

La mancha negra de los cítricos: actualidad y desafíos



Citrus black spot: current overview and challenges

<https://cu-id.com/2247/v37n3e05>

Wendy Serra, Ana Margarita Manzano León*

Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical. Ave 7ma. no. 3005, e/ 30 y 32, Playa, La Habana. Cuba.

RESUMEN: La mancha negra de los cítricos (MNC) es una enfermedad que afecta a *Citrus* spp., cuyo agente causal es *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa. Esta produce cuantiosas pérdidas económicas, pues provoca el manchado de la fruta, su caída prematura y limita su exportación hacia países donde el patógeno se considera una plaga cuarentenaria. Investigaciones recientes obtuvieron resultados novedosos en esta temática. Entre ellos se destacan la descripción de nuevas especies del género *Phyllosticta* asociadas a cítricos, que dificultan el diagnóstico de *P. citricarpa*. Se detectó, también, la presencia de un ciclo de vida atípico para este hongo en ciertas regiones cítricas; mientras que, se informó el desarrollo de fungo-resistencia en poblaciones de este patógeno, así como fungicidas y agentes de control biológicos efectivos para su manejo. Tomando en consideración estos aspectos, el presente trabajo tuvo como objetivo ofrecer una panorámica actual sobre la MNC en el mundo y en Cuba, atendiendo a los daños que ocasiona, su impacto económico, las características del agente causal que influyen en la epidemiología y en su manejo, así como los principales desafíos y perspectivas futuras.

Palabras clave: *Phyllosticta citricarpa*, impacto económico, taxonomía polifásica, ciclo de vida, fungicidas, agentes de control biológico.

ABSTRACT: Citrus black spot (CBS), with *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa as the causal agent, is a disease that affects *Citrus* spp. It produces considerable economic losses due to the staining and premature fall of the fruits, and the limitations for their export to countries where the pathogen is considered a quarantine pest. Recent studies provided novel results on this subject. Among them, the description of new species of the genus *Phyllosticta* associated with citrus stands out, and it hinders the diagnosis of *P. citricarpa*. In addition, an atypical life cycle was detected for this fungus in some citrus regions, while the development of fungal-resistance in populations of this pathogen and effective fungicides and biological control agents for its management have been reported. Taking these aspects into consideration, this work offers a current overview of CBS in the world and in Cuba, attending to the damage it causes, its economic impact, the characteristics of the causal agent that influence epidemiology and its management, as well as its main challenges and future prospects.

Key words: *Phyllosticta citricarpa*, economic impact, polyphasic taxonomy, life cycle, fungicides, biological control agents.

INTRODUCCIÓN

La mancha negra de los cítricos (MNC) es una enfermedad que afecta *Citrus* spp., cuyo agente causal es el hongo *Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) van der Aa. Se presenta en países de África, Asia, Oceanía y América, con climas húmedos y cálidos durante el verano (1, 2, 3). En el año 2007 se informó en Cuba, en la región de Jagüey Grande, Matanzas (4). En Europa no está informada la enfermedad; sin embargo, recientemente se identificó el agente etiológico en Italia, Malta y Portugal (5).

Esta enfermedad impacta negativamente la economía de los países afectados, pues provoca la caída prematura de los frutos, demerita su calidad cosmética e impide la exportación de fruta fresca hacia países donde el patógeno es considerado una plaga cuarentenaria (6, 7). Además, ocasiona un incremento del costo de las producciones, por concepto del manejo de la enfermedad (8).

Debido al impacto de la MNC, se realizaron numerosas investigaciones para profundizar en el conocimiento de la enfermedad y su agente causal. Estas aportaron resultados que contribuyen a perfeccionar el manejo, en las diversas áreas productoras (9, 10, 11).

El ciclo de vida de *P. citricarpa* se describió previamente por diferentes autores, así como la función de las esporas sexuales y asexuales, como inóculo primario y secundario de la enfermedad, respectivamente (11, 12). Sin embargo, estudios recientes de los genes *MAT* (tipo sexual) en poblaciones de *P. citricarpa*, permitieron la descripción de un ciclo atípico de la enfermedad en la Florida (Estados Unidos) y en Cuba. En estas regiones, solo se constató la reproducción asexual del patógeno y los conidios que, normalmente, constituyen el inóculo secundario de la enfermedad y un medio de propagación a corta distancia; son la única fuente de inóculo, por lo que esto implica diferencias en la epidemiología y el manejo de la enfermedad (10, 13, 14).

*Correspondencia a: Ana Margarita Manzano León. E-mail: fitopatologia17@iift.cu; anamargaritamanzanoleon@gmail.com

Recibido: 02/03/2022

Aceptado: 18/07/2022

El estudio del agente causal y la aplicación de la taxonomía polifásica para su identificación, permitieron la descripción de un complejo de especies del género *Phyllosticta* asociado a cítricos. Este incluye a *P. citricarpa*, a patógenos débiles no cuarentenados que causan síntomas similares a los de la MNC y especies endófitas (5, 15, 16, 17, 18). Estos nuevos conocimientos impactaron la agricultura, pues la semejanza entre las nuevas especies, dificulta el diagnóstico de la MNC y provocó el rechazo innecesario de envíos de frutos, con las consecuentes pérdidas financieras para los exportadores (19).

El manejo de la MNC se basa en la integración de prácticas culturales con el control químico. Entre los fungicidas recomendados, actualmente, se encuentran los derivados del cobre y los del grupo de las estrobilurinas (12, 20). Sin embargo, su aplicación de forma indebida se vincula con el desarrollo de fungo-resistencia en algunas poblaciones de *P. citricarpa* (9, 21). Esto avala la necesidad del monitoreo de la susceptibilidad de cepas de *P. citricarpa*, para la aplicación de productos efectivos en cada región cítrica. Asimismo, existe un gran interés en la búsqueda de agentes de control biológico efectivos, para su aplicación como alternativa ecológica y económica en el manejo integrado de la enfermedad (22, 23).

Tomando en consideración estos aspectos, el presente trabajo tuvo como objetivo ofrecer una panorámica actual sobre la MNC en el mundo y en Cuba, atendiendo a los daños que ocasiona, su impacto económico, las características del agente causal que influyen en la epidemiología y en su manejo, así como los principales desafíos y perspectivas futuras.

1. LA ENFERMEDAD MANCHA NEGRA DE LOS CÍTRICOS

La mancha negra de los cítricos, es una enfermedad que afecta frutos, hojas y ramas de *Citrus* spp. Con excepción de *Citrus aurantium* L., sus híbridos y *Citrus latifolia* Tanaka ex Q. Jiménez, todas las especies de este género son susceptibles al patógeno en algún grado (24).

La manifestación de la MNC tiene lugar en áreas productoras de cítricos con climas húmedos y cálidos durante el verano. Se informó por primera vez en Nueva Gales del Sur, Australia, afectando *Citrus sinensis* L. Osb. (25). En la actualidad se encuentra diseminada por países de África, Asia, Oceanía y América (3).

