

Monilinia fructicola, única especie presente ocasionando la podredumbre morena del duraznero (*Prunus persica*) en Uruguay

Gabriela Malvárez¹, Andrea Rodríguez¹, Cecilia Aguilar¹, Ana Cecilia Silveira², Elisa Silvera², Juan Burgueño³, Pedro Mondino²

RESUMEN

La podredumbre morena cultivo del duraznero (*Prunus persica*). Existen tres especies: *M. fructigena*, *M. fructicola* y *M. laxa*. En causada por *Monilinia* spp es la enfermedad fungosa más importante que afecta el Uruguay las tres especies han sido reportadas en el pasado sin que se haya hecho referencia a la metodología utilizada para su identificación. Con el propósito de determinar cuales de las especies están efectivamente afectando la producción en Uruguay, aislamientos provenientes de frutos y flores fueron caracterizados mediante el uso de iniciadores específicos (MO368-5, MO368-8R, MO368-10R, MO368-12R). Estos iniciadores usados en una simple reacción permiten distinguir entre las tres especies analizando el tamaño de los productos de amplificación obtenidos. La técnica probó ser efectiva amplificando en forma diferencial a las 3 especies. Todas las muestras analizadas pertenecieron a la especie *M. fructicola* independientemente del cultivar de durazno y del sitio de muestreo. Estos resultados evidencian la necesidad de controlar la importación de duraznos para evitar el ingreso de *M. fructigena* y *M. laxa* en Uruguay.

ABSTRACT

Malvárez, G., Rodríguez, A., Aguilar, C., Silveira, A.C., Silvera, E., Burgueño, J., and Mondino, P. 2004. *Monilinia fructicola*, the only *Monilinia* species currently causing brown rot of peach (*Prunus persica*) in Uruguay. FITOPATOLOGIA 39 (3): 126 - 132.

The brown rot disease caused by *Monilinia* spp. is the most important fungal disease in peach (*Prunus persica*). There are three species: *M. fructigena*, *M. fructicola* and *M. laxa*. In Uruguay, these species have been reported in the past, but without reference to the methodology used for their identification. In order to establish which of the species are effectively affecting current peach production in Uruguay, isolates from infected fruit and flowers were characterized through PCR with specific primers (MO368-5, MO368-8R, MO368-10R, MO368-12R). These primers used in a single reaction allowed to distinguish among the three species depending on the size of the amplification product obtained. The technique proved to be effective in differentially amplifying the three species. Regardless of peach cultivar identity or collection site, all the samples analyzed, were found to be *M. fructicola*. This outcome makes imperative the need to control fruit imports in order to avoid the entrance of *M. fructigena* and *M. laxa* in Uruguay.

Additional keywords: Peach, *Prunus* spp., *M. laxa*, *M. fructigena*, PCR.

¹ Microbiología, Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780 - Montevideo, 12900. Uruguay. C.Elec: gabriela@fagro.edu.uy

² Unidad de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Garzón 780 - Montevideo, 12900. Uruguay.

³ Asistente técnico de la Unidad de Biometría y Estadística, Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) Aptdo. Postal 6-641 06600, Mexico, D.F. México.

Accepted for publication: Noviembre 18, 2004.

INTRODUCCION

La producción de duraznos [*Prunus persica* (L.) Batsch] en Uruguay ocupa un área de 2,120 ha incluyendo nectarines, representando el 30 % del área de producción de frutales de hoja caduca (4) y es la más importante en cuanto al número de productores que la realiza (1,248 productores representando el 38.2% del total), seguida por la producción de manzana. La podredumbre morena causada por *Monilinia* spp. es la enfermedad fungosa más importante que afecta al cultivo. Este hongo afecta las flores produciendo atizonado de las mismas con posterior formación de canchales y muerte de ramitas. Posteriormente ataca los frutos produciendo la podredumbre marrón y firme que le da nombre a la enfermedad. Finalmente el fruto atacado se momifica pudiendo permanecer en la planta o sobre el suelo hasta la temporada siguiente. La susceptibilidad de los frutos aumenta con el grado de madurez de los mismos pudiendo ocurrir las infecciones tanto en el campo como en la poscosecha. En el mundo se han identificado tres especies de *Monilinia*: *M. fructigena* (Aderh. & Ruhl.) Honey, *M. laxa* (Aderh. & Ruhl.) Honey y *M. fructicola* (Wint.) Honey (2). Los principales caracteres utilizados para distinguirlas son: tamaño de los conidios, modo en que se ramifican los tubos germinativos, morfologías de las colonias en medio papa dextrosa

