



CAPÍTULO 6

Cítricos

Guignardia citricarpa Kiely (Mancha negra de los cítricos)

Haeltermann, R.; Dummel, D.; Kornowski, M.; Agostini, J.P.; Haberle, T. y R. Moschini

150	<i>Introducción</i>
150	<i>Nombre del agente y sinonimias</i>
151	<i>Hospedantes</i>
151	<i>Síntomas</i>
152	<i>Métodos de Diagnóstico</i>
152	<i>Diagnóstico serológico</i>
153	<i>Diagnóstico molecular</i>
154	<i>Técnica de papel nucleico</i>
154	<i>Epidemiología. Ciclo biológico</i>
155	<i>Dinámica de la liberación de ascosporas</i>
155	<i>Control y Manejo</i>
156	<i>Método de TRV (Volumen de la fila de árboles)</i>
158	<i>Sistema de Pronóstico de Enfermedades: Modelización de una función para pronóstico de mancha negra de los cítricos</i>
160	<i>Bibliografía</i>

Introducción

La mancha negra de los cítricos es una enfermedad del fruto que afecta a su corteza pero no causa podredumbre. El limonero es particularmente sensible y, cuando aparece la enfermedad por primera vez en alguna zona, es esta especie, generalmente, la primera afectada. Las pérdidas pueden ser grandes en cultivos de maduración tardía, como la naranja Valencia. Los frutos con mancha negra son desechados para su comercialización en fresco, aunque pueden utilizarse para la industria. A menudo, los frutos afectados de manera importante, caen prematuramente.

Aparece en regiones subtropicales con precipitaciones en verano. La enfermedad ha sido detectada en Argentina, Brasil, Hong Kong, China, Indonesia, Japón, Kenia, Nigeria, Mozambique, Filipinas, Perú, Suazilandia, Taiwán, Uruguay, Venezuela, Zimbabue, las zonas de Sudáfrica con precipitaciones en verano y las zonas costeras de Australia (Kotzé, 2000). En el 2010 se constató su presencia en Florida, EEUU (NAPPO, 2010).

Fue descrita por primera vez en 1895, en Australia, en áreas próximas a Sidney, causando pérdidas significativas en frutos de naranja "Valencia" (Kiely, 1948).

En Brasil el primer reporte fue en el año 1940 en el Estado de San Pablo (Goes & Feichtenberger, 1993). En Argentina, el agente causal habría sido aislado por primera vez en 1968-1969, por técnicos de INTA - EEA Concordia, desde frutos de naranjo dulce procedentes de Misiones (Fernández Valiela, 1978). Las primeras observaciones de lotes con síntomas en el país datan del año 1977 en Alto Paraná, Misiones (Contreras, 1994), de 1980 en Corrientes (Canteros, 1994) y de 1987 en Entre Ríos, donde los primeros frutos de naranjo Valencia afectados fueron recolectados en galpones de empaque (Garrán, 1994). En la región citrícola de Jujuy y Salta las primeras observaciones en campo de la enfermedad fueron en el año 1982 (Vigiani *et al.*, 1996).

La mancha negra de los cítricos es de importancia económica porque afecta la producción, el aspecto del fruto y la comercialización

de frutas frescas. Esta plaga cuarentenaria en varios países, restringe la comercialización de material de propagación, mudas y frutos (Aguilar-Vildoso *et al.*, 2002). Estos factores causan pérdidas para diversas zonas productivas en la Argentina debido a las restricciones fitosanitarias impuesta por la Comunidad Europea y EEUU.

Nombre del agente y sinonimias

El estado anamorfo del patógeno responsable de la mancha negra fue conocido, durante muchos años, como *Phoma citricarpa* McAlpine, 1899. Posteriormente, fue cambiado por *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa, 1973. El teleomorfo es *Guignardia citricarpa* Kiely, 1948 y nunca se encuentra en el fruto (Kotzé, 2000).

Los peritecios de *G. citricarpa* se encuentran en las hojas en descomposición y son la fuente más importante del inóculo. Se encuentran en forma agregada y de aspecto globosos (100-175 µm de diámetro), con un ostiolo circular no papilado. Las ascas son claviformes, cilíndricas, portando 8 ascosporas. Las ascosporas no son septadas, son hialinas, con multitud de canales y cilíndricas, aunque hinchadas en el centro (12,5-16 × 4,6-6,5 µm), con extremos obtusos, cada uno con un apéndice incoloro (Kotzé, 2000).

Los picnidios, pardo-oscuros o negros (115 a 190 µm de diámetro), se encuentran en lesiones de frutos y hojas y ocasionalmente en el pedúnculo del fruto de limones fuertemente infectados. Los conidios pueden tener forma desde oval a elípticas (8-10 × 5,5-7 µm), hialinas, no tabicadas y acanaladas, con un apéndice incoloro subulado (Kotzé, 2000).

En 1964 se descubrió que había dos especies morfológicamente idénticas del género *Guignardia*, una puede causar la mancha negra de los cítricos y la otra aparece endofíticamente y causa infecciones sin síntomas en muchas plantas. La especie no patogénica crece generalmente más rápidamente en medios de cultivos que la patogénica y se llama *Guignardia mangiferae* Roy, 1968 (Kotzé, 2000), actualmente clasificada como *Phyllosticta capitalensis* Henn., 1908 (Glienke *et al.*, 2011).

Hospedantes

La mancha negra afecta numerosas especies de cítricos, siendo las más susceptibles el limonero, las naranjas dulces y algunas mandarinas. El limonero es la única especie donde puede observarse síntomas de mancha negra en hojas (Agostini *et al.*, 2005b). Las naranjas tardías, tales como Valencia y Folha Murcha, son más susceptibles a esta enfermedad que las variedades de naranjas más tempranas. También puede producir problemas serios en pomelos, especialmente si se cosechan tarde. Dentro del grupo de las mandarinas ha sido detectada en el tangor Murcott, las mandarinas comunes, Fortune y Nova. Hasta el presente no se han detectado síntomas de mancha negra en las mandarinas del grupo Satsuma, del grupo Clementina o del limonero Tahití (Agostini *et al.*, 2005a).

