los cuales se desarrollan las hifas de penetración. (1) Penetra la cutícula del hospedante y las hifas fúngicas se propagan subcuticularmente dentro de las paredes de las células epidérmicas del hospedante (E) que posteriormente mueren. (2) Durante las últimas etapas de la infección, las hifas fúngicas penetran en las células epidérmicas y mesófilas de la planta (M).

Para el caso de MFG, Alaniz *et al.* (2019) trabajaron inoculando ascosporas de *C. fructicola* y conidios de *C. karstii* en hojas del cultivar ‘Galaxy’ siendo los primeros síntomas visibles 3 y 7 días después de la inoculación, respectivamente. La esporulación requiere de humedad relativa elevada (>87%) y tanto el cultivar de manzano como la especie de *Colletotrichum* tienen significativa implicancia sobre la misma. Munir *et al.* (2016) reportaron a *C. fiorinae* como la especie que produjo significativamente más esporas por unidad de área de lesión comparado con *C. siamense*, *C. nymphaeae*, *C. theobromicola* y *C. fructicola*. Estos autores destacaron además que, en frutas del cultivar ‘Red Stayman Winesap’ se produjeron

significativamente más esporas que en ‘Golden Delicious’. Alaniz *et al.* (2019) también reportaron diferencias entre las especies asociadas a MFG, *C. fructicola* y *C. karstii* observando producción de acérvulas en las lesiones sólo para la primera de ellas.

3.1.2.2.4 Diseminación

Tanto la PA como las MFG son enfermedades policíclicas por lo que, tras la infección primaria, continuamente forman nuevos síntomas en frutos y hojas (Penet *et al.*, 2014; Carraro *et al.*, 2022). La presencia o ausencia de la reproducción sexual tiene consecuencias en la forma de diseminación de la enfermedad (Casanova *et al.*, 2016). Las ascosporas y conidios de *Colletotrichum* utilizan el viento y el salpicado por el agua de lluvia, respectivamente, para diseminarse a lo largo de toda la temporada de crecimiento (Trapero & Blanco, 2008; Casanova *et al.*, 2016). La distribución en focos de la PA en el campo generalmente se relaciona a las primeras infecciones por conidios (Alaniz *et al.*, 2012), lo que se asocia al salpicado de estas esporas a partir de un primer sitio de infección hacia los frutos vecinos (Schubert, 1983; Sutton, 1990; Casanova *et al.*, 2016). Sin embargo, no todos los patosistemas se comportan de la misma manera por lo que diferentes autores han informado que la dispersión de *Colletotrichum* spp. también puede ocurrir por la acción de otros agentes, como insectos y lluvia impulsada por el viento (Peres *et al.*, 2005; Gasparoto *et al.*, 2017).

Los antecedentes expuestos tanto para PA como para MFG revelan la diversidad de estrategias de supervivencia, infección, diseminación y sintomatología que manifiestan las diferentes especies de *Colletotrichum*. Luego de identificarse a *Colletotrichum siamense* como único agente causal de PA y MF en manzanos con bajos requerimientos de frío en la región central de Santa Fe, determinar los aspectos centrales de la patogénesis y la epidemiología de las enfermedades en la zona, resulta esencial para definir estrategias de manejo de la enfermedad. En base a esto, el objetivo de este capítulo fue caracterizar las principales fases de la patogénesis de las enfermedades causadas por *Colletotrichum siamense* en manzanos con bajos requerimientos de frío en la región central de Santa Fe.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Epidemiología de las enfermedades causadas por *Colletotrichum siamense* en el campo

3.2.1.1 Sitios y estructuras de sobrevivencia

Durante tres años consecutivos, 2016-2018, en el campo experimental de cultivos intensivos y forestales (CECIF, Esperanza, Santa Fe; 31°26' S; 60°56' O; 40 m sobre el nivel del mar) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Litoral (FCA-UNL) se muestrearon en tres épocas del año (abril, junio y agosto) plantas de manzanos de 10 años de edad de los cultivares 'Eva', 'Caricia' y 'Princesa'. Los momentos de toma de muestras se correspondieron con finalización de caída de hojas (abril), reposo invernal y presencia de brotaciones esporádicas (junio) e inicio de apertura de yemas de flor (agosto). Para ello, se recorrió el monte frutal en forma de zigzag seleccionando al azar al menos seis árboles de cada cultivar. Se muestrearon hojas asintomáticas, frutos momificados, ramas jóvenes y yemas de la parte aérea, mientras que del suelo se recogieron hojas y ramas de poda. En los muestreos coincidentes con el periodo de floración (agosto) se realizó la recolección de flores. Las submuestras correspondientes a cada cultivar y a cada momento de muestreo se unificaron y evaluaron en conjunto. La expresión del signo de *Colletotrichum* se forzó según la metodología utilizada por Hamada & De-Mio (2012) con algunas modificaciones. Las muestras de tejido vegetal obtenidas en el campo se llevaron a laboratorio, se colocaron en bandejas a -18°C por una hora y luego en bandejas plásticas con tapa generando condiciones de cámara húmeda a 25°C con un fotoperíodo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad. Mediante lupa trinocular estereoscópica (Motic SMZ-1 68, China) se procedió a observar la presencia o ausencia de estructuras como micelio, acérvulas o peritecios. Posteriormente, y si estas estructuras estaban presentes, se procedía a observar con microscopio óptico (Olympus CH30, Japón) para confirmar que pertenecieran al género *Colletotrichum*. Los datos se expresaron como porcentaje de muestras en las cuales se detectó presencia de *Colletotrichum*.

3.2.1.2 Evolución de PA a campo

En el campo CECIF detallado en la metodología "*Sitios y estructuras de sobrevivencia*" (Apartado 3.2.1.1) se realizaron registros de fenología, condiciones meteorológicas y mediciones de incidencia de la enfermedad durante tres años consecutivos (2016-2018) en los cultivares 'Eva', 'Caricia' y 'Princesa'. Para el seguimiento de los estados fenológicos desde comienzos de la primavera hasta cosecha, se utilizó la escala BBCH desarrollada para frutales de pepita (Meier *et al.*, 1994). En conjunto, se analizaron los datos meteorológicos de la zona, obtenidos de la estación meteorológica de la FCA-UNL y los niveles de infección, específicamente incidencia de PA en frutos. Para ello se marcaron 4 ramas al azar por árbol en primavera, se contabilizó el número de frutos producidos en las ramas y se registró a aquellos que presentaban síntomas de podredumbre hasta la cosecha. Se utilizó un diseño completamente

aleatorizado con diez repeticiones por cultivar y no se aplicaron fungicidas durante los años de medición. Los porcentajes de incidencia se convirtieron a valores de proporción y se sometieron a la transformación arcoseno-raíz cuadrada antes del ANOVA. Finalmente, los datos se analizaron mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$) a través del software InfoStat v2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017)

3.2.2 Caracterización de las primeras etapas del proceso infeccioso de *Colletotrichum siamense*

Para la realización de este experimento se utilizó el cultivar ‘Caricia’, que resultó el más susceptible en los ensayos de susceptibilidad. Se investigó mediante uso de microscopía óptica tradicional, microscopía electrónica de transmisión y microscopía electrónica de barrido, la estrategia de infección que utiliza *Colletotrichum siamense*. Para ello se recolectaron del campo CECIF hojas completamente expandidas y aparentemente sanas de ramas jóvenes y frutos visualmente sanos de tamaño comercial y con color verde predominante. Las hojas y frutos se desinfectaron e inocularon con el aislado E22 de *C. siamense* de acuerdo a la metodología descrita en el Capítulo 1, apartado 2.2.4 (sin realizar heridas). A diferentes tiempos post-inoculación (12 a 144 horas) se cortaron con un bisturí muestras pequeñas de la zona inoculada y se acondicionaron según tipo de microscopía a utilizar. Se observaron tres muestras de cada órgano por tiempo de inoculación.

3.2.2.1 Análisis mediante microscopía óptica tradicional

Para observar de forma superficial en hojas y frutos los procesos de pre-infección y post-infección de *Colletotrichum siamense*, se utilizó la coloración de Azul de Trypan. Este colorante diazoico tiñe la quitina, principal componente de las paredes de los hongos (Vierheilig *et al.*, 2001; Bhadauria *et al.*, 2010). Las muestras se acondicionaron de la siguiente manera: en cada tiempo post-inoculación del experimento, las porciones de hojas o frutos seccionadas se colocaron directamente en placas que contenían solución de azul de trypan 0,4% (p/v) (Bhadauria *et al.*, 2010). Las muestras permanecieron durante media hora en la solución y posteriormente se enjuagaron en agua destilada. En este punto, las muestras quedaban acondicionadas para ser transferidas a un portaobjetos con glicerol 30% (v/v) y ser visualizadas con un Microscopio Leica DM1000 (Leica, Wetzlar, Alemania) acoplado a una cámara Canon EOS Rebel T2i (Canon, Melville, NY).

3.2.2.2 Análisis mediante microscopía electrónica de transmisión

Las muestras se fijaron durante 24 horas a 4°C en 4% (v/v) de glutaraldehído en buffer fosfato (1,8 g.l⁻¹ NaH₂PO₄; 23,25 g.l⁻¹ Na₂HPO₄.7H₂O; 5 g.l⁻¹ NaCl, en agua bidestilada, pH 7,4). Posteriormente, se lavaron con buffer fosfato, se colocaron en 2% (p/v) tetróxido de osmio, y se deshidrataron en series crecientes de acetona desde 25 hasta 100%. Las muestras se infiltraron en resina Spurr, se cortaron con ultramicrotomo utilizando cuchilla de diamante, se contrastaron con 2% (p/v) acetato de uranilo durante tres minutos y con 0,1% (p/v) citrato de plomo durante 1 minuto. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL 100CXII (JEOL, Japón) a 80 KV y las imágenes se digitalizaron con una cámara CCD Gatán, modelo ES1000W (Gatan Inc., Pleasanton, CA, EE.UU). Estos experimentos se realizaron con la asistencia del servicio de microscopía de la Unidad de Administración Territorial (UAT), dependiente del Centro Científico Tecnológico Bahía Blanca (CCT-CONICET-BB).

3.2.2.3 Análisis mediante microscopía electrónica de barrido

Las muestras se fijaron durante 24 h a 4°C en 4% (v/v) de glutaraldehído en buffer fosfato. Luego se retiraron del fijador, se enjuagaron en tampón buffer fosfato y se fijaron en tetróxido de osmio al 2% (p/v) durante dos horas. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada tres veces durante diez minutos y se deshidrataron a través de una serie de alcohol y acetona 70%, 85% y 100% (v/v) durante diez minutos en cada solución. Luego, las muestras se secaron hasta el punto crítico sumergiendo los fragmentos en dióxido de carbono líquido en un secador de punto crítico Denton Vacuum DCP-1, y se fijaron en discos de aluminio con cinta adhesiva de doble cara. Posteriormente, se realizó el metalizado utilizando vapor de oro en un equipo Denton Vacuum Desk II, a 50 mA, durante 180 segundos. En este experimento solo se utilizaron muestras de fruto a las 48, 120 y 144 horas post inoculación. Las observaciones se realizaron con el microscopio electrónico de barrido JEOL 5800 LV (JEOL, Japón). Estos experimentos se realizaron con la asistencia del servicio de microscopía de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) durante la participación en el curso “Bases teóricas y prácticas en distintas técnicas de microscopía óptica y electrónica: procesamiento y observación de muestras biológicas”.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Epidemiología de las enfermedades causadas por *Colletotrichum siamense* en el campo

3.3.1.1 Sitios y estructuras de sobrevivencia

La recolección de muestras durante tres años consecutivos permitió constatar que *C. siamense* sobrevive en su forma asexual o anamorfa, es decir, formando conidios agrupados en acérvulas. Las muestras arrojaron resultados positivos en frutos momificados, pedúnculos, en ramitas, hojas prendidas asintomáticas, hojarasca y en pecíolos (Figura 3.3A, B, C, D, E y F). En la mayoría de los casos, las estructuras observadas se correspondieron a masas de conidios formando acérvulas sin presencia de micelio (Figura 3.3G y H). Sólo en muestras de pedúnculos se observó escasa presencia de micelio (Figura 3.3B). En el caso de las hojas asintomáticas, el signo se desarrollaba principalmente en la lámina de la hoja y en menor frecuencia sobre las nervaduras. No se observaron estructuras reproductivas de *Colletotrichum* sobre yemas, flores ni ramas de poda. En concordancia con lo obtenido en cultivos artificiales (Capítulo 1), en ninguno de los casos pudo detectarse estructuras de origen sexual.

En la Tabla 3.1 se detallan los resultados obtenidos en los diferentes órganos y momentos de muestreo. La presencia de *Colletotrichum siamense* en ramas fue positiva todos los años, aunque en junio y agosto de 2017 y junio de 2018 fue negativa.

En las hojas asintomáticas, el hongo fue registrado con diferentes niveles de presencia, en todos los muestreos realizados durante los tres años consecutivos. Se registró un 15,9; 28,3 y 23,17% de muestras de hojas positivas para los años 2016, 2017 y 2018, respectivamente. El valor promedio para los tres años consecutivos fue de 21,5%. A su vez, se registró el desarrollo de estructuras de *Colletotrichum* sobre los pecíolos de las hojas evaluadas, con un valor promedio de 7,6% de casos positivos. Todos los años fue posible visualizar el desarrollo del hongo, aunque no en todos los momentos de muestreo (Tabla 3.1).

En los tres años se registró la presencia de *Colletotrichum* en los frutos momificados, aunque no de manera constante en las diferentes evaluaciones. En el año 2017, los tres momentos de muestreo fueron positivos, mientras que en los años 2016 y 2018 sólo las muestras tomadas en el mes de junio y abril fueron positivas. A su vez, se evaluó la existencia de *C. siamense* en los pedúnculos de estos frutos, obteniendo un valor promedio de 12,5% de casos positivos. Todos los años, se registraron casos positivos, no obstante, en abril y agosto de 2016 y agosto de 2018, las muestras fueron negativas para *C. siamense* (Tabla 3.1).

Las muestras de hojarasca evaluadas estuvieron compuestas por hojas caídas que no habían comenzado el proceso de descomposición, hojas que todavía estaban amarillas o comenzando a secarse. Respecto a los resultados, los tres años de evaluación fueron positivos, registrando sólo el mes de agosto de 2018 negativo para la presencia de *Colletotrichum* (Tabla 3.1). Se verificó una tendencia de sobrevivencia positiva siempre mayor en los meses de abril y junio, si se compara con las muestras evaluadas en agosto.

Tabla 3.1. Sobrevivencia de *Colletotrichum siamense* en órganos de plantas de manzanos con bajos requerimientos de frío, según época de muestreo durante los años 2016, 2017 y 2018

Fecha de muestreo		Órganos positivos (%) - N° de órganos evaluados (n)											
		Hojas		Frut. mom.		Ramas		Pedúnculo		Pecíolo		Hojarasca	
		n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n
2016													
Abril	22,22	36	0,00	3	4,55	22	0,00	3	5,56	36	20,00	10	
Junio	6,67	30	40,00	5	5,56	18	20,00	5	16,67	30	13,04	23	
Agosto	31,82	22	0,00	11	11,11	18	0,00	11	4,55	22	9,09	11	
2017													
Abril	47,06	17	37,50	8	14,29	14	12,50	8	0,00	17	20,00	15	
Junio	6,67	15	25,00	12	0,00	11	16,67	12	6,67	15	25,00	20	
Agosto	28,57	21	25,00	4	0,00	12	25,00	4	4,76	21	10,00	10	
2018													
Abril	50,00	14	28,57	7	29,41	17	14,29	7	28,57	14	15,38	13	
Junio	17,50	40	0,00	3	0,00	21	33,33	3	12,50	40	16,00	25	
Agosto	17,85	28	0,00	3	16,67	24	0,00	3	0,00	28	0,00	9	

3.3.1.2 Evolución de las enfermedades causadas por *Colletotrichum siamense* a campo en relación a la fenología y las condiciones ambientales

El registro de los estados fenológicos, de las condiciones climáticas y la cuantificación de incidencia de PA se realizó desde julio de 2016 a diciembre de 2018. En la Figura 3.4 se resumen los estados fenológicos y los momentos de aparición de la PA. En cuanto a los estados fenológicos, durante los tres años se mantuvo la tendencia del inicio de apertura de yemas florales la última semana de agosto, con el pico máximo de floración la primera semana de septiembre, extendiéndose el período de plena floración por aproximadamente 20 ± 7 días (Figura 3.4A y B). Si bien los tres cultivares superponen en gran medida los momentos de plena floración, el cultivar ‘Eva’ inicia la apertura floral dos a tres días antes.

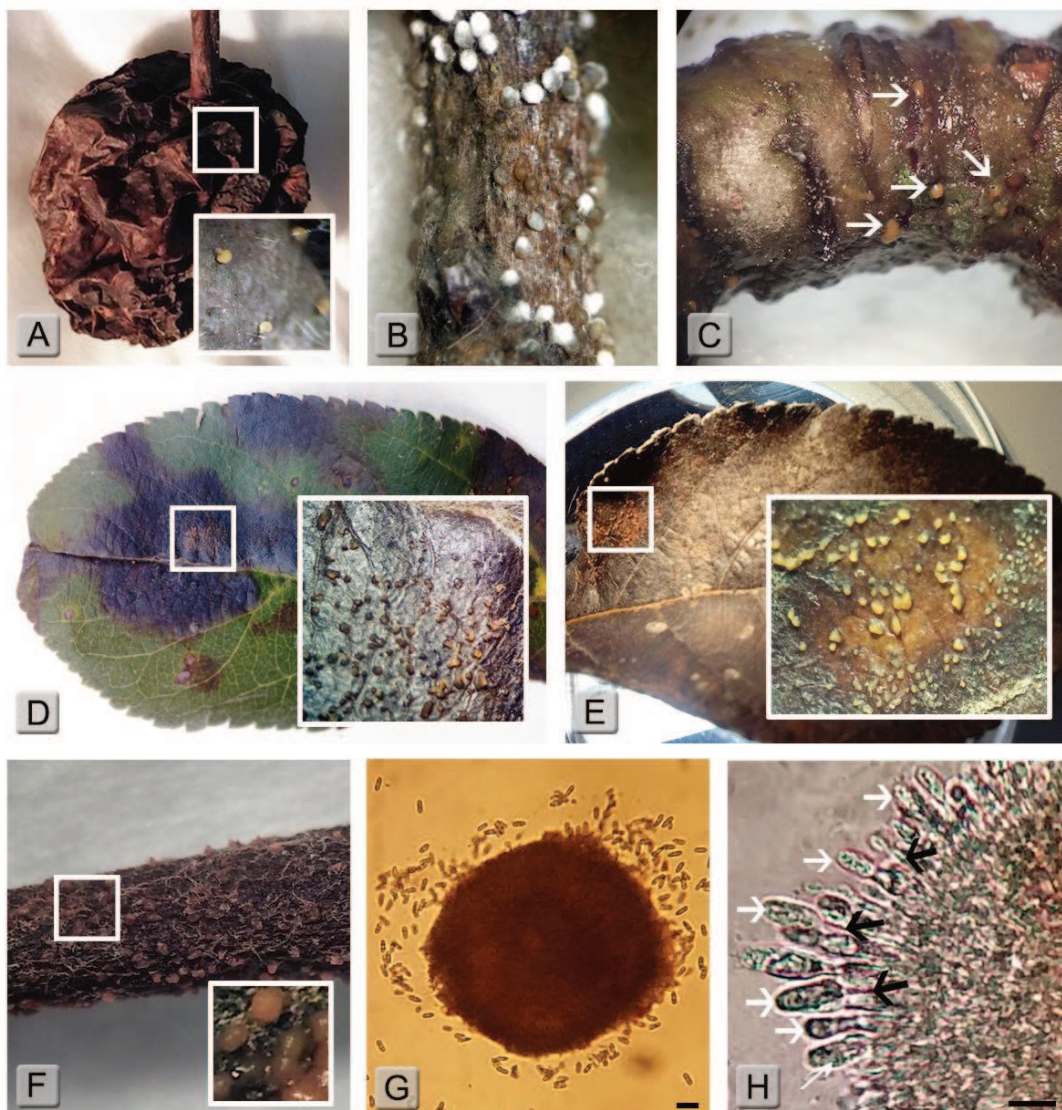


Figura 3.3 Sitios y estructuras de sobrevivencia de *Colletotrichum siamense* en plantaciones de manzanos con bajos requerimientos de frío del centro de Santa Fe. Fruto momificado del cultivar ‘Caricia’; el recuadro detalla en aumento los conidiomatos formados por una masa mucilaginosa que contiene los conidios (A). Pedúnculo de fruto momificado; se observa el desarrollo de los conidiomatos y en algunos casos puede visualizarse el desarrollo de micelio (B). Rama de manzano del cultivar ‘Princesa’; las flechas señalan las masas de conidios que afloraron luego de la cámara húmeda (C). Hoja prendida asintomática del cultivar ‘Eva’; el recuadro blanco muestra en aumento acérvulas maduras que rompen la epidermis de la hoja. Las zonas negras son efecto de la técnica de forzado de aparición del signo (D). Hojarasca; el recuadro blanco muestra en aumento masas de conidios de *C. siamense* (E). Pecíolo del cultivar ‘Princesa’ mostrando conidiomatos dispersos en todo el órgano. El recuadro blanco muestra en detalle estas estructuras fúngicas (F). Acérvula extraída del pedúnculo de fruto momificado. Alrededor se observa el desprendimiento de conidios (G). Detalle de acérvulas mostrando conidios (flechas blancas) y conidióforos (flechas negras) (H). Barras de escalas: G: 20 μ m; H: 10 μ m.