agar (PDA), rango de hospedantes y partes de las plantas infectadas.

M. fructigena es principalmente un patógeno de fruta y es la única especie que incluye entre sus hospedantes al manzano (*Malus pumila*), mientras que *M. laxa* está considerada como un patógeno de flores y ramas más que de fruto en frutales de carozo (*Prunus* spp). Por último *M. fructicola* es capaz de atacar tanto flores, ramas como frutos y afecta principalmente frutas de carozo. En varias regiones del mundo, dos de las tres especies coexisten. *M. fructigena* coexiste con *M. laxa* principalmente en Europa y Asia. *M. fructicola* y *M. laxa*, que producen síntomas similares, y tienen hospedantes en común, coexisten en el "Nuevo Mundo", especialmente América del Norte y Australia (5). En Uruguay, las tres especies han sido citadas. Estas citas se encuentran en enumeraciones de patógenos que afectan los cultivos en el país, pero en ningún caso hacen referencia a la metodología utilizada para la identificación (1, 6, 7, 8, 9, 17). Los primeros estudios epidemiológicos realizados en el país indican la inexistencia de la enfermedad en manzanos mientras que las flores y frutos son severamente atacados en *Prunus* spp. y la presencia de la reproducción sexual mediante la formación de apotecios (11, 12, 13, 14). Con el objetivo de determinar que especies de *Monilinia* se encuentran presentes en el Uruguay y cual

es su incidencia relativa en flores y frutos se realizó un muestreo representativo de estos órganos en las principales regiones productoras de duraznos del país y se procedió al aislamiento e identificación del patógeno a nivel de especie (Mondino et al., datos no publicados). A partir de las dificultades encontradas para identificar los aislamientos obtenidos mediante las técnicas tradicionales se determinó la necesidad de disponer de una herramienta rápida y precisa que permitiera realizar una prospección de las especies presentes en el país. Para ello se ajustó la metodología de amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con iniciadores (primers) específicos para cada una de las tres especies, desarrollados por el equipo de la Dra. M. J. Coté (3, 10). La técnica resultó efectiva en la detección del ADN de *Monilinia* (amplificación positiva o negativa), aún en presencia de ADN vegetal, y en la identificación de cada una de las especies según el tamaño del producto de amplificación obtenido. En el presente trabajo, esta técnica fue aplicada para caracterizar aislamientos provenientes de las principales zonas productoras de duraznos del país, con el objetivo de determinar en forma precisa cual/es de las tres especies están afectando al cultivo y su distribución en Uruguay.

MATERIALES Y METODOS

Para la caracterización de las especies de *Monilina* sp. se identificaron y ubicaron en un mapa todos los montes de durazneros y nectarines de las principales zonas de producción. Una muestra representativa de dichos montes se obtuvo mediante sorteo al azar. Los montes elegidos fueron muestreados en las semanas posteriores al cuajado y en el momento previo a la cosecha. Muestras de flores atizonadas y de frutos con síntomas de podredumbre

morena fueron colectadas, acondicionadas en forma separada y transportadas al laboratorio para cultivo e identificación del hongo. La ausencia de ataque en flor impidió disponer de muestras en alguno de los años, mientras que siempre fue posible obtener suficientes frutos con síntomas. Se realizó un muestreo de las dos principales regiones productoras de durazno del país (Juanicó y Melilla) y se analizaron a su vez 16 aislamientos provenientes del norte del país (Salto), donde existe una nueva e incipiente