También hay muchas otras especies no cítricas reportadas como hospederos de este patógeno, tales como *Prunus dulcis*, *Persea americana*, *Eucalyptus* sp, *Manguifera indica*, *Passiflora edulis* y varias ornamentales (EPPO, 2008).

Síntomas

Los síntomas foliares se ven raramente en las plantaciones bien manejadas de naranjo. Cuando la enfermedad está presente, los síntomas aparecen como pequeños puntos necróticos, redondos y hundidos con centros grises, cada uno de ellos rodeado por un anillo pardo oscuro y un halo amarillo, aunque este último no siempre es evidente. Los puntos en las hojas aparecen más comúnmente en limones, donde los pedicelos del fruto pueden mostrar también lesiones (Foto 76) (Kotzé, 2000).

Los síntomas en frutos varían hasta el punto de que existe cierta confusión en cuanto a sus características y descripciones (Foto 77). Se distinguen 4 tipos de lesiones: Los *puntos duros* o "*hard spot*" son lesiones más o menos circulares, hundidas y de color rojo ladrillo, con bordes de color pardo a negro y tejido necrótico gris en los centros (Foto 78). Los picnidios están

presentes normalmente, aunque no en todos los casos. Aunque estas lesiones son los síntomas más típicos de la mancha negra, el hongo causal es aislado desde ellos con poca frecuencia. Los puntos duros son síntomas en precosecha y se desarrollan en la parte del fruto que está más expuesta a los rayos del sol (Kotzé, 2000). Sinonimias según región: típica, con picnidios, "*hard spot*".

La *falsa melanosis* o *sarpullido* ("*speckled blotch*") (numerosos puntos de color pardo oscuro), aparecen pronto en el fruto aún verde e inmaduro pero no contienen picnidios (Kotzé, 2000). Este síntoma se presenta únicamente en limones. En la región del noroeste argentino se denomina "moteado tipo melanosis" y está relacionado con *G. mangiferae* (Agostini, 2007), mientras que en otras regiones se denomina mancha tinta (Foto 79).

Las *manchas virulentas* se desarrollan cuando la fruta está muy madura y las temperaturas son altas. Estas lesiones son deprimidas, de color marrón a rojizo y forma irregular y crecen rápidamente. En todos los casos las lesiones son superficiales, aunque en casos severos produce la caída desde el árbol, reduciendo los rendimientos. En algunas zonas es denominado mancha castaña (Agostini, 2007) (Foto 80). La *mancha rojiza*, también denominada según las regiones productoras como nueva, inicial o de poscosecha, que se puede observar en frutas maduras de naranja y limón (Foto 81). Puede evolucionar hasta producir el síntoma verdadero ("*hard spot*"), aunque en este estado mencionado no forma cuerpos fructíferos. Este tipo de síntoma puede confundirse por daño fisiológico causado por frío o bajas temperaturas en el almacenamiento de frutas (Agostini, 2007).

Se puede considerar un quinto síntoma al cual se lo denomina *constelación* el que consiste en una serie de puntos marrones que rodean a los síntomas descritos en primer y segundo caso (Foto 82).

Métodos de diagnóstico

Diagnóstico serológico

Para la producción del antisuero se utilizaron las proteínas solubles de una cepa de *G. citricarpa* aislada en INTA - EEA Bella Vista. El hongo se multiplicó en caldo papa glucosado en agitación, a 28°C. El micelio se filtró y se trituró con nitrógeno líquido. Para separar las proteínas solubles se le agregó al micelio sulfato de amonio saturado (solución final 66%), realizando luego tres diálisis con tampón fosfato salino (PBS). Con este inmunógeno se realizaron cinco inyecciones intramusculares a un conejo, de 1 mg de proteínas cada una, seguida de dos endovenosas de 0,4 mg.

Para el diagnóstico serológico de mancha negra, se implementó el TAS ELISA con fracción *Fab*. Se purificó la IgG, a partir del antisuero obtenido, precipitando con sulfato de amonio y dializando con tampón PBS. Los fragmentos *Fab* se obtuvieron utilizando el kit Immunopure *F(ab)* del laboratorio Pierce®. Para una completa separación de la fracción variable, se realizó una diálisis con tubos *Spectra Por 7 MWCO 50KD*. Para determinar las concentraciones de uso, se efectuaron varias calibraciones, probando diferentes concentraciones de cada uno de los reactivos: fracción *Fab* (0,1 a 3 µg/ml), IgG (0,1 a 1,0 µg/ml) y conjugado enzimático con fosfatasa alcalina (*Pierce*) (1/50.000 hasta 1/200.000). La mejor reacción fue sensibilizando con fracción *Fab*, 1 µg/ml, IgG 1µg/ml y conjugado enzimático 1/150.000.

El protocolo utilizado para TAS ELISA fue el siguiente: sensibilización con fracción *Fab*

en tampón cobertura, dejando toda la noche a 4°C; bloqueo con leche descremada al 5%, durante 1h a 28°C; agregado de las muestras, en tampón extracción, por 3hs a 28°C; adición de la IgG en tampón PBS+PVP+Tween, dejando toda la noche a 4°C; agregado del conjugado enzimático en tampón de conjugado, por 2hs a 28°C; revelado con sustrato p-nitrofenil fosfato en tampón sustrato.

Entre cada paso se lava la placa de 3 a 5 veces con PBS más Tween. Los tampones utilizados son los de uso corriente para esta técnica.

Para determinar la especificidad del antisuero se probó micelio de *G. citricarpa* con el de otros hongos (*Phytophthora* y *Fusarium*), moliendo en tampón extracción. No hubo reacción cruzada con ellos (Fig. 6.1).