La MNC se informó en Cuba en 2007, en Jagüey Grande, Matanzas y su agente causal se incluyó en el Grupo A2 de la Lista de Plagas Cuarentenarias, por constituir un patógeno de importancia económica y con poca diseminación en el país. Posteriormente, durante la actualización de la Resolución del MINAG 604/2008 “Lista de Plagas Cuarentenarias de la República de Cuba”, se retiró de esta lista. Esto se debió a su distribución en diferentes regiones del territorio na-

cional y a que las acciones integradas para su control se realizan, principalmente, en las áreas destinadas a la exportación de fruta fresca (4, 26).

En Europa, no se informa la enfermedad y se señala que las condiciones climáticas de la región no favorecen su desarrollo; sin embargo, recientemente se demostró la presencia de su agente causal en Italia, Malta y Portugal (5).

1.1. Síntomas que ocasiona

Los daños ocasionados por *P. citricarpa* en el cultivo de los cítricos, pueden manifestarse en hojas y ramas. Sin embargo, las lesiones fundamentales se producen en la corteza de los frutos (Fig. 1), provocando incluso su caída prematura, cuando la carga de inóculo es elevada.

La severidad de los síntomas depende de factores como la susceptibilidad de la especie y el cultivar cítrico, la madurez del fruto, la edad de la planta y las condiciones ambientales en el momento en que se desarrolle la infección. Adicionalmente, frutos asintomáticos con infecciones latentes pueden desarrollar síntomas durante el transporte o el almacenamiento. No obstante, aunque la apariencia del fruto se ve comprometida, la calidad del jugo no se afecta (15, 27).

1.1.1 Síntomas en frutos

Las principales lesiones de la MNC en frutos son la mancha dura o mancha negra, falsa melanosis, mancha pecosa y mancha virulenta (Fig. 1) (19). Los frutos pueden presentar un solo tipo de lesión o una mezcla de ellas. Adicionalmente, la mayor incidencia y severidad de la MNC se observa en frutos maduros, localizados en la parte baja de plantas estresadas, así como en los que se localizan más expuestos al sol y en la periferia de las plantaciones (28, 29).

Hasta el momento, se desconocen los procesos fisiológicos que conllevan a la formación de los diferentes síntomas de la enfermedad. Sin embargo, su frecuencia puede diferir entre regiones cítricas. Por ejemplo, Spósito (30) informó que los síntomas mancha dura y falsa melanosis son los más comúnmente observados en San Paulo, Brasil. Por otro lado, en Jagüey Grande, Cuba se detectó, con mayor frecuencia, el síntoma mancha dura (28).

1.1.2 Síntomas en hojas y ramas

Los síntomas ocasionados por la MNC en hojas y ramas son menos comunes y diversos que los presentes en las frutas. *P. citricarpa* generalmente se desarrolla en hojas como una infección latente, sin lesiones visibles. Estas se observan más comúnmente en limón (*Citrus limon* L.), y raramente se manifiestan en cultivos con un apropiado manejo de la enfermedad. Las lesiones más antiguas constituyen pequeñas

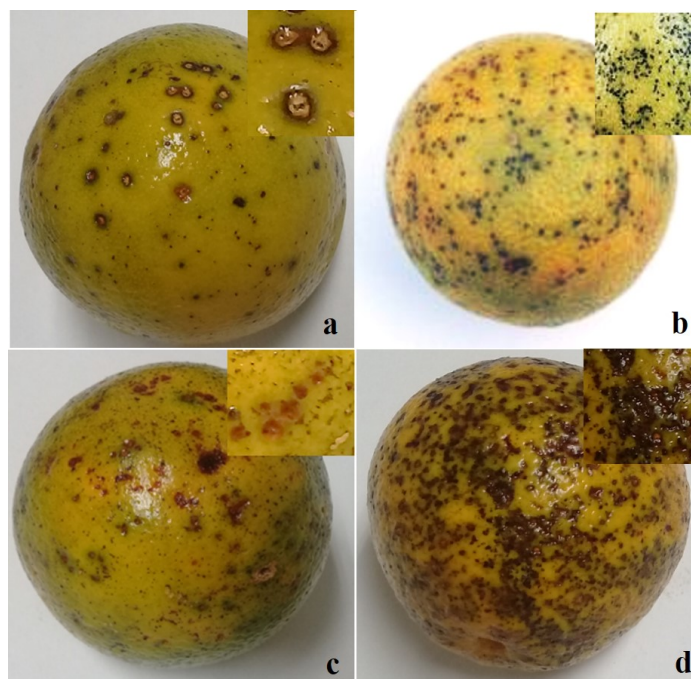


Figura 1. Síntomas de mancha negra de los cítricos en frutos de naranjo 'Valencia' (*Citrus sinensis* L. Osb.), observados en la región de Jagüey Grande, Matanzas, Cuba. (a) Mancha dura, (b) falsa melanosis, (c) mancha pecosa y (d) mancha virulenta. / Symptoms of citrus black spot on 'Valencia' orange (*Citrus sinensis* L. Osb.) from Jagüey Grande, Matanzas, Cuba. (a) Hard spot, (b) false melanosis, (c) freckle spot, and (d) virulent spot.

depresiones necróticas con bordes grises, circulares, rodeadas por un anillo marrón oscuro, que pueden alcanzar hasta 3 mm de diámetro. Por otro lado, las lesiones recientes son rojizas, más pequeñas y superficiales. Unas y otras presentan un halo amarillo y son visibles en ambas superficies de la hoja. En el centro de las depresiones se pueden observar picnidios de manera ocasional; síntomas similares pueden presentarse en ramas y pedúnculos (11).

1.2. Impacto económico

Los síntomas presentes en los frutos afectados por la MNC perjudican su calidad cosmética, lo que limita sus posibilidades de exportación. En adición, la caída prematura de los frutos, originada por una elevada presión de inóculo, así como los altos costos asociados al manejo de la enfermedad, afectan negativamente la economía de los países exportadores (6).

En Estados Unidos se estima que, el costo para el manejo de la MNC, puede ascender a 220 millones de dólares cada año; mientras que, las pérdidas económicas en la Florida pueden alcanzar los 847 millones (31). Adicionalmente, en Sudáfrica, el manejo anual de la enfermedad asciende a 190 millones de euros. Este elevado presupuesto puede ser asumido, actualmente, por la industria cítrica, pero con implicaciones en las oportunidades de empleo y afectaciones al consumidor, debido al aumento del precio de la fruta fresca. Esta situación repercute de forma significativa en la economía del país, pues la producción de cítricos genera alrededor de 10 000 nuevos empleos

al año e ingresos significativos por la exportación de fruta fresca (8).

Por estos motivos, *P. citricarpa*, se considera en muchos países un patógeno cuarentenado (7). En la Unión Europea está registrado como una plaga cuarentenaria A1 y se prohíben las importaciones de cítricos con sospechas de la enfermedad (6). En este sentido, durante el periodo 2017 - 2018, se rechazaron 31 lotes de fruta fresca provenientes de Argentina, Brasil y Sudáfrica debido a la identificación de *P. citricarpa* en los mismos (8).