El momento de cuajado de los frutos fue semejante en los tres cultivares, registrando los primeros días de octubre a frutos con dos centímetros de calibre (BBCH 72, Figura 3.4C) en

los tres años de estudio. A partir de este momento comenzaron a evaluarse los síntomas de PA en frutos. De manera generalizada, la última semana de octubre se registran frutos de hasta 40 mm de diámetro (BBCH 74, Figura 3.4D). Durante la primera quincena de noviembre, con la fruta alcanzando el 50% del tamaño final (BBCH 75, Figura 3.4E) se observaron en los tres cultivares las primeras infecciones de PA, caracterizadas como pequeñas lesiones necróticas, aplanadas y redondeadas. En esta instancia, la fruta seguía creciendo y las lesiones, a menudo, aumentaban de tamaño. Durante los últimos días de noviembre, las lesiones seguían avanzando en tamaño y cantidad por fruto (BBCH 77, Figura 3.4F). En diciembre, en frutos con el 90% de su tamaño final, (BBCH 79, Figura 3.4G), las lesiones de PA aumentaron considerablemente de tamaño, mientras que, a finales de diciembre la PA avanzó ampliamente y las lesiones que se mostraban en múltiples sitios de infección coalescieron (BBCH 85, Figura 3.4H). Finalmente, la fecha de cosecha de fruta con madurez fisiológica en los tres años, se dio la primera semana de enero (BBCH 87).

A lo largo de este período de estudio, la PA tuvo diferentes manifestaciones; desde una sola lesión por fruto hasta múltiples sitios de infección que con el avance del tiempo generaban una podredumbre generalizada hasta el posterior momificado del fruto. Fue posible observar lesiones tanto en frutos inmaduros como en frutos cercanos a la madurez (Figura 3.5).

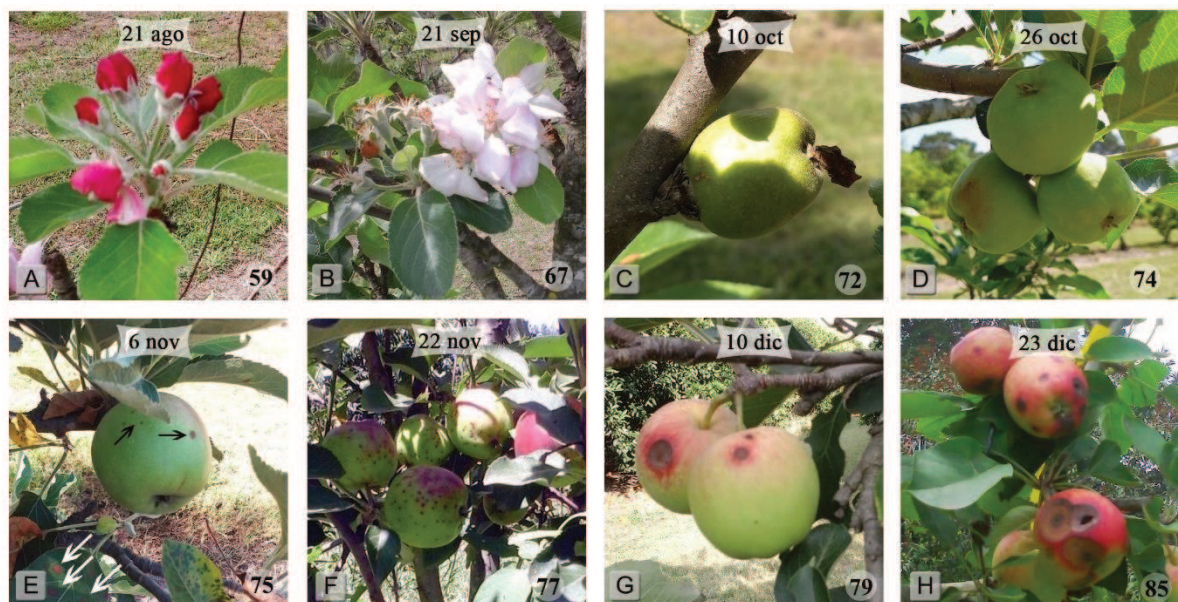


Figura 3.4. Estados fenológicos del cultivar 'Caricia' mostrando los momentos de aparición de Podredumbre Amarga (PA) y sintomatología encontrada a campo. Al pie de cada imagen (Lado derecho) y en números se expresa el estado BBCH. Floración: Aparición del órgano floral; flores en estado balón (A) y flores marchitándose, la mayoría de los pétalos ya se han caído (B). Formación de frutos: frutos sanos de 20 mm de diámetro (C) y de hasta 40 mm de diámetro (D). Primera detección de síntomas: frutos que alcanzan el 50% del tamaño,

las flechas blancas indican necrosis en hojas y las flechas negras PA (E). Frutos con el 70% del tamaño varietal final y múltiples sitios de infección (F). Frutos que alcanzan el 90% del tamaño final. Presencia de signo y aumento de tamaño de las lesiones (G). Frutos en madurez avanzada (H).

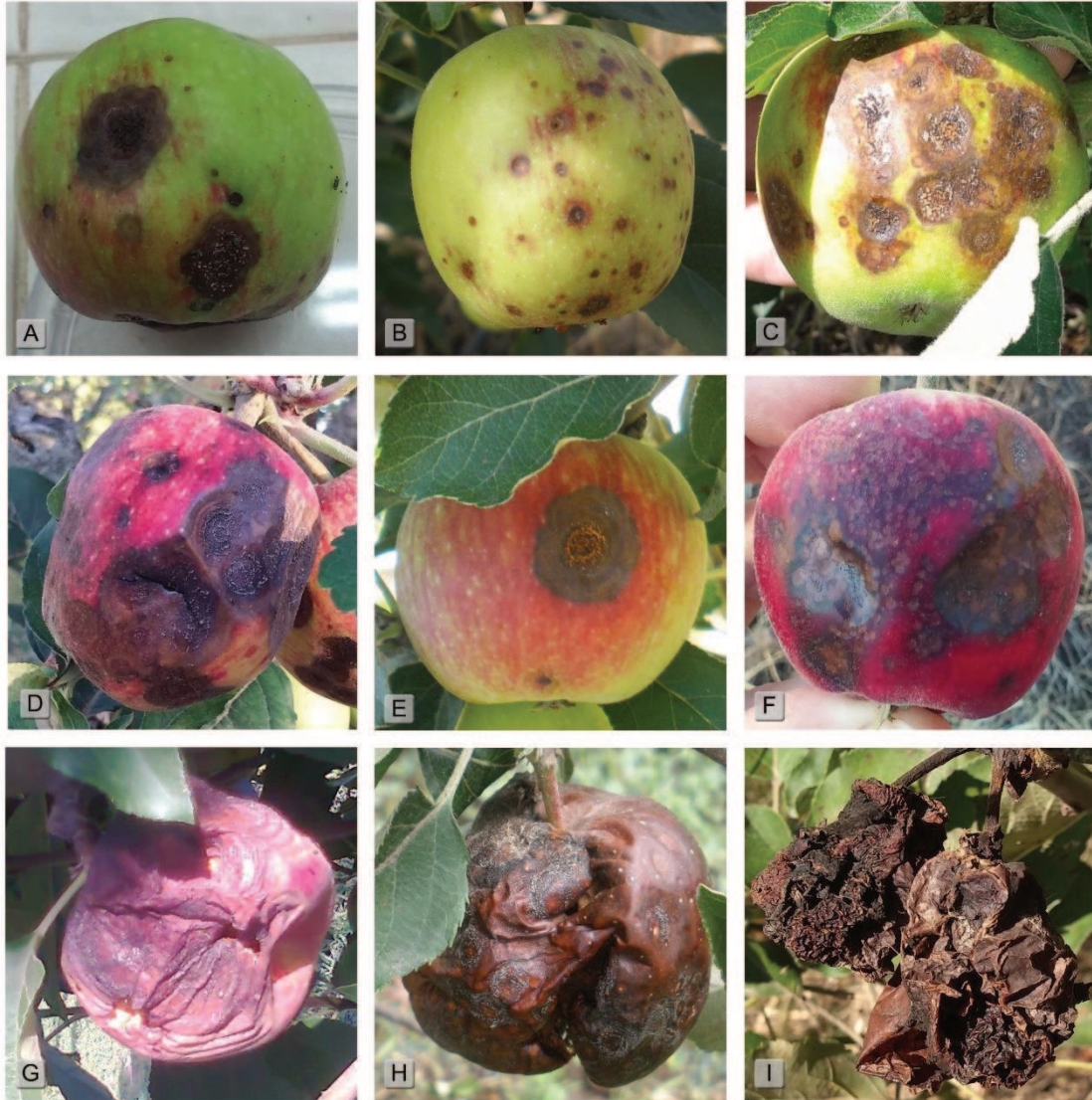


Figura 3.5 Distintas manifestaciones y estados de avance de PA en los cultivares con bajos requerimientos de frío ‘Princesa’, ‘Eva’ y ‘Caricia’. Frutos inmaduros con múltiples sitios de infección, en las lesiones más avanzadas es visible el signo (A, B, C). Frutos cercanos a la madurez, con lesiones agrupadas y con expresión del signo color crema (D); con lesión aislada y masa de conidios color naranja (E) y con múltiples sitios de infección que han coalescido y desarrollado el signo color pardo oscuro (F). Estado de las frutas infectadas en fecha de cosecha (G, H, I). La PA está en su etapa final de expresión, con frutos con podredumbre generalizada (G,H) y frutos momificados (I).

Junto a la fenología se realizó el seguimiento de las variables meteorológicas (Tabla 3.2) suministradas por la estación de la FCA-UNL y la cuantificación de la incidencia de PA (Tabla 3.3).

Tabla 3.2. Datos meteorológicos registrados en la estación meteorológica de la FCA de Esperanza durante la estación de crecimiento de los años 2016, 2017 y 2018

		Temperatura (°C)								
Año	Mes	Pp (mm)	DL	DCL	Máxima	Media	Mínima	HR (%)	LV	DCHR>90%
2016	Jul	13,75	3	2	16,1	11,3	7,5	90	3	5-4-2-3-2
	Ago	2,95	2	0	22,4	14,5	7,8	79,7	2	4-3
	Sep	20,75	2	0	23,1	15,7	9,1	73,1	2	
	Oct	245,25	9	2-5-2	24,9	19,1	13,8	82,9	9	2-2-3-3
	Nov	46,5	6	2	29,0	21,8	15,3	75,4	3	2
	Dic	234,25	13	3-6	32,1	25,3	18,7	78,0	10	2-2
	2017	Jul	32,5	8	3-2-2	20,1	14,3	10,1	87,6	0
Ago		86	7	2-2-2	21,7	15,7	10,4	87,2	2	3-6-6
Sep		165,5	7	2	22,9	17,2	12,1	89,8	4	2-4-2-5
Oct		169,5	7	2-2	25,2	18,9	12,7	81,0	7	2-2
Nov		76,5	8	3-2	31,3	24,1	17,1	73,3	6	
Dic		83,5	7	2	32,7	25,9	19,3	76,2	5	2
2018		Jul	32,5	5	3	15,2	10,7	6,8	90,2	1
	Ago	47,25	6	2-2	19,6	12,2	5,7	81,9	4	2-3
	Sep	24,25	7	2-2	25,5	19,2	13,5	86,6	6	2-4-6
	Oct	106,75	11	2-2-5	25,5	19,2	13,6	79,7	11	2
	Nov	216,25	8	3-2	28,7	22,7	17,1	82,6	5	2-3-2-2
	Dic	135,75	10	2-2-2	30,9	24,6	18,7	81,3	2	4

Precipitaciones acumuladas (Pp en mm), días con lluvia (DL), días consecutivos con lluvia (DCL), temperaturas máxima, mínima y media (°C), humedad relativa (HR %), días de lluvia acompañada de viento superior a 25Km/h (LV) y días consecutivos con humedad relativa mayor al 90% (DCHR>90%)

En el año 2016, la sintomatología inicial de la PA se verificó en la primera quincena de noviembre (3 de noviembre). Al evaluarse las condiciones climáticas 15 días anteriores a la aparición de estos primeros síntomas se verifica la ocurrencia de precipitaciones durante cinco días consecutivos, de los cuales tres eventos fueron superiores a 10 mm, con humedad relativa mayor al 90%, vientos moderados y registros de temperaturas por encima de 22,5°C los primeros tres días. Cinco días después vuelve a repetirse la presencia de lluvias superiores a 10 mm durante dos días consecutivos, con humedad relativa de 98% y temperatura media de 20,2°C (Figura 3.6). Al momento de la detección de la enfermedad, ‘Eva’ se comportó como ‘Princesa’, mientras ‘Caricia’ mostró una incidencia significativamente superior. La incidencia acumulada de la enfermedad aumentó gradualmente hasta el momento de cosecha, alcanzando el 100% en el cultivar ‘Caricia’, mientras que ‘Eva’ y ‘Princesa’ arrojaron valores de incidencia

de 69,73% y 58,63%, respectivamente. Estas diferencias de comportamiento fueron significativas entre los cultivares (Tabla 3.3)

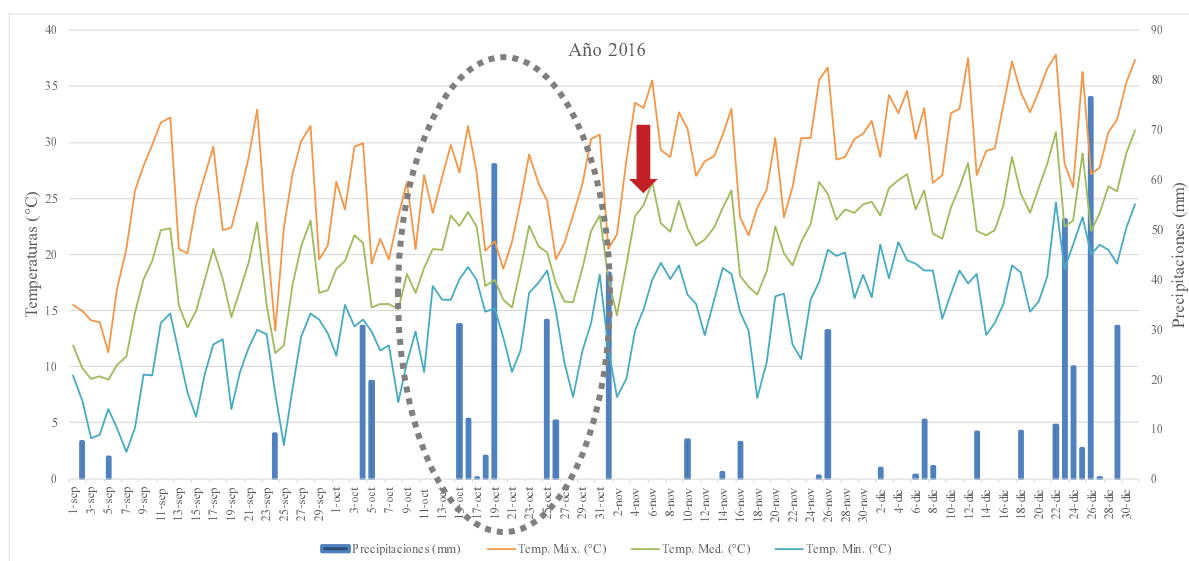


Figura 3.6. Precipitaciones diarias (mm) y temperaturas máximas, mínimas y medias (°C) desde un mes anterior a la aparición de Podredumbre Amarga (PA) hasta fecha próxima a cosecha de manzanos en el año 2016. Se indica con flecha el momento de la primera detección de PA y en líneas de puntos las condiciones del ambiente que podrían haber generado la infección.

El año 2017 fue climáticamente atípico ya que el invierno fue suave, con temperaturas más cálidas que hicieron que las hojas no se desprendieran totalmente o lo hicieran de manera tardía y se registraron brotaciones esporádicas en los meses invernales. Las precipitaciones fueron más abundantes que en el año 2016, pero estuvieron distribuidas equilibradamente desde los meses de julio a diciembre. La enfermedad en frutas se detectó a inicios de noviembre (6 noviembre) al igual que en la estación de crecimiento 2016. Dos semanas previas a la aparición de los síntomas se registraron 2 días consecutivos con precipitaciones superiores a 10 mm acompañadas de vientos moderados, temperaturas medias entre 20,9 y 23°C y humedad relativa por encima de 94%, condiciones que podrían estar indicando el momento de infección del patógeno (Figura 3.7). En simultáneo a los primeros síntomas se registraron tres días consecutivos con precipitaciones acompañadas de viento, humedad relativa por encima de 87% y temperaturas medias de 20°C. El cultivar ‘Princesa’ presentó un porcentaje de incidencia significativamente menor a ‘Caricia’ y ‘Eva’ durante toda la estación de crecimiento. Si se evalúa la evolución de la enfermedad, los niveles de incidencia de PA aumentaron abruptamente a inicios de diciembre en el caso de los cultivares ‘Eva’ y ‘Caricia’, retrasándose este aumento hasta las últimas dos semanas de diciembre en el caso de ‘Princesa’ (Tabla 3.3). A inicios de

diciembre comienzan a aumentar las temperaturas medias que se mantienen por encima de 21,5°C, a la vez que se registran eventos pluviométricos de entre 10 y 30 mm (Figura 3.7). Estas condiciones podrían haber desencadenado el aumento significativo de la incidencia en el mes de diciembre. Finalmente, los valores de incidencia al momento de cosecha fueron significativamente diferentes entre los cultivares, superando el 65% en ‘Eva’ y ‘Princesa’ y alcanzando el 100% en ‘Caricia’ (Tabla 3.3).

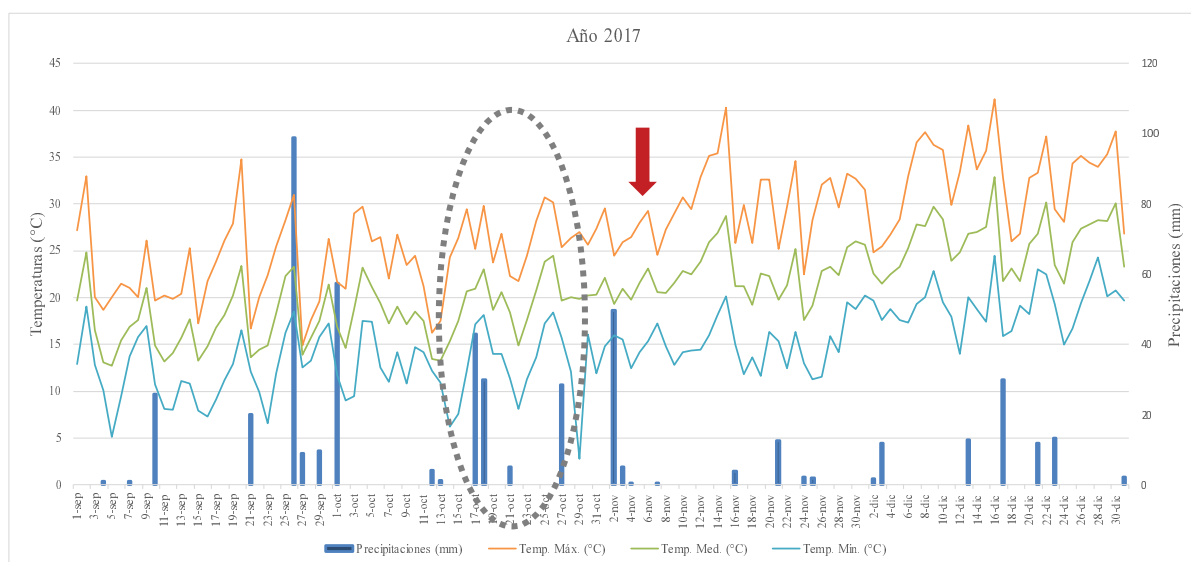


Figura 3.7. Precipitaciones diarias (mm) y temperaturas máximas, mínimas y medias (°C) desde un mes anterior a la aparición de Podredumbre Amarga (PA) hasta fecha próxima a cosecha de manzanos en el año 2017. Se indica con flecha el momento de la primera detección de PA y en líneas de puntos las condiciones del ambiente que podrían haber generado la infección.