Se realizaron análisis con material vegetal enfermo y para ello se molieron lesiones a partir de frutos de mandarina y limón con mancha negra. La molienda se realizó con nitrógeno líquido y con el agregado tampón de extracción. Se siguió el mismo protocolo detallado anteriormente.

Se distinguieron claramente las frutas con mancha negra de las sanas (Fig. 6.2).

Se procedió a analizar si esta técnica podía diferenciar *G. citricarpa* de *G. mangiferae*. Para ello se probaron distintas concentraciones de micelio de ambas especies. Se observó que el antisuero reconocía la cepa de *G. mangifera*, aunque con valores de absorbancia menores comparado con los de *G. citricarpa* a igual concentración de micelio. No fue posible diferenciar las dos especies con este antisuero.

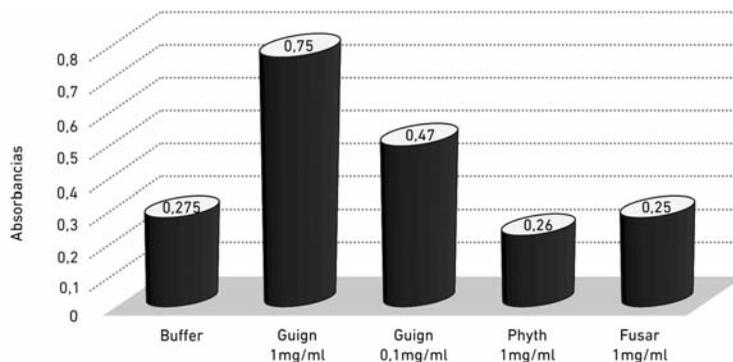


Figura 6.1. TAS-ELISA comparativo con micelios de diversos hongos *G. citricarpa*, *Phytophthora* spp. y *Fusarium* spp.

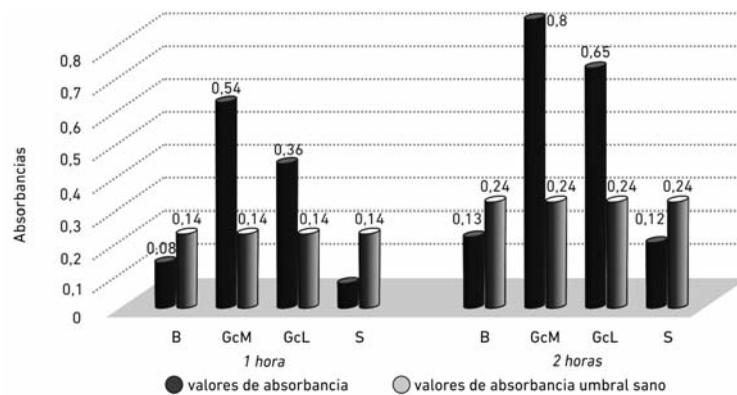


Figura 6.2. TAS-ELISA desde frutos cítricos con síntomas de mancha negra causada por *G. citricarpa*. Ref: B: buffer utilizado; GcM: *Guignardia citricarpa* mandarina; GcL: *Guignardia citricarpa* limón y S: anti-suero.

Diagnóstico molecular

Se puso a punto el PCR con los primers propuestos por Peres *et al.*, 2007 para la identificación de *G. citricarpa*. Estos primers reconocen la región ITS.

- GCN 5'CTGAAAGGTGATGGAAGGGAGG 3'
- GCMR 5'CATTACTTATCGCATTTCGCTGC 3'

Utilizando frutos de naranja y pomelo con mancha negra, tomando la zona de las lesiones y moliendo las mismas con nitrógeno líquido. El DNA se extrajo con el kit DNAeasy Plant Mini Kit® (Qiagen). La mastermix se realizó con: Buffer 1x, mg cl 4mM, dNTP 0,5mM, GCN 0,4μM, GCMR 0,4μM, Taq IU y Iul de DNA. Se realizaron 40 ciclos de 94° 30 seg, 64° 30 seg y 72° 1min.

Posteriormente los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1,5% y se tiñeron con una solución de bromuro de etidio, observándolos en transiluminador.

Se obtuvo la banda esperada de 300 pb en las muestras con mancha negra (Fig. 6.3).

Para determinar si se lograba la diferenciación de las dos especies de *Guignardia*, *G. citricarpa* (cuarentenaria) y *G. mangiferae* (no cuarentenaria) en la misma reacción, se realizó un duplex, utilizando los primers anteriormente citados agregándole los GMN (Peres *et al.*, 2007), que detecta *G. mangiferae* (el primer reverse es el mismo para ambas especies). GMN 5`CGCTACAACGCCGAAATGA 3`.

La extracción del DNA, a partir de micelio, se realizó con kit DNAeasy Plant Mini Kit® (Qiagen). La mastermix fue similar a la anterior, agregando el cebador GMN en la misma

concentración que los anteriores (0,4 μM). Se logró diferenciar las dos especies, dando *G. citricarpa* una banda de 300 pb y *G. mangiferae* 290 pb, siendo esta técnica apta para discriminar entre ellas (Fig. 6.4).

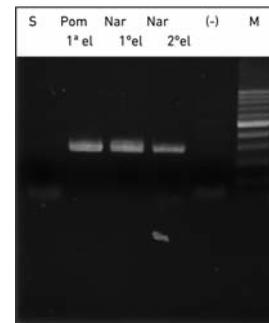


Figura 6.3. Gel de agarosa al 1,5% con producto de PCR primers GCN y GCMR. Ref: S: anti-suero; pom: pomelo; nar: naranja; (-): control negativo y M: marcador de peso molecular.