zona productora. En el Cuadro 1 se presentan el número de predios y cultivares de duraznos del muestreo. Para las muestras de la región de Melilla, colectadas durante el año 2000, el hongo fue aislado en medio agar malta acidificado (2% extracto de malta, 2% agar, pH 4.5, streptomycin 0.2 mg/ml) y repicado a medio PDA. El ADN fue extraído a partir de micelio. Para las muestras de flores de Melilla (año 2001) y las muestras de fruta de la región de Juanicó (año 2001), el ADN fue extraído directamente de la lesión en el tejido de la fruta o flor.

Cuadro 1. Número de predios y cultivares de *Prunus* spp. muestreados en el período 2000-2002

Código	Año	Región	Nº de muestras	Nº de predios	Cultivar de durazno
MFR (fruta)	2000-2001	Melilla	312	13	June Gold, Rey del Monte, Pavia, Flor da King, San Francisco, Dixiland, Bruneto
MFL (flor)	2001	Melilla	214	11	June Gold, Pavia, San Francisco, Elegant Lady, Tejano, Spring Crest, Don Omar
JFR (fruta)	2001-2002	Juanicó	328	19	June Gold, Pavia, San Francisco, Elegant Lady, Tejano, Borradevino, Southland, Early Grande
SFR (fruta)	2001-2002	Salto	16	3	Pavía, June Gold, Tejano, Early grande

Extracción de ADN

Aproximadamente 100 mg de micelio fresco de cultivos de 2 semanas en medio PDA o de tejido vegetal (flor o fruto) infectado fueron usados para la extracción de ADN según descrito por Malvárez et al.,

2001. La extracción consistió en una maceración del material e incubación en buffer de lisis (200 mM Tris HCl, pH 7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0.5% SDS) a 65°C durante 30 min. Posterior a la incubación se centrifugó en microcentrífuga por 10 min a

10,000 rpm. Para la precipitación del ADN se utilizó isopropanol, a -20°C durante 30 min y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm, por 5 min. El ADN se resuspendió en 50 ml de buffer TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8).

Para comprobar la presencia de ADN, las muestras fueron corridas en gel de agarosa 1%, con 0.3 mg de bromuro de etidio.

Amplificación

Para la reacción de amplificación (PCR), se utilizaron los iniciadores específicos para cada una de las tres especies de *Monilinia*: MO368-8R (*M. fructigena*), MO368-10R (*M. fructicola*) y MO368-12 (*M. laxa*) en combinación con el iniciador MO368-5, común a las tres especies (3). Las secuencias de los iniciadores son las siguientes:
 MO368-8R: 5'-AGATCAAACA-TCGTCCATCT-3'
 MO368-10R: 5'-AAGATTGT-CACCATGGTTGA-3'
 MO368-12: 5'-GACTGCAAT-CCACACCGTCCG-3'
 MO368-5: 5'-GCAAGGT-GTCAAAACTTCCA-3'

Las condiciones de la reacción fueron: nucleótidos 0.2 mM; MgCl₂ 2.5 mM; iniciadores 0.1 mM de cada uno; BSA 0.5 mg/ml, Taq polimerasa 0.5 U (GIBCO-BRLâ), buffer 1x (GIBCO-BRLâ). Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:
 95 °C por 30 s, 60°C por 60 s, 72 °C por 30 s durante cinco ciclos. Y 95 °C por 30 s, 58°C por 60 s, 72 °C por 30 s durante 35 ciclos con una extensión final de 5 min a 72 °C.