Tabla 3.3. Evolución de la incidencia (%) de PA en los cultivares ‘Caricia’, ‘Eva’ y ‘Princesa’ durante las campañas 2016 y 2017

2016							
Cultivar	Noviembre				Diciembre		
	1 al 15		16 al 30		1 al 15		16 al 31
Caricia	39,8±28,66	a	58,07±25,02	a	81,41±17,34	a	100±0,00 a
Eva	19,96±23,01	b	35,07±28,12	b	52,38±28,73	b	69,73±26,57 b
Princesa	10,77±16,11	b	14,84±17,72	c	26,05±22,44	c	58,63±25,05 c
2017							
Caricia	19,79±20,78	a	30,37±26,51	a	75,21±28,92	a	100±0,00 a
Eva	17,25±23,65	a	29,5±26,46	a	60,29±0,00	a	83,17±26,12 b
Princesa	2,08±9,39	b	3,33±12,05	b	14,83±14,83	b	67,5±31,84 c

Letras diferentes dentro de la misma columna corresponden a valores significativamente diferentes (Tukey; P <0.05)

El año 2018 fue atípico ya que la enfermedad no se registró. Las precipitaciones acumuladas desde julio a diciembre (562,75 mm) no fueron notablemente diferentes a la de los años 2016-2017 (563,45 mm y 613,5 mm, respectivamente), pero la distribución no fue pareja. Si se observa el mes de octubre, los días con lluvias se mantuvieron, pero los milímetros caídos fueron menores (Tabla 3.2, Figura 3.8). Si se compara noviembre de 2018 con los otros años de registro se verifica que las precipitaciones fueron hasta tres veces más abundantes y se dieron en la misma cantidad de días. Por otra parte, los meses invernales resultaron más fríos, con temperaturas promedio mínimas hasta tres grados más bajas que los años anteriores, registrándose incluso temperaturas bajo cero en el mes de agosto y un evento con temperaturas por debajo de 5°C en el mes de octubre (Tabla 3.2). A mitad de octubre se registraron temperaturas medias por debajo de 15°C por lo que podría inferirse que estas condiciones impactaron en las fases iniciales de la patogénesis, especialmente en la germinación de conidios.

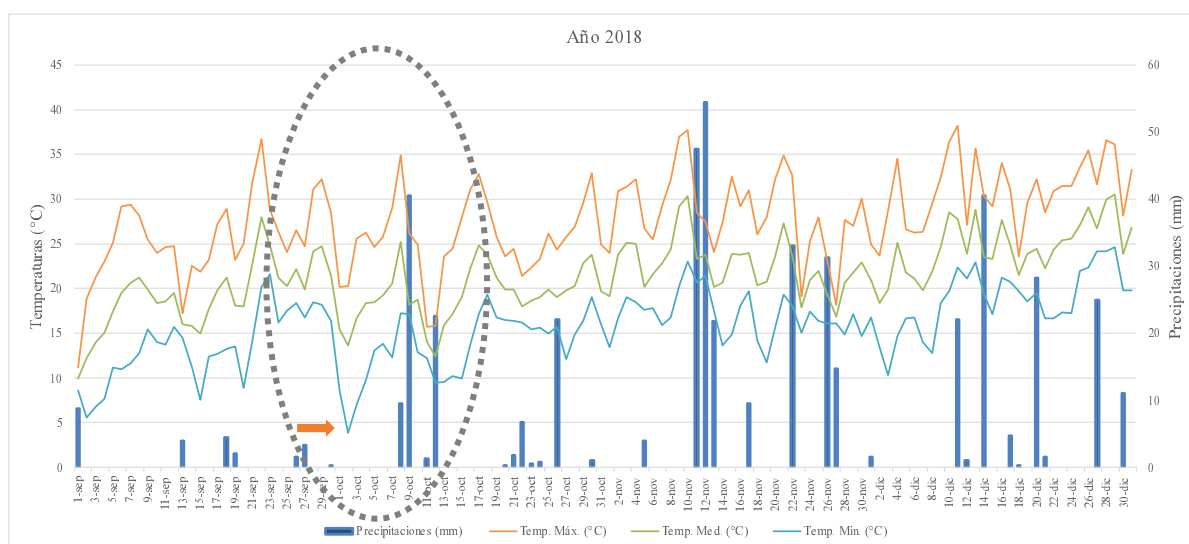


Figura 3.8. Precipitaciones diarias (mm) y temperaturas máximas, mínimas y medias (°C) desde cuajado de frutos hasta fecha próxima a cosecha de manzanos en el año 2018. Se indica con líneas de puntos las condiciones del ambiente que podrían haber impactado negativamente en las fases iniciales de la patogénesis.

En líneas generales los síntomas de *Colletotrichum siamense* afectando hojas comenzaron a observarse a mediados de la temporada de brotación (principios de octubre) con incidencia menor a 5% en los tres cultivares. La aparición de hojas con síntomas fue esporádica e irregular dentro del campo. Generalmente las lesiones aparecían concentradas en la parte baja de la planta, sin presentar un patrón de distribución regular. La enfermedad tuvo una evolución lenta y no epidémica. Las lesiones iniciales no superaron 1 cm de diámetro, eran irregulares y de

color marrón rojizo. La presencia más imponente de infecciones en hojas fue a consecuencia de *Marssonina coronaria*; este patógeno genera defoliación prematura en manzanos y amarilleo de las hojas (Fernandez *et al.*, 2020). Además, durante los tres años de este estudio, pero con menor presencia, se observaron lesiones foliares que iniciaban como manchas pequeñas, redondas y de color pardo oscuro que aumentan gradualmente de diámetro. Estas lesiones, en ocasiones, se unían volviéndose más oscuras y con borde rojizo, adquiriendo una apariencia de viruela, identificando al agente causal como *Alternaria* spp.

3.3.2 Caracterización de las primeras etapas del proceso infeccioso de *Colletotrichum siamense* en hojas y frutos de manzanos

Colletotrichum spp. utiliza distintas estrategias de infección en sus hospedantes. Durante este proceso se presentan las fases de adhesión, germinación, penetración, estado biotrofo y/o estado necrotrofo (Perfect, 1999). Los procesos de germinación y pre-infección de las estructuras de *C. siamense* fueron similares en la superficie de las hojas y en frutos de manzanos con bajos requerimientos de frío; encontrándose leves diferencias en los tiempos requeridos para iniciar la penetración. A continuación, se presentan los resultados obtenidos para cada órgano inoculado.

3.3.2.1 Mecanismo de Infección en hojas

Pre-infección

La penetración de *C. siamense* comenzó con la germinación de los conidios y la formación de estructuras especializadas llamadas apresorios. Este proceso se comprobó mediante uso de microscopía óptica y electrónica de transmisión. Al cabo de 12 hpi fue posible observar sobre las hojas inoculadas conidios germinados, tubos germinativos y apresorios en proceso de maduración (ya melanizados y con paredes gruesas) (Figura 3.9A). Los conidios de *C. siamense* no presentan septos, son unicelulares, pero iniciado el proceso de germinación son capaces de desarrollar un tabique central que los divide en dos células de aproximadamente el mismo tamaño. Al microscopio se pudo observar que los tubos germinativos emergían de uno o ambos extremos del conidio. Pocas veces fueron visibles apresorios sésiles, es decir, emergiendo directamente desde el conidio. Lo más frecuente fue observar apresorios naciendo desde el extremo o ramificaciones de los tubos germinativos, así un único conidio producía múltiples apresorios. La mayoría de ellos presentaban forma globosa u ovalada y unos pocos tenían forma irregular quedando delimitados del tubo germinativo por un septo. Estos apresorios rápidamente se melanizaban y al cabo de 12-24 hpi formaban el poro de luz (Figura 3.9B),

caracterizado como una mancha transparente rodeada por un anillo oscuro, lo que indica que el apresorio está maduro y ha comenzado el proceso de adhesión y germinación a la superficie de la hoja. Este poro de luz indica que esa zona del apresorio quedó desmelanizada porque se encuentra en contacto con la superficie del hospedante. Es para destacar que los tubos germinativos en ocasiones emitían ramificaciones y otras veces se anastomosaban a tubos germinativos que emergían de otros conidios (Figura 3.9C) lo que infiere un importante gasto energético por parte del patógeno. A las 24 hpi se observó la formación de la capa mucilaginosa sobre el apresorio en corte transversal mediante MET, indicando la adherencia del mismo a la superficie de la hoja para luego iniciar el proceso de penetración (Figura 3.9D).

Post-infección

Luego de 24-48 hpi se verificó que la colonización de *C. siamense* en hojas de manzano del cultivar 'Caricia' es intracelular-hemibiotrófica, ya que mediante imágenes de microscopio óptico y tinción por azul de trypan se observó la formación de vesículas de infección. A las 48 hpi algunos apresorios habían producido vesículas de infección en las células epidérmicas (Figura 3.9E) permaneciendo las células que rodean las vesículas de infección sin necrosis aparente, lo que sería compatible con el establecimiento de una interacción biotrófica. A las 72 hpi ya eran visibles hifas primarias y secundarias (Figura 3.9F). Estas hifas primarias se diferenciaban desde la vesícula de infección y eran robustas y bulbosas y en ocasiones con un tabique entre ellas. Las hifas primarias produjeron hifas secundarias, que crecieron desde la célula inicialmente colonizada hacia otras células epidérmicas adyacentes. En la región inoculada, las células epidérmicas estaban comenzando a cambiar de color y con presencia de hifas secundarias. Todas estas observaciones indicaron que *C. siamense* había desarrollado la fase necrotrófica. Finalmente, a las 96 hpi podían visualizarse las células ya colapsadas, necrosadas (Figura 3.9G) coincidiendo esto con el momento en que aparecen en las hojas los primeros síntomas.

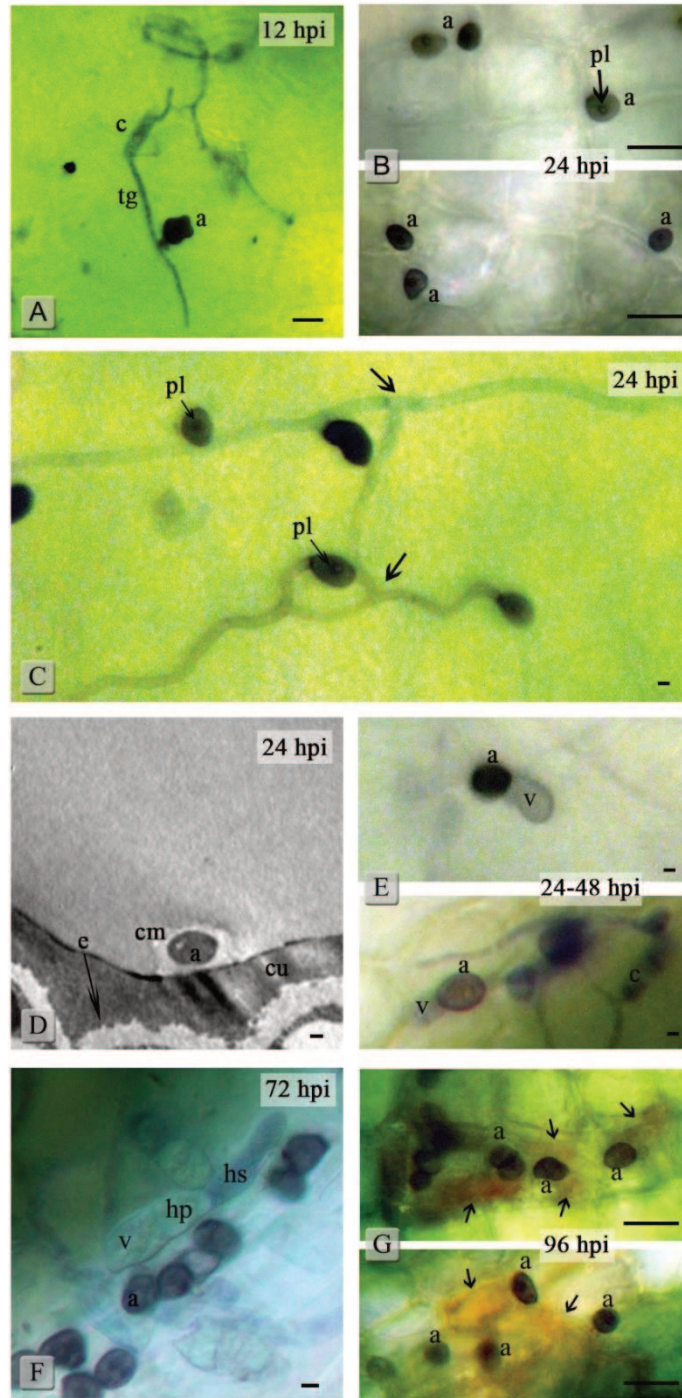


Figura 3.9 Proceso de pre-infección y post-infección de *C. siamense* en hojas de manzanos del cultivar ‘Caricia’. 12 horas post-inoculación (hpi): conidio con tubo germinativo y apresorio melanizado (A); 24 hpi: múltiples apresorios con presencia del poro de luz (B). Los apresorios se depositan justo por encima de las uniones de las células epidérmicas; Ramificaciones de tubos germinativos con producción de más de un apresorio y anastomosis (C), las flechas indican la unión de los tubos germinativos de diferentes conidios; en corte transversal se observa el apresorio cubierto por una capa mucilaginosa que lo protege y ayuda a fijarse al hospedante (D); 24-48 hpi: Vesícula de infección redondeada formada por el apresorio (E); 72 hpi: hifa primaria bulbosa producida por la vesícula de infección, separadas por un septo. Hifa secundaria que emerge de la hifa primaria y comienza a invadir las células de la hoja (F); 96 hpi: las flechas marcan múltiples células necrosadas con coloración

amarronada. Momento que coincide con la aparición de síntomas (G); c, conidio; tg, tubo germinativo; pl, poro de luz; a, apresorio; v, vesícula de infección; hp, hifa primaria; hs, hifa secundaria; cu, cutícula; e, epidermis; cm, capa mucilaginosa. Escalas: A-G-B: 10µm, C-D-E-F: 1µm

3.3.2.2 Mecanismo de Infección en frutos

Pre-infección

Mediante el uso de fotografías obtenidas de microscopio de luz, electrónico de barrido y transmisión, se observó la presencia de conidios no germinados y germinados, tubos germinativos y apresorios sobre la superficie de la cutícula de manzana. Al igual que en hojas, a las 12 hpi se observó la germinación de los conidios por medio de la presencia de un tabique que lo dividía en dos y formación de tubos germinativos (Figura 3.10A, B y C). En algunos casos fue posible observar apresorios melanizados. Entre las 12 y 24 hpi los apresorios habían desarrollado una secreción aglutinante o capa mucilaginosa que los ayuda a adherirse a la superficie de su hospedante (Figura 3.10D y E) y la prepara para luego iniciar el proceso de penetración.

Post-infección

A las 24-48 hpi los apresorios presentaban el poro de luz (Figura 3.10F) indicando el inicio de la penetración al tejido de la fruta. La primera evidencia de penetración fue la degradación de la capa de cera debajo de los apresorios (Figura 3.10G). Aquí puede observarse en la fotografía de MET un contraste en la densidad electrónica que estaría indicando las diferencias entre la capa sana y la degradada por el apresorio. En esta misma figura pueden visualizarse las tres capas que conforman al apresorio; la capa exterior de la pared celular del apresorio (3); la capa interna de la pared celular (2) y la capa formada entre la membrana celular y la capa interna de la pared (1), que es continua y da lugar al poro de penetración. A las 48 hpi fue posible observar el *peg* o clavija de penetración que perforó la capa de cera y comenzó a penetrar la cutícula (Figura 3.10G).

La estrategia de colonización de *C. siamense* en frutos de manzano correspondería a hemibiotrófica intracelular. A las 72 hpi, la clavija de penetración se dilató y se ensanchó en la punta formando la vesícula de infección esférica (Figura 3.10H). Aquí también fue posible observar degradación enzimática, por lo que podría inferirse que el patógeno, para penetrar las células del hospedante, combina la presión o turgencia del apresorio y enzimas que degradan la pared. A partir de las 120 hpi, en la superficie del fruto se pudo observar un entrelazado de hifas o tubos germinativos (Figura 3.10I) evidenciándose el ingreso del patógeno a la fruta y a las

144 hpi, en cortes transversales se visualizaba, inmerso en las células de la fruta, micelio a partir del cual se diferencian conidios (Figura 3.10J) coincidiendo esto con el momento en que aparecen los primeros síntomas en las frutas.

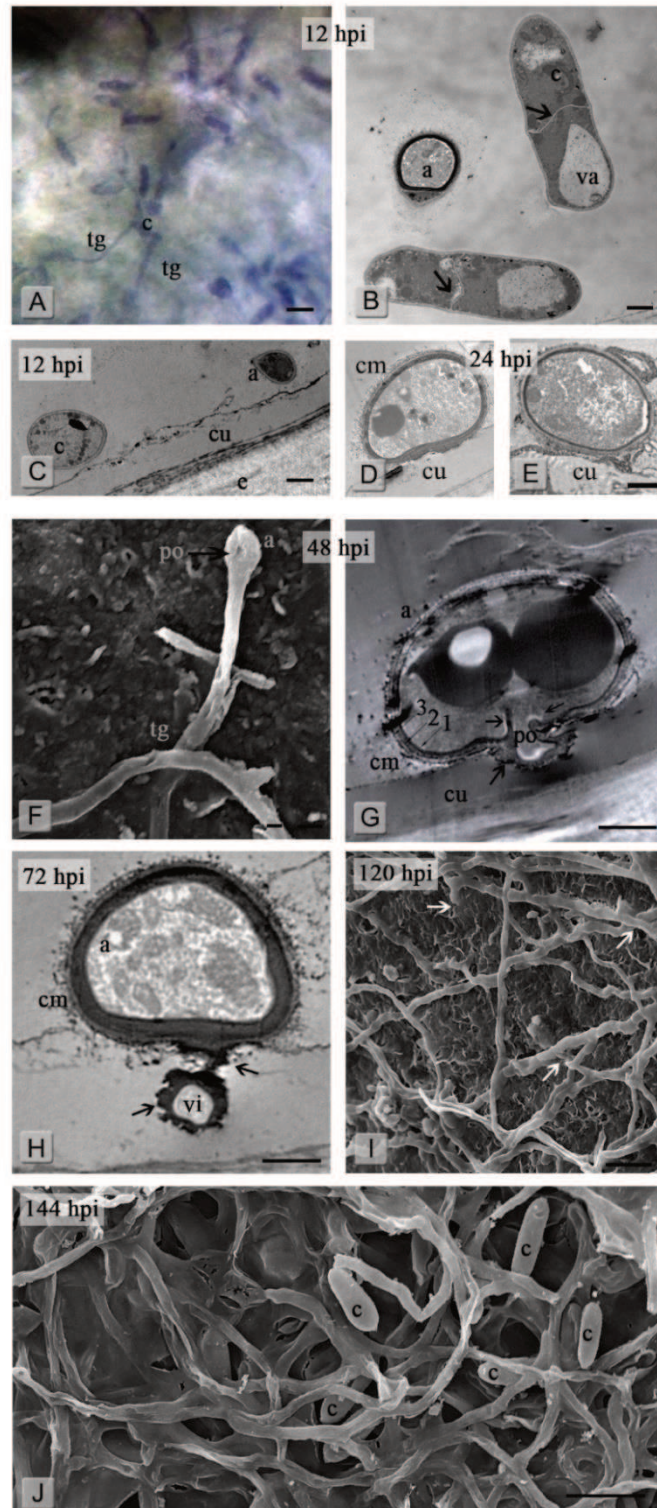


Figura 3.10. Proceso de pre-infección y post-infección de *C. siamense* en frutos de manzanos del cultivar ‘Caricia’. 12 horas post inoculación (hpi): vista en superficie de conidios germinados emitiendo por los extremos polares los tubos germinativos (A), en corte transversal; con presencia de tabique (indicados con flechas) y diferenciación de apresorios (B-

C); 24 hpi: apresorios cubiertos por la capa mucilaginosa, comenzando el proceso de adhesión a los tejidos del hospedante (D-E); 48 hpi: vista superficial y corte transversal de apresorio con poro de luz, germinado, emitiendo la clavija o *peg* de penetración para comenzar el proceso de penetración de la cutícula del fruto (F-G). En la figura G se muestran diferenciadas las tres capas que conforman al apresorio; 1, 2 y 3. Se marcan con flechas más gruesas, las invaginaciones que se forman en el interior del apresorio al emitirse o diferenciarse el *peg* de penetración. En el exterior, sobre la capa de cutícula, la flecha indica la presencia de degradación de esta capa; 72 hpi: la clavija de penetración ha roto la cutícula y comenzó a diferenciar la vesícula de infección redondeada entre la cutícula y la pared celular de la epidermis de la fruta (H). Puede notarse en tono más oscuro la degradación enzimática. 120 hpi: se observa en la superficie de la fruta un entramado de hifas o tubos germinativos (I), con flechas se marcan algunos de los sitios donde es notorio el ingreso del patógeno a la fruta; 144 hpi: presencia de hifas y conidios emitidos a partir de las mismas en el interior de las células de la fruta (J). c, conidio; tg, tubo germinativo; va, vacuola; a, apresorio; vi, vesícula de infección; e, epidermis; cu, cutina; cm, capa mucilaginosa; po, poro de germinación, clavija o *peg* de penetración. Escalas A-J-I: 10 μ m, B-C-E-F-H-G: 1 μ m.