En Cuba, luego del informe de la MNC en la región de Jagüey Grande, Matanzas, se manifestaron todas estas afectaciones económicas y en la actualidad se dificulta la exportación de fruta fresca hacia países de la Unión Europea. Las mayores pérdidas se encontraron en limoneros y naranjos de maduración tardía, que resultan los más susceptibles a la enfermedad y tienen una elevada presencia en la citricultura cubana (4).

2. *PHYLLOSTICTA CITRICARPA*, AGENTE CAUSAL DE LA MANCHA NEGRA DE LOS CÍTRICOS

El género *Phyllosticta* se identificó, originalmente, a través de su forma sexual, previamente denominada como *Guignardia* (32). Con el uso creciente de datos moleculares para vincular morfos asexuales y sexuales, y el fin de la nomenclatura dual para los hongos, se eligió el nombre más antiguo y más comúnmente usado, *Phyllosticta*, sobre el de *Guignardia* (33).

La especie *P. citricarpa*, agente etiológico de la MNC, puede crecer en medios como Agar Papa Dextrosa (PDA, del inglés: *Potato Dextrose Agar*) y Agar Avena; sin embargo, en cada uno presenta características culturales diferentes. En PDA tiene una velocidad de crecimiento lenta, con diámetro de ~ 30 mm (7 días, 25°C). El micelio presenta color gris en los estados tempranos del crecimiento y posteriormente se vuelve negro, debido a la abundante formación de picnidios, que comienzan a madurar a los 10 días. Los conidios (11-12 x 6-8 µm) presentan una vaina mucoide de 1 µm de espesor y apéndice conidial de 4-10 µm (16, 17).

En Agar Avena, *P. citricarpa* presenta colonias de color gris oliváceo, con bordes irregulares y con micelio aéreo escaso a moderado. En este medio se produce un pigmento amarillo que se dispersa alrededor de la colonia (5, 19).

2.1. Taxonomía polifásica para la identificación de especies del género *Phyllosticta*

La primera especie del género *Phyllosticta* descrita en cítricos fue *P. citricarpa*, dada su importancia como agente causal de la MNC (Tabla 1). Los métodos convencionales utilizados para su identificación se basan en el análisis del diámetro de la colonia en PDA, talla de los conidios, espesor de la vaina mucoide, longitud del apéndice conidial y presencia o no de pigmento amarillo en Agar Avena. Adicionalmente, las técnicas moleculares empleadas para la caracterización de esta especie se basan en el análisis de las regiones del ADN ribosomal que contiene los espaciadores internos transcritos (ITS, del inglés: *Internal Transcribed Spacer*; ITS1-5.8S-ITS2) y la subunidad larga 28S del ADNr (LSU, del inglés: *Large Subunit*). Asimismo, fragmentos de los genes que codifican para el factor

de elongación de la traducción 1 (*tef1*), actina (*actA*) y gliceraldehido-3-fosfato dehidrogenasa (*gapdh*) (5, 33).

La especie *Phyllosticta capitalensis* Henn., se describió posteriormente, al definirse que los aislados considerados, inicialmente, como cepas no patogénicas de *P. citricarpa*, son hongos endófitos que no ocasionan síntomas en cítricos y constituyen una especie diferente al agente causal de la MNC (16). (Tabla 1)

Mediante la taxonomía polifásica se describieron nuevas especies de *Phyllosticta* asociadas a cítricos. *Phyllosticta citriasiana* Wulandari, Crous & Gruyter, *Phyllosticta citrichinaensis* X.H. Wang, K.D. Hyde & H.Y. Li y *Phyllosticta citrimaxima* Wikee, Crous, K.D. Hyde & McKenzie, se identificaron en Asia. Hasta la fecha estas no son cuarentenadas y se consideran patógenos débiles (15, 17, 18). De igual forma, Guarnaccia *et al.* (5), informaron la especie *Phyllosticta paracitricarpa* Guarn. & Crous en cítricos de Europa, al tiempo que plantearon la necesidad de profundizar en estudios sobre su patogenicidad (Tabla 1). Además, las especies endófitas *Phyllosticta citribraziliensis* O.L. Pereira, Glienke & Crous y *Phyllosticta paracapitalensis* Guarn. & Crous también se describieron en cítricos (5, 16, 18). (Tabla 1)

El uso de la taxonomía polifásica para la identificación de las especies del género *Phyllosticta*, presenta gran relevancia para la agricultura. Esta ha permitido la descripción de un complejo de especies asociadas a cítricos, con gran semejanza en cuanto a las características morfológicas (Tabla 1) y los síntomas que ocasionan, por lo que dificultan el diagnóstico de la MNC. Por ejemplo, el Nuevo Grupo Asesor de Plagas del Departamento de Agricultura de Estados Unidos, reconoció que en el año 2012 se rechazaron más de 40 envíos de frutos de *Citrus maxima* proveniente de

Tabla 1. Características morfológicas de especies de *Phyllosticta* asociadas a *Citrus* spp. / Morphological characteristics of *Phyllosticta* species associated with *Citrus* spp.

Especies / (referencia)	Conidio (µm)	Vaina mucoide (µm)	Apéndice conidial (µm)	Ascospora (µm)	Ascocarpio (µm)	Asca (µm)	Pigmento amarillo en Agar Avena*
<i>P. citricarpa</i> / (29)	11-12 x 6-8	1	4-10	12,5-16 x 4,5-6,5	-	-	+
<i>P. paracitricarpa</i> / (4)	11-13 x 7-8	1-1,5	10-12 x 1,5	-	-	-	+
<i>P. capitalensis</i> / (15)	11-12 x 6-7	2-4	6-8	15-17 x 5-6	250	58-80 x 11-15	-
<i>P. paracapitalensis</i> / (4)	12-13 x 6-7	2-3	5-7 x 1,5	16-17 x 6-7	>300	40-75 x 10-12	-
<i>P. citriasiana</i> / (14)	12-14 x 6-7	< 1,5	7-14	-	-	-	-
<i>P. citribraziliensis</i> / (15)	10-12 x 6-7	2-4	7-15 x 1,5-2	-	-	-	-
<i>P. citrichinaensis</i> / (16)	8-12 x 6-9	< 1,5	14-26	14-20 x 7-8	100-300 x 100-200	42-81 x 10-14	-
<i>P. citrimaxima</i> / (17)	5-8 x 4-7	-	2-16	-	-	-	-

*Producción (+) o no (-) de pigmento amarillo en medio Agar Avena / Presence (+) or absence (-) of yellow pigment in Oatmeal Agar medium

Asia. En ellos se diagnosticó la presencia *Phyllosticta citricarpa* sin el empleo de esta metodología de avanzada. Considerando la situación taxonómica actual, el hongo identificado pudo ser en realidad *P. citriasiana*, lo que se traduce en pérdidas financieras innecesarias para los exportadores (34). Asimismo, estos nuevos conocimientos han impulsado el desarrollo de métodos moleculares para el diagnóstico de la MNC (19).