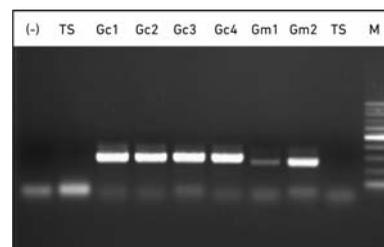


Figura 6.4. Gel de agarosa al 1,5% con corrida de productos de PCR cebadores GCN, GMN y GCMR que permiten diferenciar *G. citricarpa* una banda de 300pb y *G. mangiferae* 290pb. Ref: (-): control negativo; TS: tween; Gc1: *G. citricarpa* cepa 1; Gc2: *G. citricarpa* cepa 2; Gc3: *G. citricarpa* cepa 3; Gc4: *G. citricarpa* cepa 4; Gm1: *G. mangiferae* cepa 1; Gm2: *G. mangiferae* cepa 2 y M: marcador de peso molecular.

Técnica de papel nucleico

Se implementó la técnica de papel nucleico para simplificar la extracción del DNA y evitar las contaminaciones. Esta tiene la ventaja que se puede partir de la misma molienda de la prueba serológica.

Se maceraron lesiones de mancha negra de limón y mandarina en dilución 1/5 (p/v) con tampón extracción. Se sembraron 20 µl del homogenato sobre papel nucleico (Biodynamics®) dejándolo secar. Posteriormente se cortaron pequeñas porciones del papel, se introdujeron en tubos de 1,5 ml, conteniendo 100 µl de agua libre de nucleasas y se llevaron a 95°C durante 10 min.

La reacción de PCR se realizó igual que las anteriores, pero empleando 10 µl de esta suspensión (Fig. 6.5)

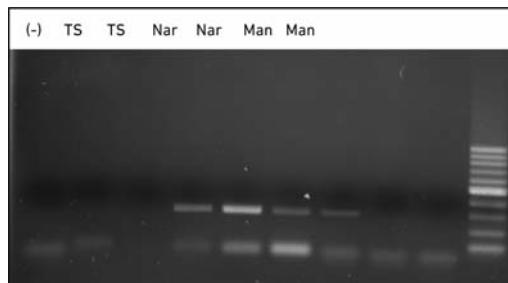


Figura 6.5. Gel de agarosa al 1,5% con corrida de productos de PCR primers GCN y GCMR. Ref: (-): control negativo; TS: tween; Nar: naranja; man: mandarina y M: marcador de peso molecular.

Epidemiología. Ciclo biológico

La epidemia de la mancha negra depende de la existencia de inóculo durante el verano, de las condiciones cálidas y húmedas favorables a la infección y del grado de desarrollo del fruto, en relación a su susceptibilidad a la infección (Kotzé, 2000).

La mancha negra de los cítricos presenta los ciclos primario y secundario bien distintos. El primario, representado por la fase sexual del hongo *G. citricarpa*, cuyas estructuras infectivas son las ascosporas, responsables de la introducción del patógeno en áreas libres de éstas e inicio de las epidemias en cada ciclo de cultivo. El ciclo secundario es caracterizado por la fase asexual del hongo

(*Phyllosticta citricarpa*), donde los conidios son responsables por el incremento de la enfermedad en la planta y en sus vecinos (Aguilar-Vildoso, 2002; Kiely, 1948).

Los conidios de los picnidios en las hojas muertas o en el fruto en el suelo no son transportados por el viento, pero pueden llegar a los frutos susceptibles al ser salpicados por las gotas de lluvia. Son insignificantes como fuente de inóculo, pero pueden causar infección desde el árbol si los frutos se recolectan en forma tardía. Tras la floración y el cuajado de nuevos frutos, los conidios pueden llegar a los frutos más jóvenes que se encuentran por debajo de los frutos maduros, debido a que todavía se hallan en la fase susceptible (Kotzé, 2000).

En Brasil observaron que después de 21 días bajo condiciones ambientales favorables, los picnidios se encontraban vacíos, indicando que una liberación completa de conidios ocurre antes de este período (Hoto *et al.*, 2001). Igualmente en Argentina se determinó que picnidios de frutas mantenidas en cámara húmeda por más de 14 días se manifestaban exhaustos en la liberación de conidios (Dummel *et al.*, 2009).

El período crítico de infección comienza en el cuajado de la fruta cuando llueve. El fruto sigue siendo susceptible durante 4-5 meses, después de los cuales ya no se produce infección, independientemente de las condiciones climáticas y la presencia de inóculo. Cuando la ascospora germina, produce un tubo germinativo y un apresorio, a partir del cual penetra en la cutícula y se expande formando una pequeña masa de micelio entre la cutícula y la epidermis. El hongo permanece en este estado de latencia hasta que el fruto está desarrollado o maduro; entonces, puede crecer más hacia el interior de la corteza, produciendo los síntomas de la mancha negra muchos meses después de que haya tenido lugar la infección. El desarrollo de los síntomas en frutos maduros se acelera con el ascenso de las temperaturas, las altas intensidades luminosas, la sequía, el envejecimiento del fruto y por el escaso vigor del árbol. Por lo general, los árboles viejos tienen más mancha negra que los jóvenes (Kotzé, 2000).

Dinámica de la liberación de ascosporas

Para determinar la relación entre la liberación de ascosporas y las distintas variables ambientales se utilizaron los datos diarios de capturas de ascosporas de dos campañas en plantaciones comerciales de naranja Valencia late comprendidos entre octubre 2008 y marzo 2009. Tanto para la primera como segunda campaña se analizó la liberación de ascosporas de *G. citricarpa* durante los meses comprendidos entre septiembre y marzo, observándose picos en diferentes momentos.

Se observó mayor número de ascosporas durante los meses de diciembre y enero para la campaña 2007/2008, mientras que durante el mes de febrero el mismo disminuyó volviéndose a incrementar en el mes de marzo. Para la campaña 2008/09 se observó un pico en el número de ascosporas entre los meses de octubre–noviembre, disminuyendo para el mes de diciembre e incrementando para los meses de enero–febrero–marzo. En ambas campañas se observó una estrecha relación con la ocurrencia de lluvias caídas y las altas temperaturas durante esos meses.