3.4 DISCUSIÓN

Esta investigación permitió entender la epidemiología y patogénesis de *Colletotrichum siamense* como agente causal de PA y MF en plantaciones de manzanos con bajos requerimientos de frío del centro de la provincia de Santa Fe.

En zonas donde típicamente se cultiva manzana, el inóculo se reduce durante el invierno debido al frío extremo, mientras que en climas subtropicales los inviernos tienden a ser más templados, afectando menos la población de patógenos en los campos. Especialmente para cultivos de comportamiento fisiológico como los manzanos, el manejo de enfermedades en zonas cálidas puede ser difícil, ya que las condiciones favorables para el desarrollo de enfermedades y la presencia de tejido hospedante susceptible ocurre durante largos períodos (Ploetz, 2007; Gelain *et al.*, 2021).

Los resultados de sitios y estructuras de sobrevivencia de este trabajo determinaron que en plantaciones con bajos requerimientos de frío, *C. siamense* sobrevive como conidios, formando acérvulas, no habiéndose encontrado desarrollo de peritecios en estos sistemas productivos, teniendo implicancias directas en la menor variabilidad genética de la especie. Los sitios de sobrevivencia estuvieron restringidos a la parte aérea de la planta en hojas asintomáticas, pecíolos, frutos momificados, pedúnculos y ramas jóvenes. De estos sitios, las hojas y los frutos momificados fueron los de mayor importancia. En el suelo sólo fue posible la identificación en hojas recientemente caídas. En la zona de estudio, los inviernos son suaves y se registran eventuales situaciones o años con temperaturas por encima de las medias que se reflejan a campo con árboles de manzanos con brotaciones esporádicas y caída de hojas incompleta durante el reposo. Esta situación sería determinante para la sobrevivencia del patógeno, que

encontraría las condiciones para permanecer en estado de latencia sin necesidad de desarrollar su estado sexual, indicando que en los sistemas productivos de la región central de Santa Fe este estado no resulta relevante en el ciclo de la enfermedad.

Coincidiendo con parte de los resultados obtenidos, Børve & Stensvand (2017) determinaron la presencia de *C. acutatum* en hojas asintomáticas de manzanos del sur de Noruega, indicando a éstas como fuente importante de inóculo inicial para infecciones en frutos. En Nueva Zelanda, de acuerdo a Everett *et al.* (2018), esta misma especie sobrevive en hojas asintomáticas produciendo inóculo toda la temporada de crecimiento, siendo más frecuente en verano. Además, estos autores señalan a las yemas tanto fructíferas como vegetativas y las ramitas, junto a frutos y pétalos asintomáticos como una fuente de inóculo importante. Para el sur de Brasil, en plantaciones del cultivar ‘Gala’, Crusius *et al.* (2002) determinaron que la fuente de sobrevivencia más importante eran los frutos momificados, siguiéndole las hojas de la superficie del suelo, las yemas y las ramitas. Estos mismos autores afirman que sólo los aislados obtenidos de yemas y ramitas causan MFG, mientras que los aislados recuperados de las hojas y frutos momificados inducen síntomas de PA. En concordancia a los resultados de esta tesis, Martin *et al.* (2021) hallaron una mayor sobrevivencia de *Colletotrichum* en frutos momificados que permanecían en la planta respecto a frutos infectados caídos al suelo. De acuerdo a estos autores, en estos últimos la baja capacidad saprofítica de *Colletotrichum* resulta superada por la capacidad descomponedora de levaduras y bacterias saprofíticas presentes de forma natural en el suelo. En contraste, en estudios realizados en Uruguay no se encontró que los frutos momificados sean una fuente activa de esporas de *Colletotrichum* spp. reportándose sólo sobrevivencia en ramas y yemas fructíferas (Casanova *et al.*, 2016). Estos antecedentes demuestran que los sitios y estructuras de sobrevivencia de *Colletotrichum* están condicionados por la región, el comportamiento del hospedante y la especie presente.

A nivel regional las condiciones meteorológicas como la temperatura, las precipitaciones y la humedad tienen una marcada influencia en el inicio de una epidemia. Teniendo en cuenta los resultados de este capítulo se puede concluir que los síntomas de PA iniciaron durante dos años consecutivos en el mismo momento, cuando los frutos inmaduros tenían algo más de 50 mm de diámetro. Jones & Aldwinckle (2002) expresan que, si bien los frutos son susceptibles durante todas las fases de su desarrollo, lo más usual es encontrar infecciones desde que el fruto alcanza la mitad de su tamaño hasta la cosecha, momento en el cual las temperaturas comienzan a ser óptimas para la infección. En este sentido, en el Capítulo 1 se determinó que *C. siamense* es capaz de crecer en rangos de temperaturas que van de 20 a 35°C con un óptimo de 25°C. En la región central de Santa Fe, las infecciones en frutos comienzan a ser visibles en el campo

justamente cuando las temperaturas medias comienzan a estar por encima de 20°C en presencia de períodos lluviosos y humedad relativa por encima de 90%, en concordancia con los resultados obtenidos por Talamini & Bogo (2009). Las lluvias acompañadas de viento permiten el traslado de conidios ya sea por arrastre o por salpicado dentro de la misma planta o entre plantas, mientras que las condiciones de humedad elevada propician que las gotas de lluvia no se sequen rápidamente para que los conidios puedan germinar e ingresar al hospedante (Agrios, 2005; Restrepo Leal & Rada Gonzalez, 2017). Resulta interesante destacar que el año 2018 fue atípicamente más frío durante el invierno; y los primeros dos meses de la primavera (septiembre-octubre) resultaron con temperaturas por debajo de los registros de los años 2016 y 2017. Esto podría haber afectado la sobrevivencia de conidios y las condiciones para que se produzca la infección. En cuanto a precipitaciones, el mes de noviembre registró lluvias hasta tres veces más abundantes que los años anteriores, en la misma cantidad de días. Analizando el triángulo de la enfermedad, si se tiene en cuenta que los cultivares estudiados fueron los mismos y que los resultados de sitios y estructuras de sobrevivencia determinaron que el patógeno estaba presente; las condiciones ambientales habrían sido las determinantes para que la PA no haya evolucionado en el campo este año.

Por otro lado, en los estudios de crecimiento *in vitro* del Capítulo 1 se determinó que la tasa de desarrollo de *C. siamense* se reduce a la mitad con temperaturas de 35°C. En la región central de Santa Fe es común que se registren temperaturas por encima de estos valores en los meses estivales lo cual podría explicar porque las MF encontradas a campo no evolucionan durante el verano hacia la defoliación como la MFG. Además, los cultivares ‘Caricia’, ‘Eva’ y ‘Princesa’ se han comportado como resistentes a MFG en inoculaciones artificiales con bajas concentraciones de conidios de *C. gloeosporioides* (Furlan *et al.*, 2010)

En trabajos previos se ha demostrado que el cultivar de manzana tiene un efecto significativo sobre el crecimiento y esporulación de *Colletotrichum* spp. (Munir *et al.*, 2016; Grammen *et al.*, 2019; Nita *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2021a). Ante esto, resulta importante resaltar que si bien la enfermedad se registró a campo en los tres cultivares, el incremento de la incidencia siempre fue más rápido en el cultivar ‘Caricia’, resultando ‘Princesa’ el que tuvo menor porcentaje de desarrollo y ‘Eva’ con comportamiento intermedio. Estos resultados corroboran los obtenidos en las pruebas de susceptibilidad de cultivares del Capítulo 1.

Ante la relevancia que tienen las patologías causadas por *Colletotrichum* spp., comprender los patrones de estilo de vida y el estado dinámico de sus interacciones con sus hospedantes tiene implicancias para el control de enfermedades y para estudios adicionales que involucren el mecanismo de interacción molecular hospedante-patógeno (De Silva *et al.*, 2017).

Velho *et al.* (2016) han demostrado que, los aislados de *Colletotrichum fructicola* obtenidos de MFG y PA muestran diferencias en las estructuras de pre-infección cuando son inoculados en hojas de manzanos. Luego de que los conidios asociados a MFG entran en contacto con la superficie de la hoja rápidamente germinan para producir apresorios sésiles, mientras que aislados asociados a PA inoculados en hojas producen largos tubos germinativos lo que implicaría un gasto energético extra por parte del patógeno. Los autores atribuyen este comportamiento a la especificidad órgano-patógeno y lo vinculan con la falta de capacidad infectiva de los aislados de frutos en hojas. Los resultados de las inoculaciones en frutos y hojas de manzanos con bajos requerimientos de frío mostraron que los conidios germinan a las 12-24 hpi, produciendo tubos germinativos de largo variable que diferencian en la punta apresorios que rápidamente se melanizan. Esto, junto a los resultados de patogenicidad cruzada del Capítulo 1, no marcaría diferencias apreciables entre la capacidad de los aislados de *C. siamense* para infectar específicamente hoja o fruto. Esta falta de especificidad en los órganos de manzanos que afecta *C. siamense* sumado al hecho de que no existan diferencias en el proceso de infección de hojas y frutos podría ayudar a explicar porque los aislados caracterizados producen síntomas tanto en hojas (MF) como en frutos (PA) pero no producen MFG. Jiang *et al.* (2022) destacan la mayor capacidad de penetración y patogenicidad de los aislados de MFG frente a los de PA, dado que los primeros producen mayor cantidad de metabolitos secundarios, mayor secreción de enzimas extracelulares, una acumulación de melanina superior, e incremento de la expresión de genes asociados a la patogenicidad. Por otra parte, las infecciones ocasionadas por aislados de MFG en hojas fueron atribuidas a la disminución de la respuesta de defensa oxidativa de la planta (Velho *et al.*, 2016).

Por otro lado, en las inoculaciones realizadas en hojas fue posible observar la formación de anastomosis de tubos germinativos. Se ha propuesto que las cepas que forman tubos de anastomosis conidial posiblemente aumenten las probabilidades de sobrevivir más tiempo en la superficie de la hoja mientras comparten sus nutrientes. Además, la capacidad de anastomosis de los aislados jugaría un rol importante en la generación de variabilidad por reproducción parasexual (Gonçalves *et al.*, 2016).

Las observaciones microscópicas realizadas en este estudio revelaron que *C. siamense* utiliza la estrategia intracelular-hemibiotrófica para infectar hojas y frutos de manzanos con bajos requerimientos de frío, en coincidencia con los escasos estudios disponibles del patosistema *Colletotrichum* spp.-manzano (Velho *et al.*, 2016, Shang *et al.*, 2020). Esto se confirmó por la presencia de vesículas de infección a las 24-48 horas en hojas y 72 horas en frutos además de la ausencia de necrosis aparente en las células. Esto, en coincidencia con los resultados

obtenidos en el Capítulo 1, se asociaría a la aparición más temprana de síntomas en hoja que en fruto.

Si bien existen numerosos trabajos que han mostrado el proceso de infección de *Colletotrichum* spp. en diferentes hospedantes como arándano, maíz, almendro, guayaba, hojas de manzano, entre otros, utilizando microscopía óptica tradicional, electrónica y de barrido (Arroyo *et al.*, 2005; Diéguez-Uribeondo *et al.*, 2005; Moraes, 2013; Shang *et al.*, 2020), no se conocen estudios integrales para el patosistema *Colletotrichum*-fruto de manzano. Por este motivo, los resultados obtenidos constituyen un aporte significativo para el entendimiento inicial de esta interacción.

Los antecedentes bibliográficos demuestran que la epidemiología de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* en manzanos están condicionadas por la región, el hospedante y la especie presente. Ante esto, los avances obtenidos en este capítulo resultan relevantes para la región, ya que los estudios epidemiológicos, de sobrevivencia y de los procesos infectivos para el sistema *C. siamense*-manzanos con bajos requerimientos de frío constituyen las bases para el desarrollo de estrategias de manejo de las enfermedades presentes. Sin embargo, se necesitan más estudios epidemiológicos para precisar los factores ambientales requeridos para el desarrollo de PA y MF, de manera de poder predecir y explicar la presencia de estas enfermedades en el campo.

4. Capítulo 3

Sensibilidad a fungicidas *in vitro* de aislados de *Colletotrichum siamense* causantes de podredumbre amarga y manchas foliares en manzano

4.1 INTRODUCCIÓN

4.1.1 Manejo de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* en manzanos

La podredumbre amarga (PA) del manzano ocasionada por especies del género *Colletotrichum* genera importantes pérdidas de frutos durante el verano en el campo y en la postcosecha, especialmente en regiones de clima cálido y húmedo (Peres, 2005; Nekoduka *et al.*, 2017). El manejo de esta enfermedad se realiza integrando diferentes medidas de control en un sistema de manejo integrado (MI) (Scatoni *et al.*, 2005; Dowling *et al.*, 2020). Estos sistemas priorizan el uso de medidas de control cultural como la eliminación de los frutos momificados de las copas de los árboles y de la madera muerta (Casanova *et al.*, 2015, Aćimović *et al.*, 2020; Martin *et al.*, 2022), la poda y conducción de los árboles procurando una mejor ventilación y una fertilización balanceada evitando excesos de nitrógeno (Dowling *et al.*, 2020). Los sistemas de MI también priorizan el uso de cultivares resistentes o tolerantes a las enfermedades, sin embargo, los principales cultivares de manzano utilizados son susceptibles a las enfermedades ocasionadas por *Colletotrichum* spp. Todas estas medidas son insuficientes por lo que el uso de fungicidas juega un rol importante en el manejo de la PA (Jones & Aldwinckle, 2002; Denardi *et al.*, 2003; Alaniz *et al.*, 2014, Aćimović *et al.*, 2020). Por otra parte, las diferentes especies de *Colletotrichum* difieren en su agresividad, en su sensibilidad a fungicidas, así como en los requerimientos de temperaturas y muy probablemente en los mecanismos a través de los cuales desarrollan resistencia a fungicidas (Velho *et al.*, 2014; Munir *et al.*, 2016; Aćimović *et al.*, 2020).

4.1.1.2 Control químico

En las principales zonas productoras de manzana del mundo donde ocurren veranos cálidos y húmedos, parte del control de la PA se basa en la aplicación de fungicidas de diferentes modos de acción. Esto incluye fungicidas con múltiples sitios de acción como los ditiocarbamatos y las ftalamidas, y fungicidas de sitios de acción específico, como los pertenecientes a los grupos MBC (del inglés *Methyl Benzimidazole Carbamate*), QoI (del inglés *Quinone outside Inhibitor*) y DMI o SBI (del inglés *DeMethylation Inhibitors* o *Sterol Biosynthesis Inhibiting*, respectivamente) (Munir *et al.*, 2016; Carraro *et al.*, 2020; Aćimović *et al.*, 2020).

Diferentes autores han demostrado que la sensibilidad a fungicidas varía dependiendo de las especies de *Colletotrichum* presentes en una determinada región. Así, Hu *et al.* (2015) encontraron aislados de *C. siamense* resistentes a fungicidas QoI mientras que los aislados de *C. fructicola* se mostraron sensibles. Por el contrario, en Japón, aislados de *C. fructicola* causantes de PA presentaron resistencia a los fungicidas QoI y MBC, mientras que todos los

aislados de *C. siamense* evaluados se mostraron sensibles (Yokosawa *et al.*, 2017). También se ha demostrado que, dentro de una misma especie, se pueden encontrar diferencias en cuanto a la sensibilidad a distintos fungicidas. Así es que, dentro de *C. siamense*, se han encontrado poblaciones de aislados resistentes a los fungicidas QoI, y otras poblaciones resistentes a los fungicidas MBC (Hu *et al.*, 2015).

Una de las razones que explican las diferencias en la sensibilidad a un mismo fungicida entre distintas poblaciones de *Colletotrichum* es la historia de uso del fungicida. El comité de acción para la resistencia a fungicidas (FRAC, del inglés: *fungicide resistance action committee*) ha clasificado los fungicidas de acuerdo con el modo de acción y el riesgo a generar resistencia. Así, los principios activos sitio específicos son más propensos al desarrollo de resistencia o pérdida de la sensibilidad (Reis & Carmona, 2012). Cuando se utiliza un fungicida de sitio de acción específico en forma reiterada sin seguir una estrategia anti-resistencia se ejerce una presión de selección en la población del patógeno en favor de los individuos resistentes, de modo que cuando éstos predominan, el fungicida deja de ser efectivo.

Recientemente se ha comunicado la existencia de aislados de *Colletotrichum* de manzanos y de otros cultivos con resistencia a los fungicidas QoI (Forcelini *et al.*, 2016; Munir *et al.*, 2016; Aćimović *et al.*, 2020; Dowling *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2020). Específicamente, se han encontrado aislados de *C. siamense*, obtenidos de manzanos, resistentes tanto a fungicidas QoI como a los MBC (Chechi *et al.*, 2019; Martin *et al.*, 2021b).

Para poder detectar la presencia de cepas de patógenos resistentes resulta indispensable estudiar la sensibilidad a fungicidas en la población de patógenos. El monitoreo de la presencia de aislados resistentes constituye una información relevante si se desea mantener la eficiencia del fungicida en el tiempo (Carmona & Reis, 2013). Por lo tanto, es imperioso determinar la sensibilidad a fungicidas de los aislados de *Colletotrichum* presentes en cada región productora con el fin de incorporar esa información en el diseño de estrategias de MI que incluyan el uso de fungicidas.

La fungitoxicidad de una sustancia química y la sensibilidad de un hongo a un principio activo *in vitro* se miden mediante la concentración efectiva 50 (CE50) (concentración que inhibe el 50% del crecimiento micelial o germinación de esporas). Para determinar la CE50 se hace crecer al hongo en un set de concentraciones crecientes del fungicida incorporado al medio de cultivo. Si comparamos dos fungicidas, el que tenga la menor CE50 es el que tiene mayor poder fungitóxico. Por lo tanto, se requerirá una menor concentración de la sustancia activa para lograr la misma inhibición del patógeno (Reis, *et al.*, 2010; Tonin, *et al.*, 2013). Desde otro punto de

vista, si queremos comparar la sensibilidad de diferentes aislados fúngicos a un determinado fungicida, el que tenga menor CE50 será el más sensible.

4.1.1.3 Características de los principales fungicidas registrados en Argentina para el control de *Colletotrichum* spp.

Los fungicidas son un componente fundamental del MI para controlar la PA del manzano (Chechi *et al.*, 2019). En Argentina, existen 33 principios activos con actividad fungicida registrados para su uso en el cultivo del manzano (Tabla 4.1). Específicamente para el control de *Colletotrichum* spp. se encuentran registrados captan y folpet, dos principios activos de múltiples sitios de acción, pertenecientes al grupo de las ftalamidas (CASAFE, 2022; De Rossi *et al.*, 2021; <https://aps2.senasa.gov.ar/vademecum/app/publico>).