El empleo de la taxonomía polifásica en Cuba permitió confirmar la presencia de *P. citricarpa* y *P. capitalensis*, en plantaciones cítricas de Matanzas, Cienfuegos y Camagüey, con presencia de MNC. Adicionalmente, se detectó *P. citricarpa* en plantas de cítricos, de huertos particulares en Santiago de Cuba (14). Es preciso destacar que, la no detección hasta el momento, de otras especies de *Phyllosticta* sp. en plantaciones de cítricos, no permite descartar su presencia en Cuba. Los resultados obtenidos contribuyen al diagnóstico y manejo del patógeno, así como a la toma de decisiones relacionadas con la exportación de fruta fresca.

2.2. Ciclo de vida de *Phyllosticta citricarpa* y epidemiología de la enfermedad

P. citricarpa presenta en su ciclo de vida dos estados, uno sexual y otro asexual, durante los cuales se producen ascosporas y conidios, respectivamente. Ambos tipos de esporas pueden causar infección en órganos susceptibles de los cítricos (11, 35).

Las ascosporas se producen en la hojarasca y requieren del apareamiento entre tipos sexuales opuestos (idiomorfos *MATI-1* y *MATI-2*), por ser *P. citricarpa* una especie heterotálica (10). Estas esporas pueden dispersarse a través de corrientes de aire a distancias de hasta 25 m. Se consideran, por tanto, el inóculo primario de la enfermedad y las responsables de introducir la MNC a nuevas áreas de siembra. Los conidios, por otro lado, se desarrollan en los picnidios presentes en frutas, ramas y hojas infectadas, a la vez que se dispersan a cortas distancias mediados por salpicaduras de agua. Ellos se consideran el inóculo secundario de la MNC y se relacionan con el incremento de la enfermedad en el propio árbol y en árboles cercanos (12).

La importancia relativa de cada tipo de espora en la epidemiología de la enfermedad depende de las condiciones ambientales de cada región. Así, en Sudáfrica y Australia, las ascosporas de *P. citricarpa* son las principales responsables de las epidemias; mientras que, a los conidios no se les atribuye importancia epidemiológica significativa. Ello se debe a que, en las condiciones de clima subtropical, las lluvias se limitan al verano y ocurre un florecimiento y fructificación uniforme en el año. Adicionalmente, no coexisten frutos sintomáticos con frutos jóvenes y susceptibles, pues se realiza una cosecha exhaustiva antes del siguiente periodo de floración y producción (6).

A diferencia de lo expresado anteriormente, en países tropicales como Brasil, el periodo de lluvia abarca varias estaciones, ocurren varias floraciones durante el año y coexisten, simultáneamente, frutos enfermos y frutos susceptibles. Por tanto, en estas condiciones, ambos tipos de propágulos contribuyen significativamente al desarrollo de la enfermedad (30).

Cabe destacar que el reciente análisis de los genes *MAT* (tipo sexual) evidenció que el ciclo de la MNC mundialmente aceptado no se cumple en todas las regiones cítricas. En este sentido, se demostró que en Australia, Brasil, Sudáfrica y China coexisten los dos tipos sexuales compatibles, y se cumple lo explicado anteriormente (24). Sin embargo, en la Florida (Estados Unidos), Cuba, Italia, Malta y Portugal, solo se identificó la presencia de uno de los tipos sexuales. Ello demuestra la existencia de un ciclo atípico en estas regiones, donde solo ocurre la reproducción asexual del patógeno y los conidios, que normalmente constituyen el inóculo secundario, son la única fuente de inóculo (5, 10, 14).

Entre las cinco regiones con ciclo de vida atípico de *P. citricarpa*, destacan la Florida y Cuba, por presentar las condiciones para el desarrollo de la MNC. En ellas se detectó la sola presencia del idiomorfo *MATI-2* (5, 14, 13). Cabe destacar que la dispersión a corta distancia de los conidios, concuerda con el patrón espacial agregado de la enfermedad identificado en estas regiones (36, 37). No obstante, se constató también la dispersión de la enfermedad, hacia nuevas zonas cítricas, por lo que el análisis de este fenómeno sugirió nuevos elementos sobre la diseminación de la enfermedad en estas condiciones.

En este sentido, la acción del hombre puede haber desempeñado una función fundamental en la dispersión de la enfermedad en regiones con ausencia de reproducción sexual del patógeno. Ello concuerda con lo expresado por Alonso (28), quien detectó una mayor incidencia de la MNC en las unidades empresariales de Jagüey Grande, que se encontraban más expuestas al movimiento de vehículos y personal. Adicionalmente, estudios recientes sugieren que los conidios no solo se dispersan hasta 0,8 m por las salpicaduras de agua, sino que la combinación de la lluvia y el viento (25 km.h^{-1}) pudiera desplazarlos a mayores distancias (8 m). También, se propuso que los huracanes y tormentas tropicales pudieran transportar ramas infectadas (con o sin frutos) a trayectos más largos y propagar así la enfermedad MNC (37, 38).

Estos datos indican que el estudio de la distribución de los tipos sexuales de *P. citricarpa* en regiones cítricas, debe tomarse en consideración para la implementación de una estrategia de manejo más precisa y económica de la MNC.

3. ESTRATEGIA DE MANEJO DE LA ENFERMEDAD MANCHA NEGRA DE LOS CÍTRICOS

La MNC causa enormes pérdidas económicas cuando no se realiza un adecuado control. Para su manejo se implementan diferentes estrategias, que integran las prácticas culturales con el control químico (11, 20, 39). En su diseño debe considerarse las fuentes de inóculo presentes, la susceptibilidad de los cultivares cítricos, las condiciones ambientales y el modo de acción de los diferentes fungicidas.

En Cuba, las medidas a emplear para la eliminación de la fuente de inóculo conidial, se establecieron previamente en la estrategia de manejo de la MNC. Esta se basa en los resultados de estudios epidemiológicos en nuestro país y en la evaluación de diferentes tratamientos para su control (28, 36).

3.1. Manejo cultural

P. citricarpa se puede introducir en áreas de cultivos de cítricos mediante material de propagación infectado. En un esfuerzo por prevenir estos incidentes, se instituyen regulaciones de cuarentena vegetal y requisitos comerciales entre diferentes regiones o países. En este sentido, al establecer nuevos huertos, es imprescindible el empleo de plantas certificadas. Estas medidas son vitales pues se informó, en países como Sudáfrica y Zimbabue, la propagación de la enfermedad a partir de viveros que estaban infectados y no manifestaban síntomas (12).

Asimismo, las plantas que se encuentran en mal estado resultan más susceptibles a desarrollar la MNC, por lo que las acciones dedicadas al fortalecimiento de las plantaciones contribuyen a la disminución de la incidencia de la enfermedad. En ello resulta importante el uso de un programa de fertilizaciones y riego, que garanticen el buen estado nutricional de las plantas (36, 39).