Existe una relación entre el número de captura de ascosporas de *G. citricarpa* con la temperatura y humedad relativa a lo largo de las 24 h del día en la estación de primavera, lo cual indica que durante las horas de la noche la humedad relativa aumenta mientras la temperatura disminuye, reduciendo a cero la captura de ascosporas, y durante el día al disminuir la humedad y aumentar la temperatura se produce liberación de ascosporas y un mayor número de capturas. La captura comienza a medida que la humedad relativa disminuye cerca del medio día, con un máximo de capturas entre las 16 h y 20 h, donde la humedad relativa comienza a aumentar nuevamente y las temperaturas empiezan nuevamente a bajar. La alta humedad relativa está estrechamente ligada a la presencia de rocío durante la noche, lo cual aceleraría la maduración de los peritecios y provocaría su apertura y liberación de las ascosporas al medioambiente durante las horas del día (Dummel *et al.*, 2012).

La temperatura promedio de los meses en

que se registraron capturas de ascosporas varió entre los 18 y los 30°C, con un pico de mínima de 5°C en el mes de septiembre, y un pico de máxima de 35°C para el mes de diciembre. Sin embargo, el número de capturas registrado durante el mes de septiembre fue menor en relación a los otros meses. Las precipitaciones variaron a lo largo de los 6 meses, con una variación de 7 mm a 344 mm caídos. Las menores precipitaciones ocurrieron durante los meses de septiembre, noviembre, febrero y marzo. Los meses de octubre diciembre y enero fueron los que presentaron la mayor concentración de precipitaciones, con lluvias distribuidas a lo largo de todas las semanas, salvo para el mes de enero en el que no se observó una distribución tan uniforme. Octubre del 2008 y enero del 2009 alcanzaron los 80 mm de lluvias caídas para un solo día. Los días posteriores a las precipitaciones se registraron temperaturas bajas. La duración del mojado de hoja dependió de las lluvias caídas y de las temperaturas presentes. Días donde no se registraron lluvias, pero que tuvieron noches con alta humedad relativa y bajas temperaturas presentaron igualmente mojado en superficie de la hoja (Dummel *et al.*, 2012).

Existe una estrecha relación entre temperaturas, lluvias, horas de mojado de hoja y capturas de ascosporas. Alternancia de días secos seguidos de días húmedos influyen en la dinámica de liberación de ascosporas.

Manejo de la enfermedad

En países y zonas donde no se encuentra la enfermedad es importante evitar su introducción. La manera más común de introducirla es a través del material vegetativo; plantas de viveros infectadas, yemas procedentes de plantas infectadas y, posiblemente, hojas que acompañan a la fruta no tratada. La fruta comercializada no se considera un peligro importante, ya que sobre ella únicamente se producen picnidios. Los mismos no son iniciadores de epidemia, pues los conidios no son transportados por el aire y, por lo tanto, no se diseminan tan lejos como las ascosporas (Agostini *et al.*, 2005b).

Esta enfermedad puede estar durante muchos años en una zona produciendo pocas lesiones antes de ser descubierta. Es importante tomar medidas preventivas porque, una vez establecida, resulta casi imposible erradicarla, especialmente considerando que es muy difícil diferenciar la forma saprófita de la patógena del hongo. Una práctica que ayudaría a controlar la mancha negra consiste en la eliminación de la hojarasca, principal fuente de inóculo. Para ello, se debe enterrar mecánicamente o, tal como se hace usualmente en Brasil, tapar con el “mulching” resultante del paso de la desmalezadora por el centro de la calle. En su defecto, se puede tratar la hojarasca con algún producto químico, como ser urea o cal. A pesar de la elevada susceptibilidad del limonero a la mancha negra, una sola aplicación de productos sistémicos entre los 60 y los 90 días posteriores a la floración permite lograr un buen control.

Las capturas de esporas, junto con los registros de lluvias y temperaturas, se han utilizado con éxito en Sudáfrica para determinar el momento y la intensidad de la liberación de las ascosporas. El comienzo del período crítico se puede predecir satisfactoriamente para determinar el momento más oportuno de las aplicaciones químicas. El número de tratamientos que se requiere en un programa preventivo depende en gran medida de la edad del árbol, del vigor del árbol, del cultivar y de las condiciones ambientales. Los productos a utilizar son los benzimidazoles (benomil, carbendazim) o estrobilurinas. Para el caso de las naranjas, en particular aquellas de ciclo tardío como “Valencia” y “Folha Murcha”, es necesario proteger la fruta desde la primavera, durante la liberación de ascosporas (octubre–noviembre, dependiendo de la zona), hasta mediados del verano (enero–febrero), cuando la fruta adquiere resistencia. En plantaciones afectadas, las pulverizaciones con cobre o carbendazim en marzo ayudan a disminuir los daños por esta enfermedad. En todos los casos, es conveniente combinar los productos con aceites minerales. En frutas asintomáticas, las pulverizaciones con productos sistémicos realizadas 15 días antes de la cosecha no reducen significativamente el

desarrollo de síntomas en poscosecha (Agostini, 2007).

Método de TRV (*Tree Row Volume-Volumen de la fila de árboles*)