Tabla 4.1 Fungicidas registrados en Argentina para su uso en el cultivo de manzanos. Para cada uno se indica, el grupo químico, tipo de acción y riesgo de resistencia según FRAC

Grupo químico	Principio activo	Acción	Riesgo de resistencia
Inorgánico	azufre	1	Bajo
Bencimidazoles	benomilo	3	Alto
Ftalamida	captan	1	Bajo
Bencimidazoles	carbendazim	3	Alto
Triazol	difenoconazol	2	Medio
Quinona	ditianon	1	Bajo
Triazol	fenarimol	2	Medio
Triazol	fenbuconazol	2	Medio
Triazol	flutriafol	2	Medio
Triazol	flusilazol	2	Medio
Ftalamida	folpet	1	Bajo
Fosfonato de aluminio	fosetil aluminio	No conocido	Bajo
Imidazol	imazalil	5	Medio
Dicarboximida	iprodione	6	Medio-Alto
Triazol	hexaconazol	2	Medio
Estrobilurina	kresoxim - metil	4	Alto
Ditiocarbamato	mancozeb	1	Bajo
Bencimidazoles	metil-tiofanato	3	Alto
Triazol	miclobutanil	2	Medio
Inorgánico	oxicloruro de cobre	1	Bajo
Triazol	penconazol	2	Medio
Inorgánico	polisulfuro de calcio	1	Bajo
Ditiocarbamato	propineb	1	Bajo
Triazol	tebuconazol	2	Medio
Triazol + Estrobilurina	tebuconazol + trifloxistrobin	4	Medio-Alto
Bencimidazoles	tiabendazol	3	Alto
Bencimidazoles	tiofanato metil	3	Alto

Dimetilditiocarbamato	tiram	1	Bajo
Triazol	triadimefon	2	Medio
Estrobilurina	trifloxistrobin	4	Alto
Triazol	triforine	2	Medio
Ditiocarbamato	zineb	1	Bajo
Dimetilditiocarbamato	ziram	1	Bajo

1: Multisitio; 2: Biosíntesis de esteroides en la membrana /Inhibición de la desmetilación; 3: Mitosis y división celular; 4: Respiración/Resistencia y acción tipo estrobilurina; 5: Inhibición de la demetilación; 6: Transducción de señales

Con base en los antecedentes de uso de fungicidas para controlar PA en otras partes del mundo y considerando solo aquellos productos registrados en Argentina para *Colletotrichum* spp. se seleccionaron diferentes principios activos que podrían ser efectivos frente a *Colletotrichum siamense*. (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Fungicidas registrados para el control de *Colletotrichum* spp. en diferentes cultivos y seleccionados para evaluar su efectividad *in vitro* en el control de *C. siamense*

Grupo químico	Principio activo	Formulación *	Uso recomendado **
Metilditiocarbamato	ziram	760 g kg ⁻¹ GD	Cucurbitáceas/Arándanos/Tomate/Cítricos
Ditiocarbamato	mancozeb	800 g kg ⁻¹ PM	Cítricos/ Poroto/Tomate
Ftalamida	captan	370 g L ⁻¹ SC	Manzana/Pera
Triazoles	difenoconazol	250 g L ⁻¹ CE	Soja
	tebuconazol	430 g L ⁻¹ SC	Soja
Bencimidazoles	benomilo	500 g kg ⁻¹ PM	Frutilla/Cucurbitáceas/Poroto/Cítricos
	carbendazim	500 g L ⁻¹ SC	Cucurbitáceas/Poroto/Arveja/Soja/Palta
Estrobilurinas	azoxistrobin	250 g L ⁻¹ SC	Banano/Soja
	pyraclostrobin	250 g L ⁻¹ CE	No registrado para <i>Colletotrichum</i>

* SC: suspensión concentrada, GD: gránulos dispersables, PM: Polvo mojable, CE: Concentrado emulsionable; ** Para *Colletotrichum*, según registro en SENASA y CASAFE

A continuación, se describen algunas de las principales características de esos fungicidas.

Captan

Pertenece al grupo químico de las ftalamidas (*Multisitio*; FRAC M4). Es un fungicida de contacto y de múltiples sitios de acción. Desnaturaliza proteínas fúngicas que contienen grupos

tioles (grupos -SH). Interfiere en el mecanismo de respiración de los hongos por lo que inhibe la geminación de las esporas y dificulta el crecimiento y desarrollo micelial (Arregui & Puricelli, 2008; FRAC 2017). Aplicado sobre las plantas funciona como una barrera para prevenir las infecciones al evitar la germinación de los conidios. En Argentina está registrado para el control de la PA en manzana (CASAFE, 2022).

Ziram

Pertenece al grupo químico de los dimetilditiocarbamatos (FRAC M3). Es un fungicida de contacto y de múltiples sitios de acción (Arregui & Puricelli, 2008; FRAC 2017). Está registrado para el control de *C. acutatum* en arándanos, *C. gloeosporioides* en citrus y para otras especies de *Colletotrichum* que causan antracnosis tanto en cucurbitáceas como en tomate. En manzanos está registrado para el control de *Venturia inaequalis* (CASAFE, 2022).

Mancozeb

Es un fungicida que pertenece al grupo de los etilen-bis-ditiocarbamatos (FRAC M3). Se trata de un fungicida de contacto, y de múltiples sitios de acción que es utilizado en estrategias preventivas. Interfiere con las enzimas al reaccionar con los grupos sulfhídricos, interrumpiendo varios procesos bioquímicos dentro del citoplasma de las células fúngicas y las mitocondrias. Es un fungicida que presenta bajo riesgo de resistencia (Arregui & Puricelli, 2008; FRAC 2017). Mancozeb está registrado en Argentina para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en cítricos, *C. lindemuthianum* en poroto y *C. phomoides* en tomate. En manzanos sólo está registrado para el control de *Venturia inaequalis*. (CASAFE, 2022)

Difenoconazol y tebuconazol

Ambos, son fungicidas inhibidores de la desmetilación o de la biosíntesis del ergosterol (FRAC DMI) de la membrana celular. Pertenecen al grupo químico de los triazoles. Actúan en un sitio específico en el proceso de síntesis de este compuesto deteniendo el desarrollo del hongo. Estos productos penetran a la planta y tienen una sistemía localizada (locosistemía). Al penetrar a la planta pueden ser utilizados en estrategias curativas (aplicaciones post-infección). Una de las principales limitantes de los fungicidas pertenecientes a este grupo es el alto riesgo de generar resistencia (Arregui & Puricelli, 2008; FRAC 2017). Ambos fungicidas están registrados en Argentina para su uso en manzanos en el control de *Venturia inaequalis* (CASAFE, 2022)

Benomilo y carbendazim

Pertenecen al grupo de los benzimidazoles (FRAC MBC) actuando como inhibidores de la β -tubulina y consecuentemente de la mitosis o división celular. Ambos son fungicidas sistémicos por lo que pueden ser utilizados en estrategias tanto preventivas como con acción curativa, controlando a los hongos patógenos antes de su penetración en las plantas o bien cuando la infección recién se ha producido. El benomilo es rápidamente degradado a carbendazim (Arregui & Puricelli, 2008). El grupo de los benzimidazoles es considerado de alto riesgo de resistencia (FRAC, 2017). Benomilo está registrado para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en cítricos, *C. lagenarium* en cucurbitáceas, *C. fragariae* en frutilla y *C. lindemuthianum* en poroto. En manzanos está registrado para el control de *Venturia inaequalis*, *Podosphaera leucotricha*, *Penicillium expansum*, *Botrytis* spp., *Diplodia* spp., *Monilia* spp., *Phomopsis* spp. y *Gloeosporium* spp.

Pyraclostrobin y azoxistrobin

Pertenecen al grupo químico de las estrobilurinas (FRAC QoI). Son fungicidas con sitio de acción específico. Tienen efecto sobre la respiración de los hongos obstruyendo la transferencia de electrones en la mitocondria celular, dañando severamente su desarrollo. Son fungicidas de contacto con alta afinidad por las ceras cuticulares en hojas y frutos, lo que les confiere alta resistencia al lavado por la lluvia. Sobre la superficie de las plantas, su principal modo de acción es la inhibición de la germinación de los conidios y extensión del tubo germinativo. Tienen alto riesgo de generar resistencia en las poblaciones de patógenos por lo que su uso generalmente se limita a una o muy pocas aplicaciones en la temporada (Arregui & Puricelli, 2008; FRAC 2017). Tienen amplio espectro de acción. Pyraclostrobin no se encuentra registrado para control de *Colletotrichum* en ningún cultivo. Por el contrario, azoxistrobin, está registrado para el control de *Colletotrichum musae* en cultivo de banano y para *C. truncatum* en cultivo de soja. No está registrado en Argentina para su uso en manzanos (CASAFE, 2022).

Los manzanos con bajos requerimientos de frío de la zona central de Santa Fe se ven fuertemente afectados por *C. siamense*, agente causal de síntomas de PA. El manejo eficiente de esta enfermedad requiere de la integración de las diferentes medidas de manejo disponibles, entre las que se encuentra el control químico mediante fungicidas. Para esto es necesario generar conocimientos que permitan racionalizar el uso de fungicidas. Con esta finalidad, en este trabajo se propuso evaluar *in vitro* la sensibilidad de una colección de aislados de *C. siamense* a diferentes fungicidas.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 12 aislados monospóricos de *Colletotrichum siamense* provenientes de hojas y frutos afectados (tres de hoja y nueve de fruto) cuya identificación y patogenicidad fue demostrada en trabajos previos en base a características morfológicas, moleculares y procedencia u origen. Los mismos se sembraron en medio de cultivo agar papa dextrosa (APD) y se incubaron a 25°C durante siete días. Por otro lado, se escogieron nueve fungicidas de síntesis entre los que poseen registro para su uso en manzanos o bien que hubiesen sido evaluados por otros investigadores con resultados positivos en el control de diferentes especies de *Colletotrichum*. Los fungicidas comerciales utilizados fueron ziram: ziram granulfo de Agri Star S.A (gránulos dispersables, 760g.Kg⁻¹ de ingrediente activo); mancozeb: nufarm mancozeb 80 de Nufarm S.A (polvo mojable, 800g.Kg⁻¹ de ingrediente activo); captan: ando flo de S. Ando y Cía S.A (suspensión concentrada, 370g.L⁻¹ de ingrediente activo); difenoconazol: escozate de Tafirel compañía de agroquímicos (concentrado emulsionable, 250g.L⁻¹ de ingrediente activo); tebuconazol: mamboretá foli de Aripa S.R.L (suspensión concentrada, 430g.L⁻¹ de ingrediente activo); benomilo: superlate de Agroregional S.R.L (polvo mojable, 500g.Kg⁻¹ de ingrediente activo); carbendazin: bencarb-L de SAUDU (suspensión concentrada, 500g.L⁻¹ de ingrediente activo), azoxistrobin: sumles de ROTAM de Argentina Agroquímica S.R.L. (suspensión concentrada, 250g.L⁻¹ de ingrediente activo) y pyraclostrobin: comet de BASF Argentina S.A (concentrado emulsionable, 250g.L⁻¹ de ingrediente activo).

4.2.1 Evaluación *in vitro* por inhibición del crecimiento micelial

Para determinar la sensibilidad de los aislados a los diferentes principios activos se determinó la CE50 de cada fungicida. La determinación de la CE50 se realizó midiendo el porcentaje de crecimiento micelial relativo en un set de concentraciones. El medio de cultivo se esterilizó y se mantuvo en estufa termostaticada a 55°C. Antes de distribuirlo en las placas de Petri se le incorporó la cantidad necesaria de cada fungicida para obtener la concentración final deseada. Las concentraciones evaluadas fueron 0 (control); 0,1; 1; 10 y 100 ppm.

De las colonias previamente crecidas durante 6 días en APD, se cortaron discos de agar de 5 mm de diámetro de la zona de avance de crecimiento activo. Cada disco se depositó en el centro de cada placa enmendada con cada una de las concentraciones del principio activo a evaluar. Se realizaron tres repeticiones por cada concentración de cada fungicida evaluado. El control fueron los aislados creciendo en medio de cultivo APD sin agregado de fungicida. Todas las placas del ensayo se incubaron a 25°C durante 6 días; tiempo durante el cual el testigo de cada aislado ocupó más del 70% de la caja de Petri. Posteriormente, se procedió a registrar mediante

calibre digital el crecimiento micelial de cada aislado, a cada concentración. Se midieron dos diámetros perpendiculares por cada colonia, restando el tamaño del disco de agar sembrado inicialmente. El crecimiento micelial de cada aislado a cada concentración se determinó como el promedio del diámetro de las colonias de las tres repeticiones. El porcentaje de crecimiento relativo se calculó como la relación entre el crecimiento micelial en el medio con fungicida y el crecimiento micelial en el control (0 ppm) por 100: $((\text{crecimiento control} - \text{crecimiento tratamiento}) / \text{crecimiento control}) \times 100$.

Para determinar la CE50 para cada principio activo, a los datos de porcentaje de crecimiento relativo se le aplicó la transformación Probit; mientras que, a los valores de concentración de producto utilizados, se les aplicó la transformación logaritmo decimal. Con estos datos se obtuvieron rectas de regresión lineal con su ecuación correspondiente y valor de R^2 . A partir de estas ecuaciones se estimó la CE50 como aquel valor de la concentración del principio activo que causa el 50% en la inhibición del crecimiento micelial.

4.3 RESULTADOS

Los aislados de *Colletotrichum siamense* mostraron diferente sensibilidad a los fungicidas evaluados. Las concentraciones efectivas 50 (CE50) de cada uno de los 9 principios activos fungicidas evaluados para cada aislado se presentan en la Tabla 4.3. Los efectos sobre el crecimiento de las colonias se muestran en la Figura 4.1.

Los aislados mostraron baja o nula sensibilidad a los fungicidas de contacto multisitio, siendo el ziram el único que logró algún grado de inhibición. La CE50 promedio de ziram fue de 62,3 ppm, con una CE50 mínima de 2,68 ppm y una CE50 máxima de 98,59 ppm. Sólo dos aislados; H8 y E10, se mostraron sensibles con CE50 de 2,68 y 9,68 ppm respectivamente, mientras que las CE50 del resto de los aislados estuvo en un rango de 28,3 a 98,59 ppm. Respecto a captan y mancozeb todos los aislados de *C. siamense*, se mostraron insensibles (CE50 >100ppm).

Por otra parte, los aislados presentaron una sensibilidad variable a tebuconazol con una CE50 promedio de 0,46 ppm, una CE50 mínima de 0,08 ppm y una CE50 máxima de 1,21 ppm. Un comportamiento similar se obtuvo frente a difenoconazol donde la CE50 promedio fue de 0,192 ppm con una CE50 mínima de 0,013 ppm y una CE50 máxima de 1,18 ppm.

En cuanto a los fungicidas del grupo de los benzimidazoles, los aislados de *C. siamense* se comportaron como sensibles a ambos principios activos. Para carbendazim, la CE50 promedio fue de 0,00027 ppm con una CE50 mínima de $2,6 \times 10^{-10}$ ppm y una CE50 máxima de 0,0012 ppm mientras que, para benomilo la CE50 promedio fue de 0,0109 ppm, con una CE50 mínima de 0,00027 ppm y una CE50 máxima de 0,04 ppm.

Finalmente, los aislados se mostraron insensibles a azoxistrobin, con valores de CE50 superiores a 62,42 ppm y con la mayoría de los aislados con CE50 >100 ppm. En tanto que frente a pyraclostrobin la CE50 promedio fue de 2,819 ppm con una CE50 mínima de 0,06 ppm y una CE50 máxima de 7,29 ppm.

Tabla 4.3 Concentración efectiva 50 (CE50) de los 9 principios activos evaluados en la inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum siamense*, agente causal de podredumbre amarga y manchas foliares

Aislado	CE50 (ppm)								
	zir	man	cap	teb	dif	ben	car	pyr	azo
E10	9,68	>100	>100	0,203	0,051	0,0003	0,00000000026	0,120	92,72
E16	98,59	>100	>100	0,081	0,058	0,0385	0,00000002408	5,815	>100
E17	28,30	>100	>100	0,295	0,013	0,0054	0,00002270617	1,961	>100
E22	97,71	>100	>100	0,771	1,175	0,0212	0,00054191690	5,214	>100
E24	72,65	>100	>100	1,206	0,231	0,0014	0,00040349851	3,698	>100
H1	87,66	>100	>100	0,420	0,142	0,0003	0,00000004873	7,291	>100
H8	2,68	>100	>100	0,231	0,042	0,0098	0,00083944485	2,871	>100
H11	96,67	>100	>100	0,397	0,069	0,0150	0,00000161540	0,252	>100
A3	34,16	>100	>100	0,652	0,098	0,0162	0,00123528299	0,543	>100
A5	56,47	>100	>100	0,220	0,043	0,0097	0,00000434678	4,794	>100
E28	62,63	>100	>100	0,729	0,347	0,0022	0,00000008262	1,214	>100
E29	97,22	>100	>100	0,258	0,028	0,0107	0,00020497928	0,060	62,41

ziram: zir; mancozeb: man; captan: cap; tebuconazole: teb; difenoconazole: dif; benomilo: ben; carbendazim: car; pyraclostrobin: pyr; azoxistrobin: azo

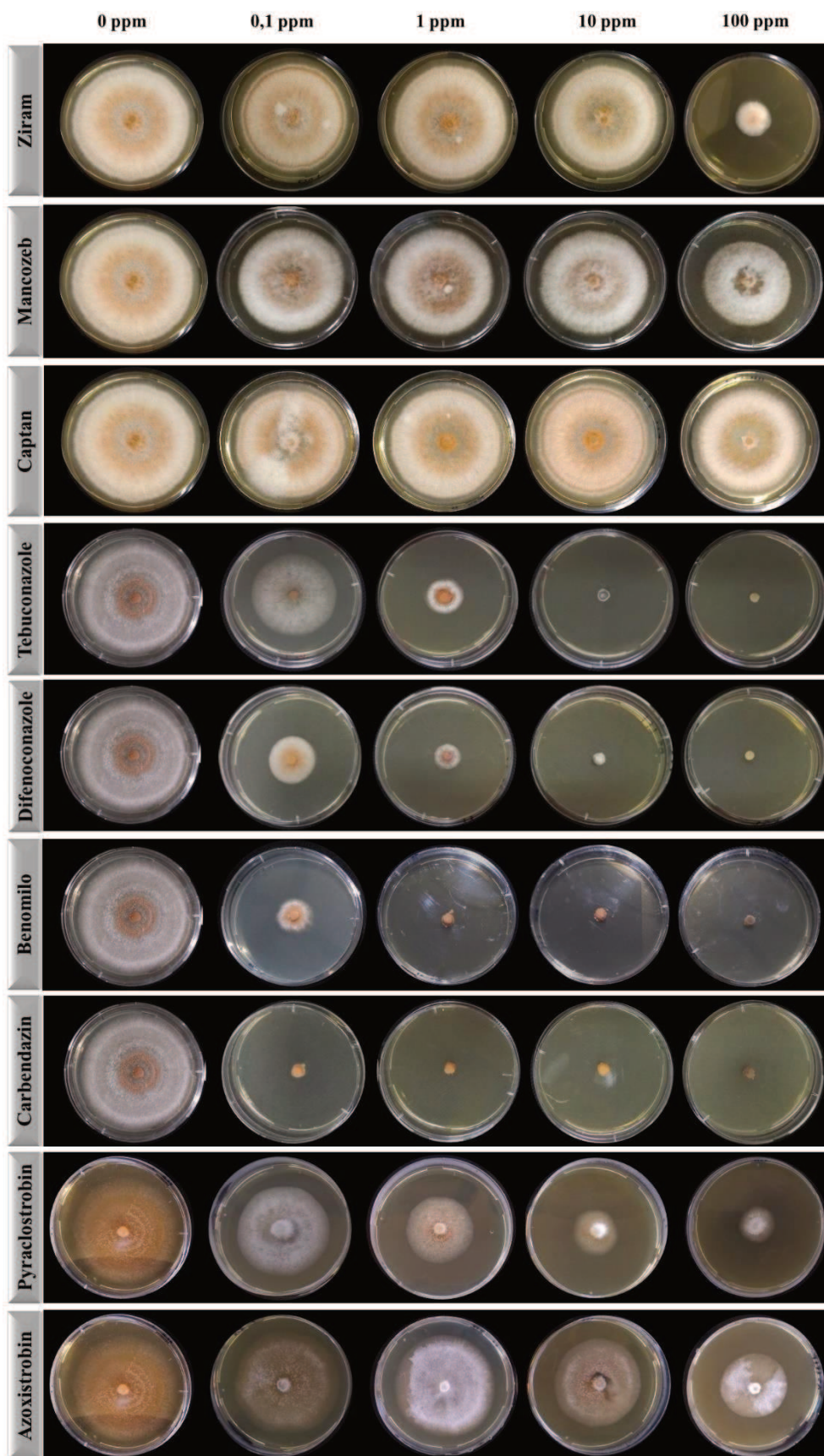


Figura 4.1. Desarrollo de colonias de *Colletotrichum siamense* (aislado A5) luego de 6 días de crecimiento en medio de cultivo APD enmendado con diferentes concentraciones (0-

control; 0,1; 1; 10 y 100ppm) de los distintos principios activos (ziram, mancozeb, captan, tebuconazole, difenoconazole, benomilo, carbendazim, pyraclostrobin y azoxistrobin).