Para el control de la fuente de inóculo conidial se hace énfasis en la cosecha del total de los frutos previo a la siguiente floración, así como en el saneamiento, que incluye la eliminación de ramas secas, de frutos remanentes y de plantas en mal estado sanitario o de nutrición (36).

Otro aspecto que requiere de un análisis especial es el transporte de frutos sintomáticos. En muchos casos se considera que estos no constituyen una vía real de propagación de la MNC a nuevas áreas. Ello se basa, fundamentalmente, en que los conidios son las únicas esporas que se producen sobre los frutos enfermos. Estos presentan corto tiempo de vida media, poca capacidad de germinación y solo se dispersan a cortas distancias por salpicaduras de agua (12). No obstante, se demostró que la adición de frutos sintomáticos a plantaciones libres de MNC reproduce la enfermedad en las zonas cercanas a la fuente de inóculo (30). Por tanto, se debe controlar su transporte, y el de otras fuentes de conidios, hacia las áreas cítricas.

Otra de las medidas clave comprende el tratamiento de la hojarasca para el control de las ascosporas (esporas sexuales) como inóculo primario de la enfermedad (30). Sin embargo, esta medida presenta menor impacto en la Florida y en Cuba, por la ausencia de reproducción sexual del patógeno. No obstante, se puede valorar su empleo para el control de conidios de *P. citricarpa* y para el manejo de otras enfermedades fungosas que afectan cítricos (ej: mancha grasienta y antracnosis).

Adicionalmente, deben desinfectarse los medios de cosecha y transporte del campo con amonio cuaternario al 2 %. Asimismo, es necesario eliminar todos los restos de cosecha en las envasadoras, industrias y plantas de beneficios (36).

3.2. Manejo químico

Los fungicidas desempeñan una función decisiva en el manejo de la MNC y su efectividad depende de que se apliquen apropiadamente. Para esto se deben considerar aspectos como su mecanismo de acción, la concentración mínima inhibitoria, el mecanismo de dispersión más efectivo y la distribución de la enfermedad en el cultivo (40).

El momento propicio para la infección por *P. citricarpa* tiene lugar durante el periodo de susceptibilidad de los frutos, que abarca de cinco a seis meses después de la caída de los pétalos. Este marco de tiempo es el más adecuado para la aplicación de fungicidas preventivos o de contacto. También, se pueden realizar tratamientos de posinfección con el objetivo de manejar el inóculo que escapó a la primera aplicación de fungicidas (20, 41, 42).

En numerosos países, entre los que se destacan Estados Unidos, Brasil y Australia, el manejo químico se basa, fundamentalmente, en aplicaciones mensuales, en las que se alternan productos derivados del cobre y estrobilurinas. El uso de las estrobilurinas se recomienda a temperaturas superiores a 34°C, cuando la fitotoxicidad del cobre constituye una preocupación. No se pueden aplicar más de cuatro veces al año y no se recomiendan aplicaciones consecutivas debido al posible desarrollo de resistencia (20).

En Cuba se establece un control químico diferencial, donde se tiene en cuenta si el área con incidencia de MNC va a ser destinada a la industria o a la exportación de fruta fresca. En el primer caso, se recomienda realizar tres aplicaciones de productos, con vistas a reducir la presión de inóculo y con ello minimizar la caída prematura de los frutos. Para el segundo caso, resulta imprescindible la realización de cuatro aplicaciones y de una quinta opcional, lo que posibilita la exportación de fruta fresca libre de MNC (40).

Los fungicidas de contacto recomendados tradicionalmente en nuestro país para el control de la MNC son oxiclورو de cobre (Cuproflow SC 37,75), mancozeb (Mancozeb PH 80) y aceite mineral (Aceite

de Sigatoka). Se han empleado también productos de acción sistémica que presentan los ingredientes activos: benomilo (Benomyl PH 50), carbendacima (Curcarb 50 % PH) y tebuconazol + procloraz (Supreme EW 40). Recientemente se demostró la efectividad de tratamientos con oxiclورو de cobre (Cuproflow SC 37,75) y las estrobilurinas piraclostrobina (Regnum EC 25) o trifloxistrobina + ciproconazol (Sphere Max SC 535), para reducir significativamente la incidencia y severidad de la enfermedad (40).

Es de destacar que muchos de los productos que se aplican para el control de la MNC resultan también efectivos contra enfermedades fungosas como la antracnosis, melanosis y mancha grasienta, causadas por *Colletotrichum* spp., *Zasmidium citri-griseum* (F.E. Fisher) U. Braun & Crous y *Diaporthe citri* (HS Fawc.) FA Wolf, respectivamente. Estas deben ser controladas de igual forma para garantizar la exportación de fruta fresca, por lo que la estrategia de manejo debe diseñarse de manera que influya sobre las distintas infecciones ocasionadas por hongos fitopatógenos (20).

3.2.1. Monitoreo de la susceptibilidad a fungicidas de cepas de *Phyllosticta citricarpa*

La aplicación de fungicidas, de forma indebida, se vincula con el desarrollo de fungo-resistencia. Ello puede evitarse si se impide el uso repetido de un mismo ingrediente activo, se utilizan mezclas de productos químicos o se rotan los fungicidas con mecanismos de acción diferentes. Estas medidas contribuyen no solo al manejo efectivo de los fitopatógenos, sino también a disminuir los perjuicios que dichos compuestos ocasionan al medio ambiente (11, 28).

Con respecto a *P. citricarpa*, en Sudáfrica y Brasil se informó la presencia de cepas resistentes a benomilo, carbedazima, piraclostrobina y trifloxistrobina (9, 11). En Cuba, el estudio de cepas de *P. citricarpa* aisladas de diversas regiones del país, demostró su susceptibilidad *in vitro* a diferentes fungicidas aplicados durante años en las plantaciones de cítricos, así como a productos de nueva introducción

(Tabla 2). Se evidenció que los valores de concentración efectiva para la reducción del crecimiento micelial en 50 % (concentración inhibitoria media, CI_{50}), fueron similares a los informados para cepas susceptibles de *P. citricarpa*, y muy inferiores a los de cepas fungo-resistentes descritas en otras regiones del mundo (Tabla 2). Estos resultados se corroboraron también en condiciones de producción, donde se demostró la efectividad de estos productos en el control de la MNC (40).

Los estudios de susceptibilidad a fungicidas, realizados en laboratorio y campo, permiten mantener el uso controlado de estos productos químicos, como parte de la estrategia de manejo de la MNC en Cuba. Adicionalmente, la no detección de cepas de *P. citricarpa* fungo-resistentes, es un indicativo de la aplicación racional de fungicidas que se ha realizado en nuestros campos.

3.3. Control biológico

La utilización de sistemas biológicos para el manejo de fitopatógenos constituye una alternativa ecológica y económica ante la problemática relacionada con el empleo de fungicidas. Estos se basan en el uso de productos biológicos que posibilitan la reducción del inóculo del patógeno a valores del umbral de la enfermedad económicamente aceptables. Cabe destacar que el empleo de los bioproductos no ha permitido la sustitución de los fungicidas para el control eficiente de la MNC, por lo que se recomiendan como complemento a las estrategias de manejo tradicionales (22, 23).