A los efectos de maximizar la calidad de los tratamientos para un adecuado control de mancha negra fueron incorporadas herramientas tecnológicas bajo el concepto de TRV que se basa en el ajuste del volumen de caldo a aplicar por hectárea en función del tamaño de los árboles. Además mediante la incorporación de picos inyectoros de aire (ID) en equipos atomizadores de alto volumen se puede optimizar la eficiencia de dichos equipos con la finalidad de utilizar menores volúmenes de agua en plantaciones de naranja Valencia (*Citrus sinensis* L. Osb.) altamente susceptible a esta enfermedad. Las aplicaciones durante las diferentes campañas fueron realizadas sobre esta variedad con una altura promedio de plantas de 5,5 m. y el diámetro en dirección del ancho de la fila de 5 m. Por lo tanto para la determinación del volumen de agua a aplicar por hectárea se utiliza el concepto de TRV basado en la siguiente fórmula: $Q \text{ (l/ha)} = [(10.000) \times (h) \times (a) \times (i) \times (0.0937)] / (d)$. Donde: $Q \text{ (l/ha)}$ = caudal litros por hectárea, h = altura de las plantas en metros, a = ancho máximo de la fila en metros, d = distancia entre filas en metros, i = índice de ajuste por densidad foliar (0,7 a 1,2), y 0,0937 = coeficiente de saturación foliar (lts./m³ de copa). De acuerdo a trabajos experimentales realizados con pulverizadoras atomizadoras, el volumen de líquido requerido para saturar 1 m³ de copa con una densidad adecuada de gotas es igual a 937 ml. En este ensayo se utilizó como coeficiente de densidad foliar = 1. Los ensayos se realizaron durante las campañas 2005/06, 2006/07, 2007/08 y 2008/09 utilizándose pulverizadoras ajustadas a los volúmenes a utilizar con los productos mencionados en Tabla 6.1 en los momentos considerados como críticos. Todos los tratamientos efectuados durante las tres campañas con aplicaciones reducidas en volumen TRV = -50% y TRV= -60% mediante el empleo de picos ID, demostraron ser

efectivos para el control de mancha negra, sin presentar diferencias significativas con respecto al tratamiento estándar TRV=1 (Tabla 6.2). Todos los tratamientos fueron significativos con respecto al testigo sin pulverización alguna. La incorporación de picos ID 90-02 en turbinas de alto volumen brindaría una alternativa para disminuir los volúmenes de agua e insumos aplicados por hectárea en forma sustentable. La duplicación de la concentración de productos en el tanque de la pulverizadora en el caso de usar equipos de aplicación en bajo volumen es eficiente para este tipo de prácticas.

Tabla 6.1. Productos utilizados para el control de mancha negra (*Guignardia citricarpa* Kielly) en naranja Valencia, concentración calculada para TRV=1, ajustadas para los tratamientos determinados en alto volumen.

Agroquímicos		Dosis en 1000 lts. ⁽²⁾ para TRV=1
Principio activo	Nombre comercial	
Oxicloruro de cobre	Caurifix®	3 kg.
Hidróxido de cobre	Champion®	2,2 kg.
Trifloxistrobin	Flint®	0,1 kg.
Piraclostrobin	Comet®	0,2 lts.
Aceite mineral	YPF curafrutal®	5 lts.

⁽²⁾ Las aplicaciones de bajo volumen de TRV=-50%, -60% y -70% las dosis de agroquímicos fueron duplicadas.

Tabla 6.2. Resultados de la incidencia y severidad de mancha negra (*Guignardia citricarpa* Kielly) y porcentaje de disminución de la enfermedad con respecto al testigo en fruta de naranja Valencia para los diferentes tratamientos de TRV para los tres años de ensayo

Tratamiento	Año 2006			Año 2007			Año 2008		
	Incidencia (%)	Reduc. (%)	Severidad (0-4)	Incidencia (%)	Reduc. (%)	Severidad (0-4)	Incidencia (%)	Reduc. (%)	Severidad (0-4)
TRV-70% ID	9,06 A	86,82	0,10 A	15 B	53,23	0,23 B			
TRV-60% ID							17,67 A B	82,81	0,31 A
TRV-50 % ID	8,38 A	87,81	0,11 A	0,67 A	97,91	0,0 A	34 B	64,95	0,67 A
TRV = 1	4,55 A	93,38	0,05 A	4,67 A	85,44	0,03 A B	11 A	88,66	0,21 A
TRV-70% BV	23,07 B	66,43	0,29 B	7,3 A B	77,24	0,13 A B			
Testigo	68,72 C		1,37 C	32,07 C		0,63 C			
TRV-50% BV				7,67 A B	76,08	0,13 A B			
TRV-60% BV							13 A B	86,60	0,22 A

Sistema de pronóstico de enfermedades: modelización de una función para pronóstico de mancha negra de los cítricos

Para la modelización de una función para pronóstico de mancha negra, y en base a las variables analizadas, los valores diarios de ascosporas capturadas fueron acumulados semanalmente. Los datos fueron agrupados en valores semanales de ascosporas capturadas ($N=28$), las cuales se categorizaron en función de valores umbrales: nivel severo (ascosporas mayores a 25), nivel moderado (ascosporas menor o igual que 25 y mayor que 5) y nivel ligero a nulo (ascosporas menor o igual a 5).

De los datos obtenidos de la estación meteorológica y el cazaesporas se pudo obtener una función que explique cuáles son los factores ambientales que influyen más fuertemente en la liberación de ascosporas de *G. citricarpa*.

Las más altas correlaciones (r_k : coeficiente de Kendall) entre los niveles de ascosporas capturadas semanalmente y las variables meteorológicas analizadas individualmente, se encontraron cuando estas últimas fueron procesadas en el lapso previo de 7 días (Tabla 6.3). Desde el punto de vista térmico es destacable la correlación negativa de la temperatura máxima media, coherente con el bajo umbral para la temperatura máxima (29°C) establecido en la variable DT ($r_k=0,52$). La más alta correlación de la variable NdPr (días con lluvias $\geq 0,2$ mm) se obtiene cuando se contabilizan lluvias diarias $\geq 0,2$ mm ($r_k=0,58$), bajando la correlación cuando solo se consideran precipitaciones mayores a 1 mm ($r_k=0,54$) y a 3 mm ($r_k=0,47$). Cuando a la ocurrencia de precipitación se le incorpora un umbral máximo de amplitud térmica ($At=T_{max}-T_{min}$), se logra incrementar la correlación con los montos totales semanales de ascosporas capturadas (variable DPrAt; $r_k=0,67$). La máxima correlación se obtiene sumando DPrAt con los días sin precipitación y baja amplitud térmica (DsPrAt). La variable resultante (DMojt) contabiliza los días de mojado total originados ya sea por lluvia o por rocío. Por la magnitud de la correlación se destaca la variable DMoj, que calcula el total de días

con duración de mojado superior a 10 horas ($r_k=0,68$), debiendo contar en este caso con un sensor que permita su medición (escasa disponibilidad en las redes de estaciones meteorológicas de Argentina). Las correlaciones bajan a 0,60 y 0,58 cuanto se cuentan los días con más de 9 horas y 8 horas con mojado. (Dummel *et al.*, 2012).