4.4 DISCUSIÓN

Los fungicidas son un componente esencial para el manejo integrado de la PA del manzano. Para hacer un uso racional de los mismos es necesario conocer la sensibilidad de la población del patógeno a los principios activos disponibles para su control. Hasta lo que conocemos este es el primer trabajo realizado en Argentina donde se evalúa la sensibilidad de la población de *C. siamense*, causante de la PA y MF en cultivares de manzanos con bajos requerimientos de frío, a fungicidas de síntesis.

La sensibilidad de un grupo representativo de aislados monospóricos de *C. siamense* a fungicidas de diferentes grupos químicos fue evaluada mediante determinación de la CE50 en ensayos de laboratorio. Los aislados se mostraron totalmente resistentes a los fungicidas mancozeb y captan y altamente resistentes a ziram, todos ellos fungicidas de contacto. En coincidencia con los resultados obtenidos para mancozeb, estudios realizados en Brasil con aislados de *C. nymphaeae* y *C. paranaense* provenientes de plantas de manzanos de los cultivares ‘Gala’ y ‘Eva’ mostraron muy bajos niveles de sensibilidad a este mismo principio activo. La CE50 varió de 368,5 a >1600 ppm cuando se evaluó inhibición del crecimiento micelial (Moreira *et al.*, 2019b). A su vez, los resultados obtenidos para captan son coincidentes con el estudio realizado por Munir *et al.* (2016) en diferentes aislados de manzanos donde se incluía *C. siamense*. Por otra parte, evaluaciones realizadas con tres especies de *Colletotrichum* causantes de PA en Uruguay determinaron *in vitro* que *C. gloeosporioides* y *C. fragariae* inhibieron su crecimiento micelial frente a CE50 de 13,9 ppm y 18,6 ppm de captan mientras que los aislados de *C. acutatum* fueron insensibles con CE50 >100 ppm (Damasco Capece, 2011).

La resistencia a estos fungicidas de contacto no puede ser atribuida a la historia de uso ya que todos son de múltiples sitios de acción y de bajo o nulo riesgo de generar resistencia. Los resultados obtenidos muestran que *C. siamense* no está dentro del espectro de acción de estos fungicidas. Estos resultados dejan en evidencia una dificultad importante en el manejo de la PA debido a que los fungicidas de contacto y de múltiple sitio de acción son los adecuados para utilizar en estrategias preventivas de manejo de las enfermedades, por su bajo riesgo de generar resistencia.

Respecto a los triazoles, los aislados de *C. siamense* mostraron sensibilidad variable a ambos principios activos. Para tebuconazol, la CE50 promedio fue de 0,46 ppm con una CE50 mínima

de 0,08 ppm y una CE50 máxima de 1,21 ppm. Recientemente, Zhang *et al.* (2020) calificaron como sensibles a aislados de *C. siamense* con una CE50 promedio de 8,88 ppm, valor muy por encima de la CE50 máxima obtenida para nuestros aislados. Sin embargo, en otro trabajo reciente, Chen *et al.* (2022) en Fujian, provincia de China, analizando la sensibilidad de aislados de *C. siamense* a tebuconazol, encontraron que las CE50 de aislados con sensibilidad reducida estaban entre 0,61 ppm y 1,94 ppm. Estos autores confirmaron posteriormente que estos aislados presentaban 5 conocidas mutaciones que explicaban esta sensibilidad reducida. Los resultados de este trabajo estarían indicando la existencia de una fracción de nuestros aislados con sensibilidad reducida a tebuconazol, lo que estaría limitando el uso de este fungicida en el manejo de la PA en nuestro país. Si bien esto no significa que el tebuconazol no sea útil para el manejo de la enfermedad (parte de la población del patógeno sería controlada) es probable que su uso reiterado continúe presionando a la población de *Colletotrichum* hacia niveles de mayor resistencia, lo que redundaría en una pérdida de efectividad del fungicida.

La situación frente a difenoconazol es similar, con una CE50 promedio de 0,192 ppm, una CE50 mínima de 0,013 ppm y una máxima de 1,18 ppm. En este caso el único antecedente encontrado en la bibliografía es el mismo trabajo de Zhang *et al.* (2020) en el que aislados de *C. siamense* obtenidos de durazneros con síntomas de antracnosis y considerados sensibles a difenoconazol presentaron una CE50 promedio de 0,056 ppm. Estos resultados indican que el difenoconazol podría ser utilizado para el control de la PA y MF en manzano causadas por *C. siamense*, pero serán necesarios futuros ensayos de campo que lo corroboren. Si bien los fungicidas pertenecientes al grupo de los DMI aparecen como promisorios para el control de *Colletotrichum* en manzana, el hecho de que presenten alto riesgo de generar resistencia limita su uso en campo.

En cuanto a la sensibilidad a benzimidazoles, los aislados se mostraron altamente sensibles tanto a benomilo como a carbendazim. Sin embargo, en diferentes regiones estos fungicidas han dejado de utilizarse en el cultivo de manzano por su alto riesgo de generar resistencia. Cuando aparecieron en el mercado su uso principal fue para el manejo de la sarna del manzano, ocasionado por *Venturia inaequalis*; sin embargo, al poco tiempo de empezar a usarse comenzaron a verse fallas en el control. Se demostró que eran debidas a la aparición de resistencia en las poblaciones del patógeno.

Las características de *Colletotrichum*, especialmente su alta tasa de esporulación, lo convierten en un hongo de alto riesgo de resistencia. A su vez los benzimidazoles se caracterizan por tener un único sitio de acción, la β -tubulina, proteína que interviene en la formación del huso cromático durante la mitosis celular, por lo que tienen un alto riesgo de generar resistencia. La

combinación de un fungicida de alto riesgo con un hongo de alto riesgo asegura los problemas de resistencia. En estas situaciones lo recomendable es no hacer más de una aplicación del fungicida en cada temporada (Fernández-Ortuño *et al.*, 2014).

En cuanto a las estrobilurinas, QoI, los aislados presentaron diferente respuesta frente a azoxistrobin y a pyraclostrobin. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Hu *et al.* (2015) quienes encontraron aislados de *Colletotrichum siamense* obtenidos de frutos de durazno y arándanos resistentes a azoxistrobin con CE50 >100 ppm. Por otra parte, Chechi *et al.* (2019) informaron diferencias entre aislados de *C. siamense* de manzanos de diferente origen geográfico. Así, aislados de los huertos de manzanos de Carolina del Sur fueron sensibles a azoxistrobin, mientras que todos los aislados de Illinois mostraron valores de CE50 >100 ppm. Estos autores marcan la diferencia y justifican estos resultados expresando que los campos de Illinois habían sido tratados de forma rutinaria a lo largo de los años con fungicidas sitio específicos, incluidos los QoI y MBC, mientras que los aislados de Carolina del Sur se originaron en un campo que no había estado expuesto a aplicación de fungicidas.

En tanto que, frente a pyraclostrobin, los aislados de *C. siamense* mostraron una mayor sensibilidad con una CE50 promedio de 2,819 ppm. Esto estaría indicando que los mecanismos de resistencia a pyraclostrobín difieren del resto de las estrobilurinas a pesar de estar ubicados en el mismo grupo por el FRAC.

Dado que *C. siamense* es la única especie encontrada ocasionando enfermedad en los manzanos en la región centro de Santa Fe, resulta pertinente mencionar el trabajo realizado por Chechi *et al.* (2019). Estos autores expresan que *C. siamense* puede ser capaz de diversificarse genéticamente a un ritmo más rápido que otras especies de *Colletotrichum* que afectan al mismo hospedante. De este modo, indican que en los campos comerciales de manzanas de Illinois y Carolina del Sur (Estados Unidos), *C. siamense* fue la única especie que se había adaptado con éxito a la presión de los fungicidas y especulan con que esta puede ser la razón por la que haya predominado frente a otras especies. Además, agregan que, en campos productores de duraznos de Carolina del Sur, se manifestaron cambios en la composición de las especies que se habían registrado durante décadas, destacando que *C. siamense* había evolucionado hasta convertirse en predominante. La prevalencia de esta especie se relacionó con la presencia de genotipos resistentes a fungicidas MBC y QoI (Hu *et al.*, 2015). Si bien no disponemos de un historial que nos permita conocer cómo fue que *C. siamense* alcanzó la situación actual de ser la especie predominante causando enfermedad en esta zona, es posible que su plasticidad genética le permita adaptarse mejor que otras especies; dentro de esta plasticidad se incluye la capacidad de adaptarse (resistir) a los fungicidas. Los estudios de sensibilidad en esta tesis se han realizado

utilizando el crecimiento micelial sin cuantificar el porcentaje de la inhibición de la germinación de conidios. Existen trabajos que demuestran diferentes comportamientos para un mismo principio activo según se haya evaluado mediante una u otra metodología (Munir *et al.*, 2016; Gao *et al.*, 2017; Moreira *et al.*, 2019b). Por lo cual, los resultados obtenidos en este capítulo deberían complementarse con mediciones de germinación de conidios, a los fines de poder evaluar el comportamiento de aquellos fungicidas que no fueron capaces de inhibir el crecimiento micelial.

Así mismo, los resultados obtenidos en este trabajo constituyen un punto de partida para realizar futuros ensayos a campo, teniendo en cuenta que algunos de los productos que resultaron eficaces presentan alto riesgo de generar resistencia y otros aun no cuentan con registro para su uso en manzano.

5. Discusión general

5.1 DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados obtenidos en esta tesis revelan que *Colletotrichum siamense* es el principal agente causal de podredumbre amarga (PA) en manzanos con bajos requerimientos de frío de la región central de Santa Fe, y que este patógeno es además capaz de infectar las hojas, causando manchas foliares (MF), pero no clorosis ni defoliación severa, lo cual indica que la mancha foliar por *Glomerella* (MFG) no está presente en la región hasta el momento.

El hallazgo de *C. siamense* como único agente etiológico responsable de PA y MF en manzanos de la provincia de Santa Fe hace que se refute la primera hipótesis de esta tesis. Este resultado es valioso porque las estrategias de manejo pueden concentrarse específicamente en esta especie, y no en un conjunto de especies como ocurre en otras partes del mundo. Luego de identificarse al agente causal de una enfermedad resulta importante estudiar los aspectos centrales de la patogénesis y la epidemiología de las enfermedades en la región.

Los resultados obtenidos en el segundo capítulo corroboran la segunda hipótesis planteada y permiten dar claridad a las diferentes fases de la patogénesis o ciclo de vida de *C. siamense* como patógeno en manzanos con bajos requerimientos de frío (Figura 5.1) en la región central de Santa Fe. *Colletotrichum siamense* sobrevive en su estado asexual o anamorfo en estructuras conidiales o conidiomatas llamadas acérvulas. Los sitios de sobrevivencia se encuentran principalmente sobre la planta; en hojas asintomáticas y pecíolos, ramas jóvenes, frutos momificados y pedúnculos. En el suelo se encuentra sobreviviendo solamente en hojarasca. Llegada la primavera, el inicio de las lluvias y temperaturas cálidas por encima de 20°C (óptimo de 25°C) permiten que comience la maduración de acérvulas y liberación de conidios, conformando éstos el inóculo inicial. Cuando estos conidios, transportados por las gotas de lluvia, alcanzan hojas o frutos de manzanos, con temperaturas de 25°C germinan y al cabo de 24hs comienzan con el proceso de penetración utilizando estrategias de infección hemibiotrófica. En condiciones óptimas, el período de incubación es muy corto, siendo de aproximadamente 3-7 días en frutos dependiendo si la penetración fue mediante herida o no, respectivamente y 3 días en hojas, siendo visible el signo a los 10 días en frutos y a los 5 días en hojas. Esta presencia del signo es lo que conforma el inóculo secundario que posibilita los sucesivos ciclos de reinfecciones, tanto en frutos como en hojas. Con la finalización de la cosecha y posterior caída de hojas en los meses invernales comienza el proceso de sobrevivencia del patógeno para, en la primavera siguiente, comenzar un nuevo ciclo de infección.

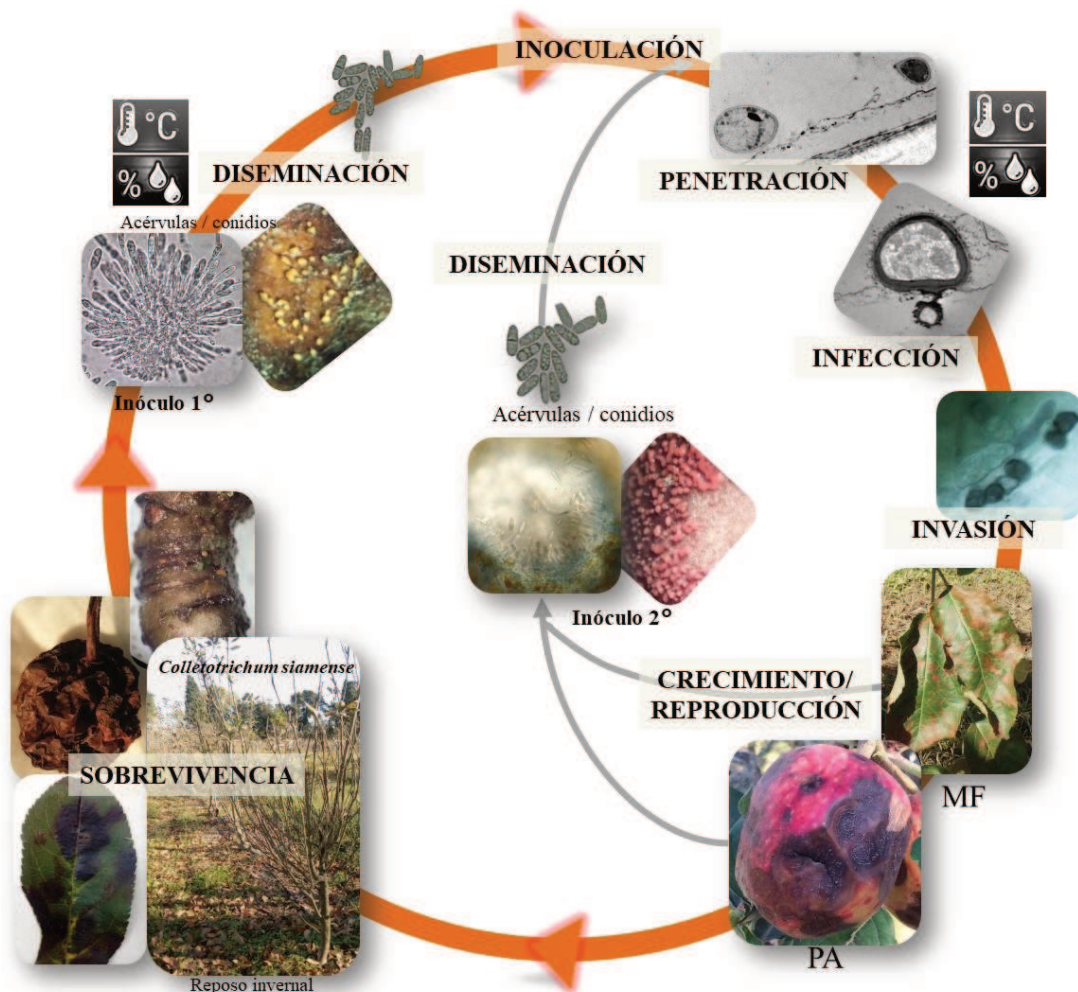


Figura 5.1 Ciclo de vida tentativo para *Colletotrichum siamense* como agente causal de PA y MF en manzanos con bajos requerimientos de frío del centro de Santa Fe.

Para realizar un adecuado control de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* en manzanos, es necesario combinar diferentes medidas siguiendo estrategias de MI. Considerando que, en la región central de Santa Fe, *C. siamense* sobrevive principalmente sobre la planta en su fase asexual, el saneamiento resulta una medida de manejo relevante. A largo plazo, la mejor estrategia de manejo para PA consiste en la selección y utilización de cultivares resistentes o de menor susceptibilidad. Los resultados de esta tesis determinaron que el cultivar ‘Princesa’ es el que presenta mejor comportamiento frente a PA. Sin embargo, ningún cultivar comercial es suficientemente resistente como para no requerir tratamientos químicos. Ante esto la aplicación de fungicidas es una medida de manejo que se utiliza con frecuencia para el control de PA. Dado que la sensibilidad a los fungicidas y las fuentes de inóculo pueden variar entre las especies y dentro de una misma especie de *Colletotrichum*, es fundamental que los métodos de manejo se centren en las especies que causan la enfermedad en cada región. En esta tesis se

determinó que los aislados de *C. siamense* de la región central de Santa Fe resultan con sensibilidad variable a los fungicidas evaluados, resultados que refutan la tercera hipótesis planteada. Los datos obtenidos para los fungicidas de contacto muestran que *C. siamense* no está dentro del espectro de acción de captan y mancozeb y resultó altamente resistente a ziram. Para el caso de los triazoles, parte de nuestros aislados mostraron sensibilidad reducida a tebuconazol y difineconazol lo que, en parte, estaría limitando el uso de estos fungicidas, aunque serán necesarios futuros ensayos de campo que corroboren esto. En cuanto a benzimidazoles, los aislados se mostraron altamente sensibles a benomilo y a carbendazim, pero las características de estos fungicidas limitan su uso a no más de una aplicación por temporada. Finalmente, frente a las estrobilurinas el comportamiento de *C. siamense* fue dispar mostrando cierta resistencia a azoxistrobin, mientras que frente a pyraclostrobin, los aislados mostraron mayor sensibilidad, indicando que los mecanismos de resistencia a este principio activo difieren del resto de las estrobilurinas. Estos resultados constituyen un punto de partida para realizar futuros ensayos a campo, teniendo en cuenta que algunos de los productos que resultaron eficaces presentan alto riesgo de generar resistencia y otros aun no cuentan con registro para su uso en manzano. Por último, es importante destacar que los resultados se obtuvieron mediante la evaluación del crecimiento micelial, por lo cual son necesarios estudios complementarios que permitan determinar si los principios activos inhiben además la germinación de conidios.

BIBLIOGRAFÍA

Abid, M., Chohan, S., Perveen, R., & Anees, M. (2019). First Report of Bitter Rot of Apple Caused by *Colletotrichum siamense* in Pakistan. *Plant Disease*, 103(3), 583. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-18-1573-PDN>

Aćimović, S., Martin, P., Khodadadi, F., & Peter, K. (2020). One Disease Many Causes: The Key *Colletotrichum* Species Causing Apple Bitter Rot in New York, Pennsylvania and Virginia, Their Distribution, Habitats and Management Options. New York State Horticultural Society. *Fruit Quarterly*, 28 (4), 12-21.

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier.

Alaniz, S., Hernandez, L., Damasco, D., & Mondino, P. (2012). First report of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae* causing bitter rot of apple in Uruguay. *Plant disease*, 96(3), 458-458. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-11-0669>

Alaniz, S., Delgado, L., Hernández, L., Leoni, C., & Mondino, P. (2014). Determinación de los agentes causales de la podredumbre amarga y podredumbres por *Botryosphaeriace* en Uruguay. Serie Actividades de Difusión N° 739, INIA Las Brujas. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/10185/1/sad-739-p.37-41.pdf>

Alaniz, S., Hernández, L., & Mondino, P. (2015). *Colletotrichum fruticola* is the dominant and one of the most aggressive species causing bitter rot of apple in Uruguay. *Tropical Plant Pathology*, 40(4), 265-274. DOI 10.1007/s40858-015-0025-9

Alaniz, S., Cuzzo, V., Martínez, V., Stadnik, M. J., & Mondino, P. (2019). Ascospore infection and *Colletotrichum* species causing Glomerella leaf spot of apple in Uruguay. *The plant pathology journal*, 35(2), 100. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.07.2018.0145>

Alayón Luaces, P., & Rodriguez, V.A. (2010). Análisis Fenológico de cultivares de manzana (*Malus domestica* Borkh.) de bajos requerimientos de horas de frío en San Luis del Palmar (Corrientes). *Agrotecnia*, 20: <http://dx.doi.org/10.30972/agr.020334>

Amorim, L., & Bergamin Filho, A. (2018). Epidemiologia: análises temporal e espacial. In Lilian Amorim, Jorge Alberto Marques Rezende, Armando Bergamin Filho. (Org.). Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos. 5ed. Ouro Fino: Agronômica Ceres Ltda, v. 1, p. 520-530.