Una gran variedad de especies microbianas, se evaluaron como agentes de biocontrol para el manejo de la MNC, por su marcada capacidad de afectar o inhibir el crecimiento de *P. citricarpa*, así como por contribuir al fortalecimiento nutricional de las plantas (12, 48). Entre las más destacadas se encuentran las del género *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta ante diversos patógenos (23, 49, 50). Estos alentadores resultados se

Tabla 2. Concentración inhibitoria media (CI_{50}) de diferentes fungicidas para cepas de *Phyllosticta citricarpa* de Cuba y otras regiones cítricas del mundo / Half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of different fungicides for isolates of *Phyllosticta citricarpa*, from Cuba and other citrus producing regions of the world.

Ingrediente activo (ia)	CI_{50} cepas de <i>P. citricarpa</i> (mg ia L ⁻¹)			Referencias
	Aislados de Cuba ¹	Aislados susceptibles (país)	Aislados resistentes (país)	
Oxicloruro de cobre	133,6 - 148,8	≈ 500 (La Florida, Estados Unidos)	-	43
Benomilo	0,2 - 0,3	≈ 0,2 (Brasil)	> 100 (Sudáfrica)	44
Piraclostrobina	0,039 - 0,045	0,003 - 0,004 (Brasil, Sudáfrica y China)	80 (Brasil)	9, 45
Trifloxistrobina	0,84 - 1,04	-	421 (Brasil)	9

¹En el presente trabajo, el análisis de la susceptibilidad *in vitro* a fungicidas de cepas de *P. citricarpa* en Cuba, se realizó según Possiede *et al.* (44) y Samaniego *et al.* (46). El cálculo de concentración inhibitoria media (CI_{50}), se llevó a cabo mediante un análisis de regresión probit (47) / The present work evaluated the *in vitro* susceptibility to fungicides of *P. citricarpa* Cuban isolates, following Possiede *et al.* (44) and Samaniego *et al.* (46). Half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated out using a probit regression analysis (47).

alcanzaron, mayoritariamente, a escala de laboratorio o en pequeños ensayos de campo, por lo que se trabaja para su incorporación al manejo de plantaciones afectadas por la MNC (11).

En Cuba, se demostró la eficacia de los antagonistas *Trichoderma harzianum* Rifai. A-34, *T. harzianum* Rifai. A-53 y *Trichoderma viride* Persoon. TS-3, en la inhibición del crecimiento *in vitro* de cepas de *P. citricarpa*. Estos resultados presentan gran relevancia pues los agentes de biocontrol ensayados constituyen la base para la formulación de bioproductos nacionales (TRICOSAVE 34, TRICOSAVE 53 y TRICOSAVE TS3), con probada efectividad contra hongos y oomicetos fitopatógenos. Adicionalmente, la acción sinérgica de los mecanismos detectados (competencia, antibiosis e hiperparasitismo), pudiera maximizar el control del agente causal de la MNC. La validación de estos resultados en condiciones de producción brindaría nuevas alternativas para el manejo integrado de la MNC en nuestro país (23, 51).

PERSPECTIVAS FUTURAS

En los últimos años se profundizó en el estudio de la MNC y su agente causal, con vistas a disminuir las afectaciones económicas que ocasiona (12). Sin embargo, aún existen enfoques poco abordados que podrían resultar de vital interés para la industria cítrica.

En este sentido, la realización de estudios a escala global sobre la diversidad y estructura genética de poblaciones de *P. citricarpa*, podrían brindar una idea precisa del movimiento de la enfermedad en el mundo y por tanto de las debilidades sanitarias que presentan las diversas regiones cítricas (12, 13). Adicionalmente, este tipo de trabajo permitiría conocer la variabilidad de las poblaciones que afectan las diferentes regiones cítricas y cómo ello puede contribuir al desarrollo de la enfermedad. Estudios previos en la temática han demostrado resultados de gran interés, que aún no han sido lo suficientemente explotados. Por ejemplo, se destaca que las plantaciones de cítricos de Australia se encuentran afectadas por 11 genotipos de *P. citricarpa* (MLGs, del inglés *multilocus genotypes*); mientras que, en la Florida (Estados Unidos), Italia, Malta y Portugal se identificó solo la presencia de poblaciones clonales constituidas por un solo genotipo (5, 10, 24).

Otro reto lo constituye el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, rápidos, específicos y sensibles, que posibiliten la certificación certera para la exportación de fruta fresca. Se ha demostrado recientemente, que varios de los métodos de diagnóstico molecular aceptados, no discriminan *P. citricarpa* de *P. citriasiana* o *P. citrichinaensis* (17, 19).

Entre los principales desafíos se destacan, además, el estudio de los mecanismos de patogenicidad de *P. citricarpa*, la obtención de cultivares cítricos resis-

tentes al patógeno, así como la incorporación de nuevos agentes químicos y biológicos, a la estrategia de manejo de la MNC (12, 52).

El impacto del cambio climático sobre el desarrollo de la enfermedad, es otro aspecto de interés, principalmente por las evidencias previas de que los síntomas más severos, están normalmente asociados a la elevación de la temperatura, a la mayor incidencia de rayos solares, al estrés hídrico y a la debilidad en las plantas (11).

CONCLUSIONES

La MNC tiene un gran impacto pues afecta la productividad cítrica, presenta un alto costo asociado al manejo e impide la exportación de fruta fresca hacia países donde su agente causal es considerado una plaga cuarentenaria. La identificación certera de *P. citricarpa*, empleando la taxonomía polifásica, resulta de vital importancia para mitigar las afectaciones económicas que provoca esta enfermedad. Igualmente, la caracterización del tipo sexual del patógeno presente en una determinada región, el monitoreo de la susceptibilidad a fungicidas y el estudio de agentes químicos y biológicos que inhiban su crecimiento, presentan gran relevancia pues permiten perfeccionar la estrategia de manejo de la enfermedad. Todo esto favorece la producción cítrica y, por tanto, la seguridad alimentaria de la población, la sustitución de importaciones y mayores ganancias, como rubros exportables.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Proyecto de Investigación e Innovación Tecnológica 2067 del Grupo Empresarial Agrícola (GAG) y el Proyecto Nacional 3009 del Programa de Salud Animal y Vegetal de Cuba.