Los productos de la reacción fueron corridos en gel de agarosa 1.5% (0.3 mg de bromuro de etidio) para determinar, según el tamaño de la banda obtenido a cuál de las especies correspondía

cada muestra. Los tamaños esperados de banda son: 534 pb para *M. fructicola*, 400 pb *M. fructigena* y 333 pb para *M. laxa*. Como controles positivos se utilizó ADN de cultivos de colección de cada una de las especies y como control negativo se utilizó ADN de hoja de duraznero debido a que este tejido no es atacado por este hongo.

RESULTADOS Y DISCUSION

La metodología empleada

para la detección y caracterización el patógeno resultó efectiva (Fig. 1). En una única reacción de amplificación, es posible identificar si el patógeno es *Monilinia* y a cuál de las tres especies corresponde la muestra, aún cuando el ADN es extraído directamente del fruto o la flor. El ADN vegetal no amplifica con estos iniciadores bajo las condiciones utilizadas, por lo tanto, sólo ocurre la amplificación si la lesión es provocada por el hongo *Monilinia* (10). El

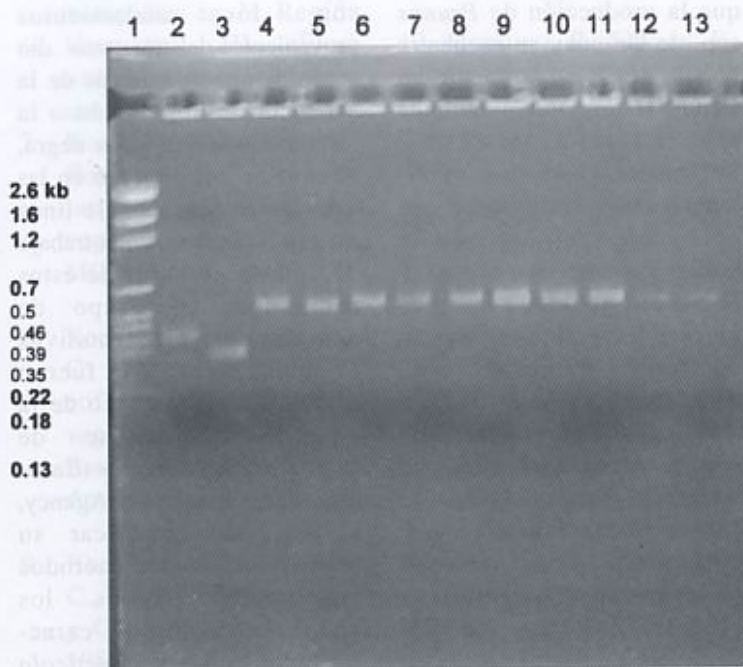


Fig. 1. Corridos electroforéticos en gel de agarosa de los productos de PCR de la reacción con los iniciadores MO368-5 en combinación con MO368-8R, MO368-10R y MO368-12R para las cepas de colección. **Carril 1:** marcador de peso molecular pGem; **Carril 2:** *M. fructigena* (cepa de colección); **Carril 3:** *M. laxa* (cepa de colección); **Carril 4:** *M. fructicola* (cepa de colección). Los carriles restantes corresponden a diferentes aislamientos de campo. Todos los aislamientos de campo correspondieron a la especie *M. fructicola*.

tamaño del fragmento amplificado indica a cuál de las tres especies pertenece.

En las 870 muestras analizadas, independientemente de la región o cultivar de durazno de la que se extrajo, se detectó únicamente *M. fructicola*. Las características del muestreo realizado, abarcando las dos principales zonas de producción de duraznos de Uruguay, e incluyendo a la incipiente producción de la zona norte del país así como el tamaño de muestra elegido permiten afirmar que la producción de *Prunus* spp. de Uruguay se encuentra libre de *M. laxa* y *M. fructigena* siendo *M. fructicola* la única especie presente en el país. Solamente si *M. laxa* y *M. fructigena* estuviesen en porcentajes mínimos en la población menores a un 1% hubiesen podido evadir el muestreo realizado, de lo contrario hubiesen sido detectadas.