El método de selección de variables Stepwise del Proc Logistic (NSE y NSP 0,01) definió un modelo que incluye solo a la variable DMojt; Modelo I (Tabla 6.4). El modelo bivariado más apropiado (NSE y NSP 0,05) integró a las variables DMojt y a DT (Modelo II). El modelo I clasificó correctamente 19 de las 28 observaciones de ascosporas capturadas semanalmente, categorizadas ordinalmente (67,9% de precisión de predicción). El modelo II fue preciso en 23 casos de los 28 observados (82,1% de precisión de predicción).

Tabla 6.3. Coeficientes de correlación (r_k) de Kendall de variables meteorológicas en relación a los niveles ordinales de ascosporas capturadas cada siete días (severo, moderado y ligero-nulo).

Respuesta Ordinal	
Variabes	r_k
DT	0,52
TmáxM	-0,19
TmínM	0,30
NdPr	0,58
PrAc	0,42
DPrAt	0,67
DsPrAt	0,27
DMojt	0,71
DuMojt	0,53
DMoj	0,68

DT: número de días con $T_{mín} > 20^{\circ}\text{C}$ y $T_{máx} < 29^{\circ}\text{C}$;
 TmáxM: temperatura máxima media;
 TmínM: temperatura mínima media;
 NdPr: días con lluvias $\geq 0,2$ mm;
 PrAc: precipitaciones diarias acumuladas;
 DPrAt: número de días con registros de $Pr \geq 0,2$ mm y $At < 14,2^{\circ}\text{C}$;
 DsPrAt: días sin registro de precipitación ($Pr < 0,2$ mm) y $At < 7^{\circ}\text{C}$;
 DMojt: DPrAt + DsPrAt;
 DuMojt: duración de mojado total en horas;
 DMoj: días con duración de mojado > 10 h.

Tabla 6.4. Modelos logísticos para estimar la probabilidad de ocurrencia de cada categoría de ascosporas capturadas semanalmente: Ordinal: severa (s), moderada (M) o ligera a nula (L), en base a variables meteorológicas simples

Modelo	Ecuaciones del Modelo*	Precisión %
I	LogitPrS= - 4,553 + 1,6015 * DMOjt	67,9
	LogitPrMac= - 1,1165 + 1,6015 * DMOjt	
II	LogitPrS= -6,1318 + 1,8108 DMOjt + 3,4829 DT	82,1
	LogitPrMac= -1,6652 + 1,8108 DMOjt + 3,4829 DT	

*LogitPrS=ln(prs/1-prs); LogitPrMac=ln(prmac/1-prmac). Resolviendo las expresiones $\text{Exp}(\text{LogitPrS}) / (1 + \text{Exp}(\text{LogitPrS}))$ y $\text{Exp}(\text{LogitPrMac}) / (1 + \text{Exp}(\text{LogitPrMac}))$ se obtienen los valores de prs (probabilidad de observar un nivel semanal de esporas atrapadas (s)) y prmac (probabilidad acumulada de ocurrencia de un nivel de atrape de ascosporas mayor o igual al moderado (M)). Ln es el logaritmo natural. $\text{PrM} = \text{PrMac} - \text{PrS}$. $\text{PrL} = 1 - (\text{PrS} + \text{PrM})$ siendo PrL la probabilidad de observar un nivel de ascosporas ligero a nulo (L). DPrat: número de días con registros de pr ≥ 0,2 mm y $At < 14,2^\circ\text{C}$; DSpfat: días sin registro de precipitación ($pr < 0,2$ mm) y $At < 7^\circ\text{C}$; DMOjt: DPrat + DSpfat.

Algunas variables meteorológicas identificadas en este estudio lograron explicar fuertemente la variabilidad en el número de ascosporas capturadas semanalmente en la campaña 2008-2009, en Montecarlo. Se destacaron especialmente las variables: número de días con registros de precipitaciones mayor o igual a 0,2 mm y amplitud térmica menor a 14°C (DPrat) y días con duración de mojado mayor a 10 horas (DMOjt) (Dummel *et al.*, 2012).

El seguimiento de la evolución semanal de los valores de probabilidad de ocurrencia de niveles de ascosporas capturadas severas (Modelo II), junto a la evolución de la principal variable regresora: días de mojado totales (DMOjt) calculada en los siete días previos, fue

ploteada para Montecarlo para la campaña 2008/09. Se destacó una buena correspondencia entre los valores de probabilidad de tener niveles severos de ascosporas capturadas y la evolución de los días de mojado totales (DMOjt), con los valores semanales observados de ascosporas capturadas (Fig. 6.6) (Dummel *et al.*, 2012).

Se ha confeccionado una hoja de cálculo a fin de introducir estas variables meteorológicas del modelo y poder determinar en forma práctica y en tiempo real la necesidad de aplicaciones de agroquímicos en base a la probabilidad de existencia de un pico de liberación de ascosporas durante los meses de susceptibilidad de la fruta.