REFERENCIAS

1. EPP0. *Phyllosticta citricarpa*. EPP0 datasheets on pests recommended for regulation. 2022. Disponible: <https://gd.eppo.int>. Consulta: 18 de febrero 2022
2. CABI. Invasive species compendium: *Guignardia citricarpa* (citrus black spot) datasheet. 2021. Disponible: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/26154> Consulta: 2 de marzo 2021
3. Farr D, Rossman A. Fungal Databases; Systematic Mycology and Microbiology Laboratory; ARS; USDA. 2022. Disponible: <http://nt.ars-grin.gov/fungaldbases/>. Consulta: 18 de febrero 2022
4. Hidalgo EI, Pérez LV. Diferenciación morfológica, cultural y biológica de *Guignardia*

- citricarpa* y *Guignardia mangiferae* en frutos cítricos de Cuba. *Fitosanidad*. 2010; 14(3): 141-152.
5. Guarnaccia V, Groenewald J, Li H, Glienke C, Carstens E, Hattingh V, *et al.* First report of *Phyllosticta citricarpa* and description of two new species; *P. paracapitalensis* and *P. paracitricarpa*, from citrus in Europe. *Stud. Mycol.* 2017; 87(1): 161-185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.simyco.2017.05.003>
 6. EFSA (European Food Safety Authority), Parnell S, Schenk M, Schrader G, Vicent A, Delbianco A, Vos S. Pest survey card on *Phyllosticta citricarpa*. 2020; 1863: 35. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2020.EN-1863>
 7. EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). EPPO Reporting Service no. 07 - 2019 2019/141 First report of *Phyllosticta citricarpa* in Tunisia. 2019. Disponible: <https://gd.eppo.int/reporting/article-6571>. Consulta: 18 de febrero 2022
 8. Jansen C. Staggering' financial and management costs of CBS measures are disproportionate to the risk. Rigid EU stance on CBS overburdens South African citrus industry. *FreshPlaza*. 2018; 176: 45-47.
 9. Souza A. *Phyllosticta citricarpa*: diversidade genética temporal em pomares de *Citrus sinensis* e sensibilidade a fungicidas. [Tesis en opción al grado de Doctor]. Universidad Estatal Paulista Júlio de Mesquita Filho, Facultad de Ciencias Agrarias y Veterinarias. 2015; vii, 74 pp. Disponible: <http://hdl.handle.net/11449/123831> Consulta: 18 de febrero 2022
 10. Wang N, Zhang K., Hugué-Tapia J, Rollins J, Dewdney M. Mating type and simple sequence repeat markers indicate a clonal population of *Phyllosticta citricarpa* in Florida. *Phytopathology*. 2016; 106: 1300-1310. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-15-0316>
 11. Silva GJJ, Feichtenberger E, Spósito MB, Amorim L, Bassanezi RB, Goes A de. Pinta preta dos citros: a doença e seu manejo. *Fundo de Defesa da Citricultura*. Araraquara: Fundecitros. 2016; 208 pp. ISBN: 9788568170021 Disponible: www.fundecitrus.com.br Consulta: 18 de febrero 2022
 12. Guarnaccia V, Gehrman T, Silva-Junior G, Fourier P, Haridas S, Vu D, *et al.* *Phyllosticta citricarpa* and sister species of global importance to *Citrus*. *Mol. Plant Pathol.* 2019; 20: 1619-1635. <https://doi.org/10.1111/mpp.12861>
 13. Coetzee B, Carstens E, Dewdney M, Fourie PH, Bester-van der Merwe AE. Extending the knowledge of *Phyllosticta citricarpa* population structure in USA with re-sequencing and genome wide analysis. *Physiol. Mol.* 2021; 113: 101591. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101591>
 14. Serra W, Lugo Álvarez MB, García Rodríguez D, Alonso-Oliva E, Sanz Llorente A, Guarnaccia V, *et al.* Polyphasic identification and *MAT1-2* isolates of *Phyllosticta citricarpa* in Cuba. *Eur. J. of Plant Pathol.* 2022. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02453-y>
 15. Wulandari N, To A, Hyde K, Duong L, Gruyter M de. *Phyllosticta citriasiana* sp. nov.; the cause of *Citrus* spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Divers.* 2009; 34: 23-39. <http://www.fungaldi.versity.org/fdp/sfdp/FD34-2.pdf>
 16. Glienke C, Pereira OL, Stringari D, Fabris J, Kava CV, Galli TL, *et al.* Endophytic and pathogenic *Phyllosticta* species, with reference to those associated with Citrus Black Spot. *Persoonia*. 2011; 26: 47-56. <https://doi.org/10.3767/003158511X569169>
 17. Wang X, Chen G, Huang F, Zhang J, Hyde KD, Li H. *Phyllosticta* species associated with citrus diseases in China. *Fungal Divers.* 2012. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0140-y>
 18. Wikee S, Lombard L, Nakashima C, Motohashi K, Chukeatirote E, Cheewangkoon R, *et al.* A phylogenetic re-evaluation of *Phyllosticta* (*Botryosphaerales*). *Stud. Mycol.* 2013; 76: 1-29.
 19. Lugo Alvares MB, Manzano León AM. Métodos empleados para el diagnóstico de la enfermedad mancha negra de los cítricos. *CitriFrut*. 2016; 33(1): 37-45.
 20. Dewdney MM, Walker C, Roberts PD, Peres NA. 2021-2022 Florida Citrus Production Guide: Citrus Black Spot. PP279, series of the Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 2021. <https://doi.org/10.32473/edis-cg088-2021>.
 21. Fishel FM, Dewdney MM. Fungicide Resistance Action Committee's (FRAC) Classification Scheme of Fungicides According to Mode of Action. Pesticide Information Office, UF/IFAS Extension. 2018. <https://edis.ifas.ufl.edu/publication/PI131>
 22. Kupper KC, Barbosa CE, Moretto C, Bettiol W, Goes A de. Control of *Guignardia citricarpa* by *Bacillus subtilis* and *Trichoderma* spp. *Rev. Bras. Frutic.* 2011; 33(4): 1111-1118. <https://doi.org/10.1590/S010029452011000400009>.
 23. Serra W. Caracterización de cepas de *Phyllosticta citricarpa* que afectan plantaciones cítricas de Cuba. [Tesis de Maestría]. 2019. Universidad de La Habana, La Habana, Cuba. 62 pp.
 24. Carstens E, Linde C, Slabbert R, Miles A, Donovan N, Li H, *et al.* A Global Perspective on the Population Structure and Reproductive System of *Phyllosticta citricarpa*. *Phytopathology*. 2017; 107(6): 758-768. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-16-0292-R>