En trabajos previos (datos no publicados) se intentó realizar este mismo trabajo basándose en características morfológicas y culturales. Los métodos utilizados fueron: morfología de colonias, tamaño de los conidios, ramificación de los tubos germinativos, desarrollo sobre peras verdes maduras (2). Se identificaron aislamientos con las características típicas de *Monilinia fructicola* y de *Monilinia laxa*. Uno de estos aislamientos, A31, identificado como *M. laxa* por todos los métodos utilizados, fue

seleccionado como referencia para realizar una prospección de las especies presentes en la zona de producción mediante el método de interacción de micelios creciendo en medio agar avena (AA) (16). Cuando aislamientos de diferentes especies se hacen crecer en este medio aparece una línea negra en la zona de interacción, mientras que aislamientos pertenecientes a la misma especie no producen interacción alguna (crecen sin llegar a tocarse los micelios). La interacción del aislamiento A31 con los aislamientos provenientes del muestreo dio como resultado, además de la ausencia de interacción o la formación de una línea negra, numerosas interacciones en las que apareció una doble línea marrón no descrita en el trabajo de Sonoda. A partir de estos resultados, un grupo de aislamientos representativos (incluyendo el A31) fueron enviados al laboratorio de la Agencia Canadiense de Inspección de Alimentos (Canadian Food Inspection Agency, CFIA), para verificar su identificación por métodos moleculares. Todos los aislamientos fueron caracterizados como *M. fructicola* (Coté, com. pers.) en contraposición a los resultados obtenidos hasta ese momento. Teniendo en cuenta la información de que todos los aislamientos utilizados en las interacciones en AA fueron *M. fructicola*, resulta evidente que diferentes aislamientos de *M.*

fructicola pueden interaccionar entre sí de diferentes maneras, incluso produciendo una línea negra similar a la reportada por Sonoda para la interacción de diferentes especies.

La reacción de amplificación (PCR), utilizando iniciadores específicos para cada una de las tres especies de *Monilinia* permitió superar las dificultades encontradas en la aplicación de otros métodos (15), permitiendo identificar en forma precisa y rápida un gran número de aislamientos provenientes de los muestreos realizados en los montes en producción.

La confirmación de que es la misma especie que ataca primero en etapa de floración y luego en la madurez de los frutos reafirma la necesidad de establecer medidas de manejo para evitar el atizonado de flores ya que estas constituyen una importante fuente de inóculo para la fruta.

La ausencia de *M. fructigena* coincide con la no existencia de la podredumbre morena en manzanas. Esta especie es la única capaz de producir esta enfermedad sobre manzanas y hasta el momento no existen referencias en nuestro país respecto a la presencia de la enfermedad en este cultivo aún cuando comparten las mismas regiones de producción y es usual que los agricultores posean ambos cultivos en sus predios.

La confirmación de que la producción de *Prunus* spp. en Uruguay se encuentra libre de *M. fructigena* y *M. laxa* constituye una ventaja comparativa en el

manejo de la podredumbre morena para sus agricultores, por lo que resulta imperativo se instrumenten los controles de frontera necesarios para evitar su ingreso desde regiones donde estas dos especies sí están presentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a CSIC (Comisión Sectorial de Investigación Científica) por la financiación mediante el fondo para proyectos de Investigación y Desarrollo- 2000; a la Dra. Marie José Coté del Canadian Food Inspection Agency cuyo grupo de trabajo diseñó los iniciadores utilizados en el presente trabajo; a la Ing. Agr. M.Sc. Carolina Leoni y a la Ing. Agr. M.Sc. Martha Díaz de Ackermann por la revisión crítica de este artículo.