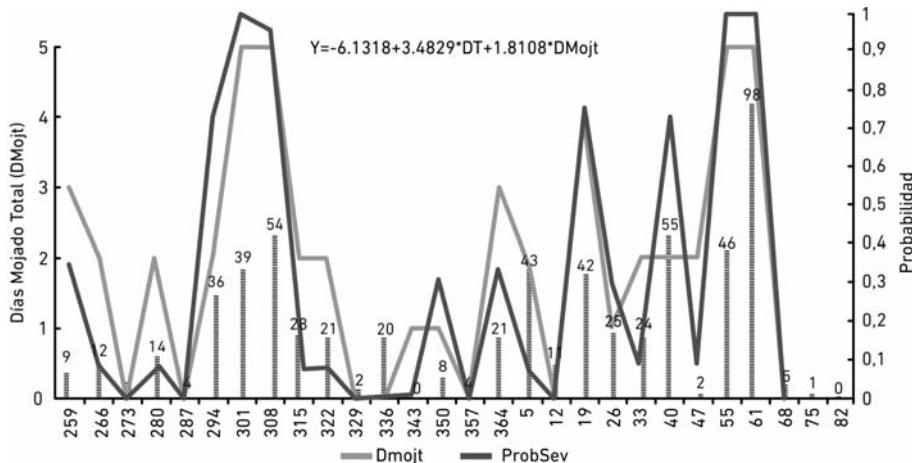


Figura 6.6. Evolución de la probabilidad de ocurrencia de una captura semanal de ascosporas severa (>25 ascosporas) (ProbSev), estimada por modelo II de Tabla 3 y de los valores de la principal variable regresora DMOjt, para la campaña 2008/2009 (donde DMOjt= DPrat+ DSpfat, siendo DPrat: número de días con registros de pr ≥ 0,2 mm y amplitud térmica < 14,2°C y DSpfat: días sin pr y amplitud térmica < 7°C, en lapsos de 7 días previos a cada observación).

Bibliografía

- AGOSTINI, J. P. 2007. Árboles Frutales: Ecofisiología, Cultivo y Aprovechamiento. Capítulo 15: 499–501. Editorial Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires.
- AGOSTINI, J. P.; ANDERSSON, H. G. y V. SEIBERT. 2005a. Tolerancia de mandarina “Okitsu” a las enfermedades cuarentenarias de frutas cítricas en Misiones, Argentina. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Carlos Paz, Provincia de Córdoba, Argentina. Actas, pp. 224.
- AGOSTINI, J. P.; TIMMER, L. W. y L. E. ACUÑA. 2005b. Evaluación del riesgo de introducción de Mancha negra desde frutas asintomáticas de Tangor Murcott, Limón Eureka y Naranja Valencia. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología. Pp. 75–77. Carlos Paz, Córdoba. (Resumen).
- AGUILAR – VILDOSO, C. I.; RIBEIRO, J. G. B.; FEICHTENBERGER, E.; GOES, A. y M. B. SPÓSITO. 2002. Manual técnico de procedimientos da mancha preta dos citros. Brasília.
- CANTEROS, B. 1994. Moteado negro (Black Spot) de los citrus en Corrientes: Sintomatología y Manejo en naranjo Valencia Late y Limón. Jornadas de Actualización en Sanidad Citrícola. San Miguel de Tucumán.
- CONTRERAS, J. 1994. Mancha Negra de los Citrus en la Provincia de Misiones. Jornadas de Actualización en Sanidad Citrícola. San Miguel de Tucumán.
- DUMMEL, D. M.; AGOSTINI, J. P. y L. E. ACUÑA. 2009. Producción y liberación de picnidiosporas a partir de diferentes síntomas de mancha negra de los cítricos. xv Congreso Latinoamericano y xviii Congreso Chileno de Fitopatología. Santiago de Chile. 291. (Resumen).
- DUMMEL, D. M.; AGOSTINI, J. P. y R. MOSCHINI. 2012. Predictive model for ascospore release of *Guignardia citricarpa* using climatological data. XII Internacional Citrus Congress. Valencia. Spain 18-23 noviembre 2012 S15 002 Pag 255.
- FERNÁNDEZ VALIELA, M. 1978. Introducción a la Fitopatología. Tercera Edición. Vol. III. 681.
- GARRÁN, S. 1994. Mancha Negra de los Citrus en el Nordeste de Entre Ríos. Jornadas de Actualización en Sanidad Citrícola. San Miguel de Tucumán.
- GLIENKE, C.; PEREIRA, O.L.; STRINGARI, D.; FABRIS, J.; KAVA-CORDEIRO, V.; GALLI-TERASAWA, L.; CUNNINGTON, J.; SHIVAS, R.G.; GROENEWALD, J.Z. and P.W. CROUS. 2011. Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with citrus black spot. *Persoonia* 26: 47-56.
- GOES, A. & E. FEICHTENBERGER 1993. Ocorrencia da mancha preta causada por *Phyllosticta citricarpa* (McAlp) Van der Aa (*Guignardia citricarpa* Kiely) em pomares cítricos do Estado de Sao Paulo. *Fitopatologia Brasileira* 21:318. (Resumo).
- HOTO, F.V.; VILDOSO, C. A.; ROSSI, M. L. y N. L. NOGUEIRA. 2001. Acompanhamento do processo ontogénico de picnidios de *Guignardia citricarpa*. *Fitopatologia brasileira* 26:430 (Resumen). www.eppo.org/QUARANTINE/fungi/Guignardia_citricarpa/GUIGCI_ds.pdf. Fecha de consulta 21/07/08.
- KIELY, T. B. 1948. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* sp.: The ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. *Proc. of Linnean Soc. of New South Wales* 73:249-292.
- KOTZÉ, J. M. 2000. Black Spot. In: Timmer, L. W.; Garnsey, S. M. y Graham, J. H. (Eds.) *Compendium of Citrus Diseases* St. Paul: APS Press. Segunda Edición. 10–12.
- PERES, N. A.; HARAKAVA, R.; CARROLL, G. C.; ADASKAVEG, J. E. and L. W. TIMMER 2007. Comparison of molecular procedures for detection and identification of *Guignardia citricarpa* and *G. mangiferae*. *Plant Dis.* 91:525-531.
- VIGIANI, A.; SERRANO, M. y M. BONILLO 1996. Comparación de Cobre oleoso y Benomil en el control de la Mancha Negra de los cítricos. *Revista Agraria*. Vol. 1: 71-75.