Araújo, L., Gonçalves, A. E., & Stadnik, M. J. (2014). Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytoparasitica*, 42(5), 631-640. <https://doi.org/10.1007/s12600-014-0404-7>

Arregui, M.C., & Puricelli, E. (2008). Mecanismos de Acción de Plaguicidas. 1°ed. Acquatint. Argentina. ISBN:978-987-05-4191-2. Cap. 2. 79-123; 208pp

Astolfi, P., Velho, A. C., Moreira, V., Mondino, P., Alaniz, S. M., & Stadnik, M. J. (2022). Reclassification of the main causal agent of *Glomerella* leaf spot on apple into *Colletotrichum chrysophilum* in southern Brazil and Uruguay. *Phytopathology*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-21-0527-SC>

Bailey JA., & Jeger MJ. (1992). *Colletotrichum*. Biology, Pathology and Control. CABI, Wallingford, UK.

Baroncelli, R., Zapparata, A., Sarrocco, S., Sukno, S.A., Lane, C.R., Thon, M.R., ... & Sreenivasaprasad, S. (2015). Molecular diversity of anthracnose pathogen populations associated with UK strawberry production suggests multiple introductions of three different *Colletotrichum* species. *PLoS One*, 10(6), e0129140. doi:10.1371/journal.pone.0129140

Bhadauria, V., Miraz, P., Kennedy, R., Banniza, S., & Wei, Y. (2010). Dual trypan-aniline blue fluorescence staining methods for studying fungus-plant interactions. *Biotechnic & Histochemistry*, 85(2), 99-105.

Bhunjun, C.S., Phukhamsakda, C., Jayawardena, R.S., Jeewon, R., Promputtha, I., & Hyde, D. (2021). Investigating species boundaries in *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 107(1), 107-127. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00471-z>

Børve, J., & Stensvand, A. (2017). *Colletotrichum acutatum* occurs asymptotically on apple leaves. *European Journal of Plant Pathology*, 147(4), 943-948. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1050-3>

Bragança, C.A., Damm, U., Baroncelli, R., Júnior, N.S.M., & Crous, P.W. (2016). Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. *Fungal Biology*, 120(4), 547-561. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.011>

Brook, P. J. (1977). *Glomerella cingulata* and bitter rot of apple. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 20(4), 547-555. DOI: 10.1080/00288233.1977.10427373

Cai, L., Hyde, K.D., Taylor, P.W.J., Weir, B., Waller, J., Abang, M.M., Zhang, J.Z., Yang, Y.L., Phoulivong, S., Liu, Z.Y., Prihastuti, H., Shivas, R.G., McKenzie, E.H.C. & Johnston, P.R. (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39(1), 183-204.

Campbell, C.L. (1998). Disease progress in time: modelling and data analysis. In *The epidemiology of plant diseases* (pp. 181-206). Springer, Dordrecht.

Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., & Weir, B.S. (2012). *Colletotrichum*: current status and future directions. *Studies in Mycology* 73:181e213. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0014>.

Carmona, M.A. & Reis, E.M. (2013). Classification of fungicides. Fungicides. Classification, Role in Disease Management and Toxicity Effects. PP 91-104 Editorial Nova Science Publishers, Inc. 400 Oser Avenue, Suite 1600 Hauppauge, NY 11788.

Carraro, T., Moreira, R.R., Gelain, J., & De Mio, L.L.M. (2022). Etiology and epidemiology of diseases caused by *Colletotrichum* spp. in persimmon, apple, peach, and grapevine. *RAPP* – 28(1) 136-162. doi: 10.31976/0104-038321v280006

CASAFE (2022). “Guía de Productos fitosanitarios 2022”. Guía On-line. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. <https://guiaonline.casafe.org>

Casanova, L., Hernández, L., Alaniz, S., & Mondino, P. (2015) Control en campo de la Podredumbre Amarga del manzano causada por *Colletotrichum* spp.

Casanova, L., Hernández, L., Alaniz, S., & Mondino, P. (2016). Sitios y estructuras de sobrevivencia de *Colletotrichum* spp., causante de la podredumbre amarga del manzano. *Agrociencia (Uruguay)*, 20(2), 68-73.

Casanova, L., Hernández, L., Martínez, E., Velho, A. C., Rockenbach, M. F., Stadnik, M. J. & Mondino, P. (2017). First report of *Glomerella* leaf spot of apple caused by *Colletotrichum fructicola* in Uruguay. *Plant Disease*, 101(5), 834-834. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1320-PDN>

Castro, D., Favaro, J.C., Scotta, R., & Gariglio, N.F. (2015) (a). Capítulo 4: Manzano. En: Gariglio, N.F.; Bouzo, C. & Travadelo, M. (Editores). Cultivos Frutales y Ornamentales para zonas templados - cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe. Ediciones UNL, Santa Fe, 292 pp.

Castro, D.C., Álvarez, N., Gabriel, P., Micheloud, N., Buyatti, M., & Gariglio, N. (2015) (b). Crop loading studies on ‘Caricia’ and ‘Eva’ apples grown in a mild winter area. *Scientia Agricola*, 72, 237-244. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0267>

Castro, D.C., Cerino, M.C., Gariglio, N., & Radice, S. (2016). Study of reproductive behaviour in low-chill apples in warmer zones of Argentina. *Scientia Horticulturae*, 199, 124-132. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.018>

Castro, D.C., Álvarez, N., Gabriel, P., Buyatti, M., Favaro, J.C., & Gariglio, N. (2017). Can ‘Caricia’ and ‘Princesa’ apples be considered low-chilling cultivars?. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 39, 49-58. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v39i1.30996>

Chechi, A., Stahlecker, J., Dowling, M. E., & Schnabel, G. (2019). Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. *Pesticide biochemistry and physiology*, 158, 18-24. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.002>

- Chen, S.N., Luo, C.X., Hu, M.J., & Schnabel, G. (2016). Sensitivity of *Colletotrichum* species, including *C. fioriniae* and *C. nymphaeae*, from peach to demethylation inhibitor fungicides. *Plant Disease*, 100(12), 2434-2441. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-16-0574-RE>
- Chen, Y., Fu, D., Wang, W., Gleason, M.L., Zhang, R., Liang, X., & Sun, G. (2022)(a). Diversity of *Colletotrichum* Species Causing Apple Bitter Rot and Glomerella Leaf Spot in China. *Journal of Fungi*, 8(7), 740. <https://doi.org/10.3390/jof8070740>
- Chen, W., Wei, L., Hou, R., Zhao, Y., Zhao, Y., & Liu, F. (2022)(b). Sterol demethylation inhibitor fungicide resistance in *Colletotrichum siamense* from chili is caused by mutations in CYP51A and CYP51B. *Phytopathology Research*, 4(1), 1-16.
- Chung, P.C., Wu, H.Y., Wang, Y.W., Ariyawansa, H.A., Hu, H.P., Hung, T.H., ... & Chung, C.L. (2020). Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Taiwan and description of a new species, *Colletotrichum miaoliense* sp. nov. *Scientific reports*, 10(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70878-2>
- Cichón, L., Di Masi, S., Fernandez, D., Magdalena, J.C., Rial, E., & Rossini, M. (1996). Guía ilustrada para el monitoreo de plagas y enfermedades en frutales de pepita. Ed. Dto de Comunicaciones de la EEA Alto Valle del INTA. 73 pp.
- Crous, P. W., Hawksworth, D.L., & Wingfield, M.J. (2015). Identifying and naming plant-pathogenic fungi: past, present, and future. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 247-267.
- Crusius, L.U., Forcelini, C.A., Sanhueza, R., & Fernandes, J. (2002). Epidemiology of apple leaf spot. *Fitopatologia brasileira*, 27, 65-70.
- Dansa, A.M. (2018). Perfil de Mercados de Manzana y Pera. Ministerio de Agroindustria. Área de Frutas. https://magyp.gob.ar/new/0-0/programas/dma/frutas/perfil_manzanas_peras.pdf
- De Rossi, R. P., Cichon, L., Ziaurriz, S. A., Colodner, A. D., & Montenegro, M. (2021). Guía de fungicidas registrados en frutales y vid en Argentina con presencia comercial en la región Norpatagónica y su eficacia en el control de enfermedades. EEA Alto Valle, INTA; 38p.
- De Silva, D.D., Crous, P.W., Ades, P.K., Hyde, K.D., & Taylor, P.W. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155-168. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., ... & Foster, G.D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Denardi, F., Berton, O., & Spengler, M. (2003). Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos.

Revista Brasileira de Fruticultura 25:494-497. [https:// doi.org/10.1590/S0100-29452003000300033](https://doi.org/10.1590/S0100-29452003000300033)

Denardi, F., Kvitschal, M. V., & Hawerth, M. C. (2019). A brief history of the forty-five years of the Epagri apple breeding program in Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 19(3), 347-355.

Di Masi, S. 2007. Epidemiología, ecofisiología y control de *Alternaria* spp. causante del corazón mohoso en manzanas Red Delicious en Argentina. Tesis doctoral. En: <https://inta.gob.ar/documentos/epidemiologia-ecofisiologia-y-control-de-alternaria-spp-causante-del-corazon-mohoso-en-manzanas-red-delicious-en-argentina>

Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., & Robledo, C.W. (2017). InfoStat version 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>

Dobra, A.C., Rossini, M., Barnes, N., & Sosa, M.C. (2007). Manejo integrado de enfermedades de los frutales de pepita. Pág. 589-615. En: Árboles frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento. Sozzi, G. O. (ed). Editorial Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. 848 pp.

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>

Everett, K. R., Pushparajah, I. P. S., Timudo, O. E., Ah Chee, A., Scheper, R. W. A., Shaw, P. W., ... & Wood, P. N. (2018). Infection criteria, inoculum sources and splash dispersal pattern of *Colletotrichum acutatum* causing bitter rot of apple in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*, 152(2), 367-383. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1481-0>

Fenoy, J.L. (2015). Producción de manzanas en el centro norte entrerriano. Resultados de 10 años de observaciones. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Estación Experimental Agropecuaria Concordia. Agencia de Extensión Rural Federal. Serie de extensión N°15. ISSN 1851-314X.

Fernandez, L. N., Alaniz, S., Mondino, P., Roeschlin, R. A., Maumary, R. L., Gariglio, N. F., & Favaro, M. A. (2018). First report of *Colletotrichum siamense* causing apple bitter rot in Central Argentina. *Plant Disease*, 102(1), 250-250. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-17-1071-PDN>

Fernandez, L., Berutti, G., Gariglio, N., Favaro, M. A., & Maumary, R. (2020). *Marssonina coronaria*, new causal agent of leaf spots in apple trees with low chilling requirements in central

Argentina. *REVISTA FAVE: Sección Ciencias Agrarias*, 19(1), 43-53. Doi 10.14409/fa.v19i1.9452

Fernandez, L.N., Derita, M.G., Acquatti, N.S., Maumary, R.L., & Favaro, M.A. (2022) (a). Avances en la reidentificación de especies de *Colletotrichum* en cultivos intensivos del centro de Argentina. XVII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 19 al 21 de octubre.

Fernandez, L.N., Alaniz, S., Derita, M.G., Lutz, A., Gariglio, N.F., Mondino, P.E., & Favaro, M.A. (2022) (b). Characterization of *Colletotrichum siamense* the causal agent of bitter rot and leaf spot in low-chill apple cultivars in central Argentina. *International Journal of Pest Management*. <https://doi.org/10.1080/09670874.2022.2116659>

Fernández-Ortuño, D., Grabke, A., Bryson, P. K., Amiri, A., Peres, N. A., & Schnabel, G. (2014). Fungicide resistance profiles in *Botrytis cinerea* from strawberry fields of seven Southern U.S. states. *Plant Disease*. 98:825-833. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-13-0970-RE>

Fernández Valiela, M.V. (1978). Vol III. Hongos. En: Introducción a la Fitopatología. Colección Científica INTA. Bs. As. 3ra. Ed., 779 pp.

Forcelini, B.B., Seijo, T.E., Amiri, A., & Peres, N.A. (2016). Resistance in Strawberry Isolates of *Colletotrichum acutatum* from Florida to Quinone-Outside Inhibitor Fungicides. *Plant Disease*, 100.10:2050-2056. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-16-0118-RE>

Forsline, P.L., Aldwinckle, H.S., Dickson, E.E., Luby, J.J. & Hokanson, S.C. (2003). Collection, maintenance, characterization, and utilization of wild apples of Central Asia. *Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)* **29**, 1–61. ISBN: 0-471-21968-1

FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. 2017. www.frac.info.

Freeman, S., Minz, D., Jurkevitch, E., Maymon, M., & Shabi, E. (2000). Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Phytopathology*, Saint Paul, 90(6), 608-614.

Freeman, S., Minz, D., Maymon, M., & Zveibil, A. (2001). Genetic diversity within *Colletotrichum acutatum* sensu Simmonds. *Phytopathology*, 91(6), 586-592.

Fu, M., Crous, P. W., Bai, Q., Zhang, P. F., Xiang, J., Guo, Y. S., ... & Wang, G. P. (2019). *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Pyrus* spp. in China. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 42(1).

Furlan, C. R. C., Dantas, A. C. D. M., Denardi, F., Becker, W. F., & Mantovani, A. (2010). Resistência genética dos acessos do banco de germoplasma de macieira da Epagri à mancha foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 32, 507-514.

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.

García, S. M., Leva, P., Zbrun, M. V., Vales, M. A., Gandolfo, M. A., & Valtorta, S. E. (2002). Tendencias de índices meteorológicos y biometeorológicos. *FAVE: Sección Ciencias Agrarias*, 1(1), 27-36.

García, S. M., Leva, P., Toffoli, G., Pilatti, M., Alesso, C. (2015). Capítulo 1 Caracterización agroclimática y edafológica del centro de la provincia de Santa Fe. En: Gariglio, N.F.; Bouzo, C. & Travadelo, M. (Editores). *Cultivos Frutales y Ornamentales para zonas templados - cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe*. Ediciones UNL, Santa Fe, 292 pp.

Gasparoto, M. C. G., Lourenço, S. A., Tanaka, F. A. O., Spósito, M. B., Marchini, L. C., Silva Junior, G. J., & Amorim, L. (2017). Honeybees can spread *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* among citrus plants. *Plant Pathology*, 66(5), 777-782.

Gelain, J., Hamada, N.A., & Mio, L.L.M. (2022). Survival of pathogens after dormancy in apple tree twigs indicates potential risk as source of inoculum. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 44.

Giaretta, D.R., Bogo, A., Coelho, C.M.M., Guidolin, A.F., Dantas, A.C.D.M., & Gomes, E.A. (2010). ITS-rDNA phylogeny of *Colletotrichum* spp. causal agent of apple glomerella leaf spot. *Ciência Rural*, 40, 806-812.

Glass, N.L., & Donaldson, G.C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and environmental microbiology*, 61(4), 1323.

González, E., Sutton, T.B., & Correll, J.C. (2006). Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests. *Phytopathology*, 96(9), 982-992.

Grammen, A., Wenneker, M., Van Campenhout, J., Pham, K. T. K., Van Hemelrijck, W., Bylemans, D., ... & Keulemans, W. (2019). Identification and pathogenicity assessment of *Colletotrichum* isolates causing bitter rot of apple fruit in Belgium. *European journal of plant pathology*, 153(1), 47-63. <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1539-z>

Gupta, V.K., Tuohy, M.G., & Gaur, R. (2013). Methods for high-quality DNA extraction from fungi. In *Laboratory Protocols in Fungal Biology* (pp. 403-406). Springer, New York, NY.

Hamada, N.A. (2005). Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da mancha-foliar da gala (*Colletotrichum* spp.). *Agropecuária Catarinense*, 18(2), 73-77.

Hamada, N.A. & May DeMio, L.L. (2012). Metodología para deteccion de *Colletotrichum* spp. em flores de macieira. XXXV Congresso Paulista de Fitopatologia. 14 al 16 de febrero de 2012. Jaguariúna, SP. Brasil.

Hamada, N.A. (2013). Epidemiologia da mancha foliar de glomerella em macieira. Tesis Doctorado. Curitiba, PR, Brasil. Universidade Federal do Paraná. 117 p.

Hamada, N.A., Moreira, R.R., Nesi, C.N., & May De Mio, L.L. (2019). Pathogen dispersal and Glomerella leaf spot progress within apple canopy in Brazil. *Plant disease*, 103(12), 3209-3217.

Hamada, N.A., Moreira, R.R., Figueiredo, J.A.G., & Mio, L.L.M.D. (2020). *Colletotrichum acutatum* complex isolated from apple flowers can cause bitter rot and *Glomerella* leaf spot. *Bragantia*, 79, 399-406.

Han, F., Zhang, Y.T., Liu, Z., Ge, L., Wang, L.D., Ji, Y.P., ... & Wang, Q.H. (2021). First Report of Red-Fleshed Apple Anthracnose Caused by *Colletotrichum siamense*. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1132-PDN>

Hauagge, R., & Tsuneta, M. (1999). "IAPAR 75-Eva", "IAPAR 76-Anabela" e "IAPAR 77-Carícia"-Novas cultivares de macieira com baixa necessidade em frio. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 21(3), 239-242.

Hauagge, R. & Cummins, J.N. (2000). "Pome fruit genetic pool for production in warm climates". En: Erez, A. (Ed.). *Temperate fruit crops in warm climates (267–304)* Dordrecht, *The Netherlands*: Kluwer Academic Publishers

Hoge, B. L. (2017). Characterization of the genetic diversity and developmental biology of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex in NC Apple orchards. (Master of Science dissertation, North Carolina State University). <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/1z40ks800/44559m20c/02872238m/fruit.pdf>

Hu, M.J., Grabke, A., Dowling, M.E., Holstein, H.J., & Schnabel, G. (2015). Resistance in *Colletotrichum siamense* from peach and blueberry to thiophanate-methyl and azoxystrobin. *Plant Disease*, 99(6), 806-814.

Huang, F., Chen, G., Hou, X., Fu, Y.S., Cai, L., Hyde, K.D., & Li, H.Y. (2013). *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity*, 61(1), 61-74.

Hyde, K.D., Cai, L., McKenzie, E.H.C., Yang, Y.L., Zhang, J.Z., & Prihastuti, H. (2009) (a). *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. *Fungal Diversity*, 39(1), 1-17.

Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., ... & Tan, Y.P. (2009) (b). *Colletotrichum*—names in current use. *Fungal Diversity*, 39(1), 147-182.

- Hyde, K.D., Nilsson, R.H., Alias, S.A., Ariyawansa, H.A., Blair, J.E., Cai, L., ... & Zhou, N. (2014). One stop shop: backbone trees for important phytopathogenic genera: I. *Fungal Diversity*, 67(1), 21-125.
- Hyde, K.D. (2020). Refined families of Sordariomycetes. *Mycosphere* 11(1): 305–1059. ISSN 2077 7019. Doi 10.5943/mycosphere/11/1/7
- Jayawardena, R.S., Yan, J.Y., Cai, L., Shenoy, B.D., & Sharma, G. (2016). Discovering and dealing with the unknown aspects of *Colletotrichum*. *Mycosphere*, 7(8), 1074-1075.
- Jayawardena, R.S., Hyde, K.D., Chen, Y.J., Papp, V., Palla, B., Papp, D., ... & Wang, Y. (2020). One stop shop IV: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera: 76–100 (2020). *Fungal Diversity*, 103(1), 87-218.
- Jayawardena, R.S., Bhunjun, C.S., Hyde, K.D., Gentekaki, E., & Itthayakorn, P. (2021). *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. *Mycosphere*, 12(1), 519-669.
- Jiang, J., Zhai, H., Li, H., Wang, Z., Chen, Y., Hong, N., ... & Xu, W. (2014). Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Protection*, 58, 41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.01.003>
- Jiang, B., Cai, T., Yang, X., Dai, Y., Yu, K., Zhang, P., ... & Lian, S. (2022). Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression between pathogens of apple Glomerella leaf spot and apple bitter rot. *BMC genomics*, 23(1), 1-15.
- Johnson, K.A. (2019). Characterization and fungicide efficacy of North Carolina *Colletotrichum* populations causing *Glomerella* leaf spot and fruit rot on apple (Doctoral dissertation, North Carolina State University).
- Jones, A. & Aldwinckle, H. (2002). Compendium of apple and pear diseases. St. Paul, MN, USA, APS. 100 p.
- Jurick, W.M., Janisiewicz, W.J., Saftner, R.A., Vico, I., Gaskins, V.L., Park, E. & Conway, W.S. (2011). Identification of wild apple germplasm (*Malus* spp.) accessions with resistance to the postharvest decay pathogens *Penicillium expansum* and *Colletotrichum acutatum*. *Plant Breeding*, 130(4), 481-486.
- Chethana, K. W., Jayawardena, R. S., Chen, Y. J., Konta, S., Tibpromma, S., Phukhamsakda, C., ... & Hyde, K. D. (2021). Appressorial interactions with host and their evolution. *Fungal Diversity*, 110(1), 75-107.