25. Benson AH. Black spot of the orange. The Agricultural Gazette of New South Wales. 1895; 4: 249-252.
26. Gaceta Oficial de La República de Cuba No 25. 2017. ISSN 1682-7511
27. Schreuder W, Plooy W du, Erasmus A, Savage C, Basson E, Lennox C, Fourie PH. Postharvest fungicide treatments and cold storage control citrus black spot infections. Crop Prot. 2018; 112, 332-342. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2018.06.020>
28. Alonso-Oliva, E. Caracterización de síntomas y estrategia de control de la mancha negra de los frutos cítricos (*Guignardia citricarpa* Kiely) en Jagüey Grande. [Tesis de Maestría]. 2010. Instituto de Investigaciones en Fruticultura Tropical, Jagüey Grande, Matanzas, Cuba. 68 pp.
29. Frare GF, Silva-Junior GJ, Bassanezi RB, Ramires TG, Amorim L. Sweet orange fruit age and inoculum concentration affect expression of citrus black spot symptoms. Plant Dis. 2019. <https://doi.org/10.1094/ PDIS-03-18-0492-RE>
30. Spósito MB, Amorim L, Bassanezi RB, Yamamoto P, Felipe MR, Czermainski A. Relative importance of inoculum sources of *Guignardia citricarpa* on the citrus black spot epidemic in Brazil. Crop Prot. 2011; 30: 1546-1552. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.08.007>.
31. Holtz, T. Risk assessment of *Citrus* spp. fruit as a pathway of the introduction of *Guignardia citricarpa* Kiely, the organism that causes citrus black spot disease. 2010. Disponible en: http://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_inf o/citrus/downloads/black_spot/cbsrisk-assessment.pdf. Consulta: 18 de febrero 2022
32. van der Aa HA. Studies in *Phyllosticta*. Studies in Mycology. 1973; 5: 1-110.
33. Marin-Felix Y, Hernández R, Wingfield M, Akulov A, Carnegie A, Cheewangkoon R, et al. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 2. Stud. Mycol. 2019; 92: 47-133. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.04.002>.
34. Ferguson, L; Prokrym, D. 2012. *Phyllosticta citriasiana*. The USDA APHIS Plant Protection and Quarantine. New Pest Advisory Group. Report 20121109.
35. Tran NT, Miles A, Smith MW, Dietzgen RG, Drenth A. Pathogenicity of *Phyllosticta citricarpa* ascospores on *Citrus* spp. Plant. Dis. 2018; 102: 1386-1393. <https://doi.org/10.1094/ PDIS-08-17-1331-RE>
36. Gómez-Montes de Oca A, Alonso-Oliva E, Aranguren-González M, González- Rodríguez AI, Bravo-Pérez I. Evaluación de estrategias de manejo para el control de la mancha negra de los cítricos causada por *Guignardia citricarpa* Kiely en la región de Jagüey Grande. CitriFrut. 2012; 29(2): 40-45.
37. Hendricks M, Christman M, Roberts PD. Spatial and temporal patterns of commercial citrus trees affected by *Phyllosticta citricarpa* in Florida. Sci. Rep. 2017; 7, 1641. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-01901-2>
38. Hendricks KE, Christman, M, Roberts PD. The Effect of Weather and Location of Fruit within the Tree on the Incidence and Severity of Citrus Black Spot on Fruit. Scientific Report. 2020;10: 1389. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-58188-z>
39. Dewdney MM, Schubert TS, Estes MR, Roberts PD, Peres NA. Citrus black spot. En: Diepenbrock, L.M., Dewdney, M.M. and Vashisth, T., (ed). Florida Citrus Production Guide. pp. 129-134. Gainesville: University of Florida, Institute of Food and Agricultural Services. 2018.
40. Alonso-Oliva E, Aranguren GM, Gómez MO, González BF, Are AE, Manzano AM. Estrategia de control de la mancha negra de los frutos cítricos (*Phyllosticta citricarpa* (McAlpine) Aa.) y otras enfermedades fungosas en Jagüey Grande, Cuba. V Simposio Internacional de Fruticultura Tropical y Subtropical 2017. Disponible en: <http://riacnet.net/wp-content/uploads/2017/10/16-Estrategia-de-control-de-la-mancha-negra> . Consulta 18 de febrero 2022
41. Moyo P, van Niekerk JM, Fourie PH. Updated citrus black spot spray programs 2018-2019. CRI Cutting Edge. 2018; 254: 1-21.
42. Lanza FE, Metzker TG, Vinhas T, Behlau F, Silva-Junior GJ. Critical fungicide spray period for Citrus Black Spot control in São Paulo State. Brazil. Plant Dis. 2018; 102: 334-340. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-17-0537-RE> .
43. Hendrick M, Katherine E, Donahoo RS, Roberts PD, Christman MC. Effect of copper on growth characteristics and disease control of the recently introduced *Guignardia citricarpa* on citrus in Florida. American J. Plant Sci. 2013; 4: 282-290. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2013.42037>.
44. Possiede YM, Gabardo J, Kava CV, Galli TLV, Azevedo JL, Glienke C. Fungicide resistance and genetic variability in plant pathogenic strains of *Guignardia citricarpa*. Braz. J. Microbiol. 2009; 40: 308-313. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822009000200018>.
45. Stammler G, Schutte GC, Speakman J, Miessner S, Crous P. *Phyllosticta* species on citrus: Risk estimation of resistance to QoI fungicides and identification of species with cytochrome *b* gene sequences. Crop Prot. 2013; 48: 6-12. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.001>
46. Samaniego J, Ulloa A, Herrera T. Hongos del suelo antagónicos de *Phymatotrichum omnivorum*. Fitopatología Mexicana. 1989; 7: 86-95.

47. Finney DJ. *Probit Analysis*, third ed. 333 p. Cambridge University Press, London. 1971
48. Tran NT, Miles AK, Dietzgen RG, Drenth A. *Phyllosticta capitalensis* and *P. paracapitalensis* are endophytic fungi that show potential to inhibit pathogenic *P. citricarpa* on citrus. *Australas Plant Path.* 2019; 48: 281-296. <https://dx.doi.org/10.1007/s13313-019-00628-0>
49. Sumida CH, Daniel FS, Paul SC, Douglas A, Peitl C, Abreu LM, et al. *Trichoderma asperelloides* antagonism to nine *Sclerotinia sclerotiorum* strains and biological control of white mold disease in soybean plants. *Biocontrol Sci. Technol.* 2018; 28(2): 142-156. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1430743>
50. Uddin MN, Rahman U, Khan W, Uddin N, Muhammad M. Effect of *Trichoderma harzianum* on tomato plant growth and its antagonistic activity against *Phythium ultimum* and *Phytophthora capsici*. *Egypt. J. Biol. Pest Control.* 2018; 28. <https://dx.doi.org/10.1186/s41938-018-0032-5>.
51. Quesada-Mola Y, Fernández-Gonzálves E, Casanueva-Medina K, Ponce-Grijuela E, Márquez-Gutiérrez ME. Actividad biológica de nuevas cepas cubanas de *Trichoderma* spp. efectivas en el control de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *RCCB.* 2019; 7: 1-9. ISSN: 2307-695X.
52. Rodríguez A, Kava V, Latorre-García L, da Silva GJJ, Pereira RG, Glienke C, et al. Engineering D-limonene synthase down-regulation in orange fruit induces resistance against the fungus *Phyllosticta citricarpa* through enhanced accumulation of monoterpene alcohols and activation of defense. *Mol. Plant Pathol.* 2018; 19: 2077-2093.

Declaración de conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribución de los autores: Wendy Serra: **conceptualización, investigación, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).** Ana Margarita Manzano León: **conceptualización, visualización, supervisión, adquisición de fondos, administración de proyecto, redacción del borrador original, redacción (revisión y edición).**

Este artículo se encuentra bajo licencia [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional \(CC BY-NC 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)