LITERATURA CITADA

1. Bertelli, J.C. y Mesa Carrión, F. 1941. Enfermedades y plagas principales de la agricultura uruguaya. MGAP. Cartilla N° 55.
2. Byrder, R.J.W., and Willetts, H.J. 1977. The Brown Rot Fungi of fruit, their biology and control. Pergamon Press Ltda. Londres.
3. Côté, Marie-José. 2004. Identification of *Monilinia fructigena*, *M. fructicola*, *M. laxa*, and *Monilia polystroma* on inoculated and naturally infected fruit using multiplex PCR. Plant Disease 88:11: 1219-1225.
4. DIEA – MGAP. 2002. Estadísticas Agropecuarias. Boletín Informativo. Encuesta Frutícola. Zafra 2001/2002. Serie Encuestas N° 210.
5. Fulton, C.E., Van Leeuwen, G.C.M., and Brown, A.E. 1999. Genetic variation among and within *Monilinia* species causing brown rot of stone and pome fruits. European Journal of Plant Pathology 105: 495-500.
6. Herter, G. 1933. Estudios botánicos en la Región Uruguaya III. Flora uruguayensis. Plantae avasculares.
7. Koch De Brotos L., y Boasso, C. 1955a. Lista de las enfermedades de los vegetales en el Uruguay. MGA. Publicación N° 106.
8. Koch De Brotos L. y Boasso, C. 1955b. Lista de las enfermedades de los vegetales en el Uruguay. Resumen en The Review of Applied Mycology 35:751.
9. Koch De Brotos, L., Boasso, C., Riccio De Machado, O., y Gandolfo Antúnez, C. 1981. Enfermedades de las plantas, hongos superiores y saprófitas en el Uruguay. MGAP. Informe Técnico N°9.
10. Malvárez, G., Rodríguez, A., Aguilar, C., Silvera, E., y Mondino, P. 2001. Identificación de especies de *Monilinia* spp., en aislamientos obtenidos de *Prunus* spp. por PCR con primers específicos Agrociencia. Vol V N°1.
11. Mondino, P., Pérez, E., Gepp V. y García, S. 1997. Detección de infecciones latentes de *Monilinia* sp. sobre frutos verdes de durazno en Uruguay. Páginas 53-55 en: Serie de Actividades de Difusión N° 150, INIA Las Brujas.
12. Mondino, P., Silvera, E., Gepp, V. y García, S. 1997. Determinación de la presencia de la reproducción sexual de *Monilinia fructicola* mediante la producción de apotecios. Páginas 50-52 en: Serie de Actividades de Difusión N° 150, INIA Las Brujas.
13. Mondino, P., Silvera, E., Leites, L., Gepp, V., y García, S. 1997. Determinación de la incidencia de las diferentes especies de *Monilinia* sp. en la zona de Melilla. Página 56-57 en: Serie de Actividades de Difusión N° 150, INIA Las Brujas.
14. Mondino, P., Silvera, E., Pérez, E., Gepp, V. y García, S. 1997. Estudio epidemiológico de *Monilinia* sp. causante de la podredumbre morena sobre

Prunus sp. Seguimiento de la sintomatología ocasionada por *Monilinia* sp. sobre plantas de duraznero. Páginas 56-57 en: Serie de Actividades de Difusión N° 150, INIA Las Brujas.

15. Pérez, E., Alaniz, S., Mondino, P. y Gepp, V., 2000. Evaluación de un método de monitoreo de fuentes de inóculo de

Monilinia sp. para predecir y decidir medidas de control de la enfermedad en montes de duraznero. Proyectos de Validación de Tecnológica. Jornadas de Presentación de resultados. MGAP - PREDEG.

16. Sonoda, R.M., Ogawa, J. M., Shabi, E., and Manji, B. T. 1982. Use of interactions of cultures to distinguish

Monilinia laxa and *Monilinia fructicola*. Plant Disease 66:325-326.

17. Tállice, R., Formento, A., and Hitz, C. 1978. Control post-cosecha de podredumbres en duraznos.

Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, Centro de Investigaciones Agrícolas, Estación Experimental Las Brujas. Hoja de Divulgación N° 46.