- Katsurayama, Y & Boneti, J. (2009). Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil em “Manejo integrado de doenças da macieira” de Marciel J. Stadnik. Cap. 4; pag 45 a 64. Florianópolis: CCA-UFSC. 229 p. ISBN 978-85-904597-2-9
- Khodadadi, F., González, J.B., Martin, P.L., Giroux, E., Bilodeau, G.J., Peter, K.A., ... & Aćimović, S.G. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of *C. noveboracense* sp. nov. *Scientific reports*, 10(1), 1-19.
- Kim, C. H., Hassan, O., & Chang, T. (2020). Diversity, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species associated with apple anthracnose in South Korea. *Plant Disease*, 104(11), 2866-2874.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Larrán, S., Bahima, J.V., Dal Bello, G., Franco, E., & Balatti, P. (2015). *Colletotrichum siamense* causing anthracnose in *Bauhinia forficata* subsp. *pruinosa* in Argentina. *Australasian Plant Disease Notes*, 10(1), 1-2.
- Li, Y., Sun, H., Li, J., Qin, S., Yang, W., Ma, X., Qiao, X., Yang, B. (2021). Effects of Genetic Background and Altitude on Sugars, Malic Acid and Ascorbic Acid in Fruits of Wild and Cultivated Apples (*Malus* sp.). *Foods*, 10, 2950. <https://doi.org/10.3390/foods10122950>
- Liu, F., Wang, M., Damm, U., Crous, P. W., & Cai, L. (2016). Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study. *BMC evolutionary biology*, 16(1), 1-14.
- Liu, F., Ma, Z. Y., Hou, L. W., Diao, Y. Z., Wu, W. P., Damm, U., ... & Cai, L. (2022). Updating species diversity of *Colletotrichum*, with a phylogenomic overview. *Studies in Mycology*, (101), 1-86.
- Lódolo, X. V., Lutz, M. C., Mondino, P., Ousset, J., & Sosa, M. C. (2022). First Report of *Diplodia seriata*, *Diplodia mutila*, and *Dothiorella omnivora* Associated with Apple Cankers and Dieback in Rio Negro, Argentina. *Plant Disease*, 106(1), 325.
- Lolas, M. (2005). Enfermedades de verano en manzanas Pink Lady. Pomaceas. Boletín Técnico. 5(2): 1-4.
- Lopez, A.M.Q. (2001). Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. R.A.P.P. - *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, Passo Fundo, 9, 291-339.
- Luby, J. J. (2003). Taxonomic classification and brief history. In *Apples: botany, production and uses*, 1-14. Wallingford UK: Cabi Publishing.

Maddison, W.P., & Maddison, D.R. (2019). Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.61. <http://www.mesquiteproject.org>

Marchionatto, J.B. (1948). Podredumbre amarga de la manzana - En: Tratado de fitopatología. pp: 262-264. Ediciones Librería del Colegio, 1948 - 537 p.

Martin, P.L., Krawczyk, T., Khodadadi, F., Aćimović, S.G., Peter, K. (2021) (a). Bitter Rot of Apple in the Mid-Atlantic US: Causal Species and Evaluation of the Impacts of Regional Weather Patterns and Cultivar Susceptibility. *Phytopathology*, 111(6) <https://doi.org/10.1094/PHTO-09-20-0432-R>.

Martin, P.L., Krawczyk, T., Pierce, K., Thomas, C.A., Khodadadi, F., Aćimović, S., Peter, K. (2021) (b). Fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the Mid-Atlantic United States. *Plant Disease*, <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-21-1142-RE>.

Martin, P.L., King, W.L., Bell, T.H., & Peter, K.A. (2022). The Decay and Fungal Succession of Apples with Bitter Rot Across a Vegetation Diversity Gradient. *Phytobiomes Journal*, 6(1), 26-34.

Meier, U., Graf, H., Hack, H., Hess, M., Kennel, W., Klose, R., ... & Boom, T.V.D. (1994). Phänologische Entwick-lungsstadien des Kernobstes (*Malus domestica* Borkh. und *Pyrus communis* L.), des Steinobstes (Prunus-Arten), der Johannisbeere (Ribes-Arten) mErdbeere (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes*, 46 (7),141-153.

Menezes, M. (2006). Aspectos Biológicos e Taxonômicos de Espécies do Gênero *Colletotrichum*. *Anais Da Academia Pernambucana De Ciência Agrônômica*, 3, 170–179.

Meng, Y., Gleason, M.L., Zhang, R., & Sun, G. (2019). Genome sequence resource of the wide-host-range anthracnose pathogen *Colletotrichum siamense*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 32(8), 931-934.

Mills, P.R., Sreenivasaprasad, S., & Brown, A.E. (1992). Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates using PCR. *FEMS microbiology letters*, 98(1-3), 137-143.

Mondino, P., Di Masi, S., Falconí, C., Montealegre, J., Henríquez, J.L., Nunes, C., Salazar, M., Stadnik, M., Vero, S., & Usall, J. (2009). Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha = Manual de identificação de doenças da maçã em pós-colheita. CYTED. UdeLaR – Facultad de Agronomía. ISBN: 978-9974-0-0594-5

Moraes, S.R.G., Tanaka, F.A.O., Massola Júnior, N.S. (2013). Histopathology of *Colletotrichum gloeosporioides* on guava fruits (*Psidium guajava* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35, 657-664.

- Moreira, R.R., Peres, N.A., & May De Mio, L.L. (2019) (a). *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes associated with apple in Brazil. *Plant disease*, 103(2), 268-275.
- Moreira, R.R., Hamada, N.A., Peres, N.A., & De Mio, L.L.M. (2019) (b). Sensitivity of the *Colletotrichum acutatum* species complex from apple trees in Brazil to dithiocarbamates, methyl benzimidazole carbamates, and quinone outside inhibitor fungicides. *Plant disease*, 103(10), 2569-2576.
- Moreira, R.R., Bergamin Filho, A., Zeviani, W.M., & May De Mio, L.L. (2020). Comparative epidemiology of three *Colletotrichum* species complex causing Glomerella leaf spot on apple. *European Journal of Plant Pathology*, 158(2), 473-484.
- Moreira, R.R., Zielinski, E.C., Castellar, C., Bergamin Filho, A., & De Mio, L.L. M. (2021). Study of infection process of five species of *Colletotrichum* comparing symptoms of glomerella leaf spot and bitter rot in two apple cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 159(1), 37-53.
- Morkeliūnė, A., Rasiukevičiūtė, N., & Valiuškaitė, A. (2021). Meteorological Conditions in a Temperate Climate for *Colletotrichum acutatum*, Strawberry Pathogen Distribution and Susceptibility of Different Cultivars to Anthracnose. *Agriculture*, 11(1), 80.
- Munir, M., Amsden, B., Dixon, E., Vaillancourt, L., & Gauthier, N. W. (2016). Characterization of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Kentucky orchards. *Plant Disease*, 100(11), 2194-2203.
- Nekoduka, S., Tanaka, K., & Sano, T. (2018). Epidemiology of apple bitter rot caused by *Colletotrichum acutatum* sensu lato. *Journal of General Plant Pathology*, 84(4), 262-271.
- Nita, M., Atwal, A., Bly, A., & Lewallen, K. (2019). The Growth Rate of Apple Bitter Rot Lesion, Caused by *Colletotrichum* spp., is Affected by Temperature, Fungal Species, and Cultivar. *International Journal of Phytopathology*, 8(2), 31-36.
- Noe, J.P., & Starkey, T.E. (1982). Relationship of apple fruit maturity and inoculum concentration to infection by *Glomerella cingulata*. *Plant Disease*, 66, 379-381.
- O'Connell, R.J., Thon, M.R., Hacquard, S., Amyotte, S.G., Kleemann, J., Torres, M.F., ... & Vaillancourt, L.J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*, 44(9), 1060-1065.
- O'Donnell, K., & Cigelnik, E. (1997). Two divergent intragenomic rDNA ITS2 types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are non orthologous. *Molecular phylogenetics and evolution*, 7(1), 103-116.

O'Rourke, D. (2003). World production, trade, consumption and economic outlook for apples. *Apples: Botany, production and uses*, 15-29. Wallingford, UK: CABI Publishing.

Oo, M.M., Lim, G., Jang, H.A., & Oh, S.K. (2017). Characterization and pathogenicity of new record of anthracnose on various chili varieties caused by *Colletotrichum scovillei* in Korea. *Mycobiology*, 45(3), 184-191.

Oo, M.M., Yoon, H.Y., Jang, H.A., & Oh, S.K. (2018). Identification and characterization of *Colletotrichum* species associated with bitter rot disease of apple in South Korea. *The plant pathology journal*, 34(6), 480.

Páez Morón, P.G. (2003). “Manzanas de bajos requerimientos de horas de frío”. Proyecto Frutihortícola: Tecnologías para el Desarrollo Sustentable Regional. Boletín N° 4. INTA Centro Regional Córdoba

Park, M.S., Kim, B.R., Park, I.H., & Hahm, S.S. (2018). First report of two *Colletotrichum* species associated with bitter rot on apple fruit in Korea – *C. fructicola* and *C. siamense*. *Mycobiology*, 46(2), 154-158. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1478220>

Penet, L., Guyader, S., Pétero, D., Salles, M., & Bussièrre, F. (2014). Direct splash dispersal prevails over indirect and subsequent spread during rains in *Colletotrichum gloeosporioides* infecting yams. *PLoS One*, 9(12), e115757.

Peres, N.A., Timmer, L.W., Adaskaveg, J.E., & Correll, J.C. (2005). Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Plant disease*, 89(8), 784-796.

Perfect, S.E., Hughes, H.B., O'Connell, R.J., & Green, J.R. (1999). *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal plant interactions. *Fungal Genet. Biol.* 27, 186e198.

Phipps, J.B., Robertson, K.R., Smith, P.G., & Rohrer, J.R. (1990). A checklist of the subfamily *Maloideae* (*Rosaceae*). *Canadian journal of botany*, 68(10), 2209-2269.

Ploetz, R.C. (2007). Diseases of tropical perennial crops: challenging problems in diverse environments. *Plant Disease*, 91(6), 644-663. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-6-0644>

Poti, T., Mahawan, K., Cheewangkoon, R., Arunothayanan, H., Akimitsu, K., & Nalumpang, S. (2020). Detection and molecular characterization of carbendazim-resistant *Colletotrichum truncatum* isolates causing anthracnose of soybean in Thailand. *J. Phytopathol.* 168:267-278.

Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C., & Hyde, K.D. (2009). Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, 39(1), 89-109.

Provasi, A.A., Pieckun, A.A., Rybak, M., Lasserre, S.R. & Bogado, E.F. (2000). “Posibilidad de producción y comercialización de manzanas subtropicales en Misiones”. Miscelánea N° 43. Cerro Azul, Argentina: EEA INTA Cerro Azul.

Reis, E.M., Reis, A.C., & Carmona, M. (2010). Manual de fungicidas. Controle químico de doenças de plantas. 1ra Ed. Editorial Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, Brasil.

Reis, E. M. & Carmona, M. (2012). Fungicidas: características, clasificación y principales usos. Seminario Técnico Internacional manejo de enfermedades en cereales de invierno y cultivos de verano Criterios para el uso de fungicidas en trigo cebada y Soja. 1-4 pp. Paysandú, Uruguay, ISBN 978-9974-0-0852-6 Ed Hemisferio Sur.

Restrepo Leal, J. D., & Rada Gonzalez, D. F. (2017). Estudio epidemiológico de *Colletotrichum* spp. asociado a tres especies del arbolado del campus de la Universidad del Magdalena (Doctoral dissertation, Universidad del Magdalena).

Rista, L.M. & Favaro, M.A. (2015). Capítulo 10: Manejo de Enfermedades (pág. 205-223). En: Gariglio, N.F.; Bouzo, C. & Travadelo, M. (Editores). Cultivos Frutales y Ornamentales para zonas templados - cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe. Ediciones UNL, Santa Fe, 292 pp.

Rockenbach, M.F., Velho, A.C., Alaniz, S.M. & Stadnik, M.J. (2018) Resistance of apple leaves to infection by *Colletotrichum fructicola* acts independently of hypersensitive reaction and PR-1 and PR-10 gene expression. *Tropical Plant Pathology*, 43, 360–370.

Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2017). Situación actual de *Colletotrichum* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. *Revista mexicana de fitopatología*, 35(3), 549-570.

Sanders, G.M. & Korsten, L., (2003). A comparative morphological study of South African avocado and mango isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Can. J. Bot.* 81, 877-885.

Sanhueza, R. M., Becker, W., Boneti, J. D. S., Katsurayama, Y., & Czermainski, A. B. C. (2002). Manejo das doenças de verão na Produção Integrada de Maçã.

Scatoni, B., Mondino, P., Leoni, C., Núñez, S., Buzchiazzo, M., De Luca, R., Moizo, A., Rabellino, F., & Martinez, N. (2005). Normas para la producción integrada de manzano – Temporada 2005- 2006, 45pp.

Rasband, W.S. (2018). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., & Spouge, J.L., et al. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for *Fungi*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:6241-6246

Schubert, T. S. (1983). Bitter rot of apple. Florida Department of Agriculture and Consumer Services.

- Shane, W. W., & Sutton, T. B. (1981). Germination, appressorium formation, and infection of immature and mature apple fruit by *Glomerella cingulata*. *Phytopathology*, 71(4), 454.
- Sharma, G., Pinnaka, A. K., & Shenoy, B. D. (2015). Resolving the *Colletotrichum siamense* species complex using ApMat marker. *Fungal Diversity*, 71(1), 247-264.
- 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.
- Sherriff, C., Whelan, M.J., Arnold, G.M., Lafay, J.F., Brygoo, Y., & Bailey, J.A. (1994). Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. *Experimental Mycology*. 18: 121-138.
- Shi, Y., Correll, J.C., Guerher, J.C., & Rom, C.R. (1996). Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. *Plant disease (USA)*, 80, 692-696.
- Sreenivasaprasad, S., Mills, P.R., Meehan, B.M., & Brown, A.E. (1996). Phylogeny and systematics of 18 *Colletotrichum* species based on ribosomal DNA spacer sequences. *Genome*, 39: 499-511.
- Sutton BC. (1990). Bitter rot. In: Jones AL, Aldwinckle HS (eds), Compendium of Apple and Pear Diseases. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, pp. 15-16.
- Sutton, B.C. (1992). The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In *Colletotrichum: biology, pathology and control* (eds. J.A. Bailey and M.J. Jeger). CAB International: Wallingford., 1-26.
- Sutton, T.B., & Valdebenito-Sanhueza, R.M. (1998). Necrotic leaf blotch of Golden delicious-Glomerella leaf spot: a resolution of common names. *Plant Disease* 82(3):267-268. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.3.267>
- Talamini, V & Bogo, A. (2009). Epidemiología e sistemas de previsão de doenças da macieira. Cap 2 en Manejo integrado de Doenças da macieira/ Editor Marciel J. Stadnik – Florianópolis: CCA-UFSC. 229p. ISBN 978-85-904597-2-9
- Talhinhas, P., & Baroncelli, R. (2021). *Colletotrichum* species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity*, 110(1), 109-198. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9>
- Templeton, M. D., Rikkerink, E. H., Solon, S. L., & Crowhurst, R. N. (1992). Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene*, 122(1), 225-230.

Tonin, R.F.B., Avozani, A., Durante Danelli, A.L., Reis, E.M., Zoldan, S.H., & Garcés Fiallos, F.R. (2013). *In vitro* micelial sensitivity of *Macrophomina phaseolina* to fungicides. *Pesq. Agropec. Trop.*, 43(4):460-466.

Toranzo, J. (2016). Producción mundial de manzanas y peras. 1a ed. - Allen Río Negro: Ediciones INTA, Libro digital, ISBN 978-987-521-696-9.39p

Trapero, A., Blanco, M. A. (2008) en Enfermedades, D. B., Fernandez-Escobar, R., & Rallo, L. El cultivo del olivo. *Mundi-Prensa*, Madrid.

Travadelo, M., Perren, R.A., Maina, M.A., Rossler, N., Brizi, M.C., (2015). Capítulo 13 Sistemas productivos. n: Gariglio, N.F., Bouzo, C., & Travadelo, M. (Editores). Cultivos Frutales y Ornamentales para zonas templado-cálidas. Experiencias en la zona central de Santa Fe. Ediciones UNL, Santa Fe, 292 pp.

Udayanga, D., Manamgoda, D.S., Liu, X., Chukeatirote, E., & Hyde, K.D. (2013). What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits? *Fungal Diversity*. 61, 165-179.

USDA (United States Department of Agriculture, Foreign Agriculture Service). (2022). Fresh Apples, Grapes, and Pears: World Markets and Trade.

Vásquez-López, A., Hernández-Castro, E., Mora-Aguilera, J. A., Nava-Díaz, C., & Sánchez-García, F. (2012). Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. *Agrociencia*, 46(8), 757-767.

Velasco, R., Zharkikh, A., Affourtit, J., Dhingra, A., Cestaro, A., Kalyanaraman, A., ... & Viola, R. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus domestica* Borkh.). *Nature genetics*, 42(10), 833-839.

Velho, A.C., Stadnik, M.J., Casanova, L., Mondino, P., & Alaniz, S. (2014). First report of *Colletotrichum nymphaeae* causing apple bitter rot in southern Brazil. *Plant disease*, 98(4), 567-567.

Velho, A.C., Alaniz, S., Casanova, L., Mondino, P., & Stadnik, M.J. (2015). New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. *Fungal Biology*, 119(4), 229-244.

Velho, A.C., Rockenbach, M.F., Mondino, P., & Stadnik, M.J. (2016). Modulation of oxidative responses by a virulent isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves. *Fungal biology*, 120(10), 1184-1193.

Velho, A. C., Stadnik, M. J., & Wallhead, M. (2019). Unraveling *Colletotrichum* species associated with Glomerella leaf spot of apple. *Tropical Plant Pathology*, 44(2), 197-204.

- Vieira W.A., Bezerra P.A, Da Silva A.C, Veloso J.S, Câmara M.P.S, & Doyle V.P. (2020). Optimal markers for the identification of *Colletotrichum* species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 143. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106694>
- Vierheilig, H., Knoblauch, M., Juergensen, K., van Bel, A.J.E., Gundler, F.M.W., & Piche, Y. (2001) Imaging arbuscular mycorrhizal structures in living roots of *Nicotiana tabacum* by light, epifluorescence, and confocal laser scanning microscopy. *Canadian Journals of Botany*. 79: 231 – 237.
- Wang, C. X., Zhang, Z. F., Li, B. H., Wang, H. Y., & Dong, X. L. (2012). First report of Glomerella leaf spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China. *Plant Disease*, 96(6), 912-912.
- Wang, W., Fu, D., Zhang, R., & Sun, G. (2015) (a). Etiology of apple leaf spot caused by *Colletotrichum* spp. *Mycosystema*, 34(1), 13-25.
- Wang, B., Li, B. H., Dong, X. L., Wang, C. X., & Zhang, Z. F. (2015) (b). Effects of temperature, wetness duration, and moisture on the conidial germination, infection, and disease incubation period of *Glomerella cingulata*. *Plant Disease*, 99(2), 249-256.
- Wang, N., Xu, J., Zhao, X., Wang, M., & Zhang, J. (2020). First report of Glomerella leaf spot of apple caused by *Colletotrichum asianum*. *Plant Disease*, 104(10), 2734-2734.
- Weir, B.S., Johnston, P.R., & Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology*, 73, 115-180.
- Wharton, P.S. & Diéguez-Uribeondo, J. (2004). The Biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 61:3-22.
- Wingfield, M.J., De Beer, Z.W., Slippers, B., Wingfield, B.D., Groenewald, J.Z., Lombard, L., & Crous, P.W. (2012). One fungus, one name promotes progressive plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(6), 604-613.
- Yokosawa, S., Eguchi, N., Kondo, K.I., & Sato, T. (2017). Phylogenetic relationship and fungicide sensitivity of members of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex from apple. *Journal of General Plant Pathology*, 83(5), 291-298.
- Zhang, Z., Yan, M., Li, W., Guo, Y., & Liang, X. (2021). First Report of *Colletotrichum aenigma* causing Apple Glomerella Leaf Spot on the *Granny Smith* Cultivar in China. *Plant Disease*, PDIS-10.

